

Title	新抗アレルギー剤2, 4-Bis (2-Acetoxybenzamido) Benzoic Acidに関する研究
Author(s)	大杉, 義征
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31711
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	^{おお} 大	^{すぎ} 杉	^{よし} 義	^{まさ} 征
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	3823	号	
学位授与の日付	昭和52年2月24日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	新抗アレルギー剤2, 4-Bis (2-Acetoxybenzamido) Benzoic Acidに関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁			
	(副査) 教授 岩田平太郎 教授 鎌田 皎 教授 近藤 雅臣			

論文内容の要旨

第1編 緒 論

レアギンの本体がIgEであることが石坂らによって明らかにされて以来、即時型(第I型)アレルギーに関する研究発展はめざましく、組織肥満細胞や血中好塩基球の細胞表面に固着したIgEが対応抗原と反応することにより、細胞内からヒスタミン、SRS-Aなどの化学伝達物質が遊離し、これらの生理活性物質の働きで種々のアレルギー症状が発現することが明らかにされるに至った。

1967年、Coxによって紹介されたdisodium cromoglycate(DSCG)は組織肥満細胞からの化学伝達物質のアナフィラキシー性遊離を阻止する抗アレルギー剤で、化学伝達物質に対する直接拮抗作用や抗炎症作用は有さない。本剤は気管支喘息発作予防薬として臨床で用いられ、良好な成績を上げ、その作用機構のユニークさとともに脚光を浴びている。しかし、DSCGは経口投与した場合、消化管からの吸収が悪くて、内服では効果が得られないので吸入剤として用いられており、臨床使用上でいろいろな制約をうけている。

著者はこのような点に着目し、経口投与でも有効な抗アレルギー剤の開発をめざして、新しく合成された一連のアミノ安息香酸誘導体についてスクリーニングを行った。その結果、第I型アレルギーの代表的実験モデルであるラットhomocytotropic antibody(HTA)によるhomologous passive cutaneous anaphylaxis(PCA)に対して2,4-bis(2-acetoxybenzamido)benzoic acid(AB-50)が、経口投与で顕著な阻害作用を示すことを認めた。AB-50の作用性格は、上述したDSCGのそれに極めて類似している。しかし、DSCGとは異なり、経口投与でも有効なこと、抗補体作用を有すること、などの興味あるいくつかの新しい特徴を有する抗アレルギー性の物質である。

第2編 本 論

第1章 アミノ安息香酸誘導体の加温溶血反応阻害作用

一連のアミノ安息香酸誘導体の加温溶血反応に対する作用を調べた結果、2,4-(AB-23)、3,5-(AB-19)、および2,5-bis-(salicylamido) benzoic acid(AB-27)はメフェナム酸などの非ステロイド性抗炎症剤よりも強い溶血反応阻害作用を示した。3,4-bis-(salicylamido)benzoic acid(AB-22)もかなり強い作用を示した(Fig. 1)。

第2章 ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する Bis(salicylamido) benzoic acids の阻害作用

Compound 48/80によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する bis(salicylamido) benzoic acid 類の影響を調べた結果、AB-23やAB-27は本反応を顕著に阻害し、その作用は対照薬剤として用いたDSCGやメフェナム酸よりも強かった。AB-19も弱い活性を示したが、AB-22はほとんど作用を示さなかった(Table I)。このように bis(salicylamido)benzoic acid 類は赤血球膜のみに対して安定化作用を示すだけではなく、肥満細胞膜に対しても同様の安定化作用を有することが示唆された。また AB-23 を添加して37°で一定時間処理後、洗浄した細胞からの Compound 48/80 によるヒスタミン遊離は処理時間に応じて減少するが、処理細胞を洗浄後、37°で放置することにより Compound 48/80 に対する反応性が速やかに元通り回復した。¹⁴C-AB-23 (アミド結合の2個の炭素原子が¹⁴C) を用いて肥満細胞との相互作用を検討した結果、上記現象と細胞に取り込まれた¹⁴C-AB-23量の間にはほぼ相関性がみられた。これらのことからAB-23は肥満細胞の膜あるいは細胞質内に侵入し、細胞を死滅させることなく Compound 48/80による細胞外へのヒスタミン遊離を阻害することが強く示唆された。

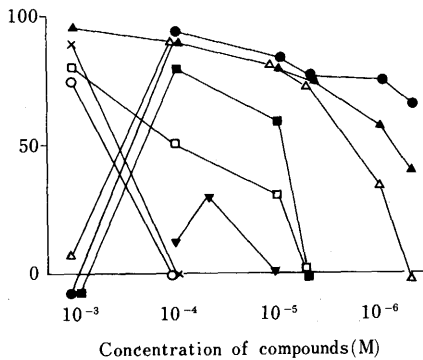


Fig. 1. Dose-response Relationships of Various Compounds in Heat-induced Hemolysis.

- : AB-23
- : AB-22
- : salicylic acid
- △ : AB-27
- × : phenylbutazone
- ▲ : AB-19
- : mefenamic acid
- ▼ : benzydamine

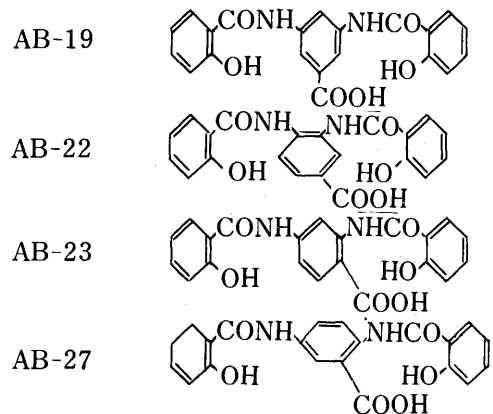


Table I. Effect of Some Bis(salicylamido) Benzoic Acids on Compound 48/80-induced Histamine Release from Peritoneal Mast Cells

	% Inhibition ^{a)} at a concentration (M) of:				
	4×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-5}	1×10^{-5}	4×10^{-6}
AB-23	88.6±5.3	80.0±3.0	65.7±2.8	31.3±2.7	0.8±0.1
AB-27	80.0±4.0	71.4±2.5	45.6±3.1	11.4±0.5	0
AB-19	22.9±1.7	0	0	0	0
AB-22	8.6±1.0	0	0	0	0
DSCG	31.9±3.2	14.3±2.0	0	0	0
Mefenamic acid	58.3±3.1	36.2±3.7	19.7±1.5	2.4±0.3	0

In the control, 73% of histamine was released from the cells.

a) Mean ± S. E.

第3章 Bis(salicylamido) benzoic acid類の Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 阻害作用

第I型アレルギー反応 (Coombsの分類) においては組織肥満細胞に固着したIgEと対応抗原との相互反応により細胞外に遊離したヒスタミンなどの化学伝達物質が症状を引き起こすことが知られている。そこで肥満細胞膜を安定化し、Compound 48/80による肥満細胞からのヒスタミン遊離を阻害する bis(salicylamido) benzoic acid類について、第I型反応の代表的実験モデルとして頻用されているラットのIgE様抗体 'homocytotropic antibody (HTA)' によるPCAに対する影響を調べた。

Dinitrophenyl基結合ブタ回中抽出物に対するラットHTAによるPCAに対する作用はTable II

Table II. Effect of Intravenous Administration of Bis(salicylamido) benzoic Acids on Reagin-mediated PCA in Rats

Compd.	Dose ^{a)} (mg/kg)	Diameter (mm) ^{b)} of blueing spots evoked by antiserum diluted to:			
		1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
None		17.6±0.9	13.8±0.8	10.3±0.6	6.2±0.7
AB-19	10	20.9±0.7	14.5±0.5	11.6±0.2	8.1±0.7
	20	20.0±0.7	14.0±0.7	11.9±0.7	8.0±0.9
	40	10.5±1.5	8.0±0	1.0±1.0	0
	80	3.0±1.0	1.0±1.0	0	0
AB-23	10	11.8±1.9	8.3±1.1	2.3±1.3	0
	20	7.6±1.1	4.3±0.9	0	0
	40	0.7±0.7	0	0	0
AB-27	20	17.8±0.6	12.5±0.8	9.3±0.3	8.0±1.3
	80	9.2±0.6	5.5±0.3	0	0
AB-22	20	18.6±1.8	13.7±0.9	9.0±1.0	8.7±0.2
	80	16.7±0.7	12.7±0.6	4.3±2.2	0.7±0.7

a) Compounds were administered intravenously 5 min before challenge.

b) Means ± S. E.

に示した如くであり、10mg/kg の AB/23 を抗原注射の 5 分前に静脈内注射することにより反応は阻害され、40mg/kg では完全に阻害された。AB-19 は 20mg/kg 以下ではまったく阻害作用を示さなかったが、40mg/kg 以上では抑制作用を示した。AB-27 については 80mg/kg で阻害作用を示したが、AB-22 は 80 mg/kg の投与量で弱い作用を示したにすぎなかった。

次に AB-23 や AB-19 をアセチル化あるいはエステル化した誘導体を経口投与し、PCA に対する作用を検討した。Table III, Fig. 2 に示したように、AB-23 のジアセチル体である AB-50 がもっとも強い阻害作用を示した。

Fig. 2. Effect of Oral Administration of AB-23 and Its Derivatives on Reaginmediated PCA Reaction in Rats.

A dose of 500mg/kg of compounds was administered orally 30min before challenge.

□ : control, ▨ : AB-23, ▩ : AB-43, ■ : AB-50

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

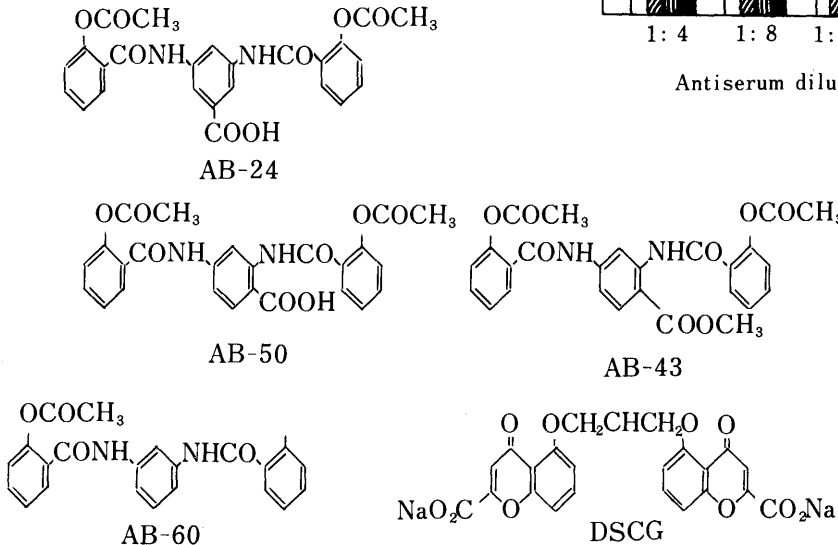
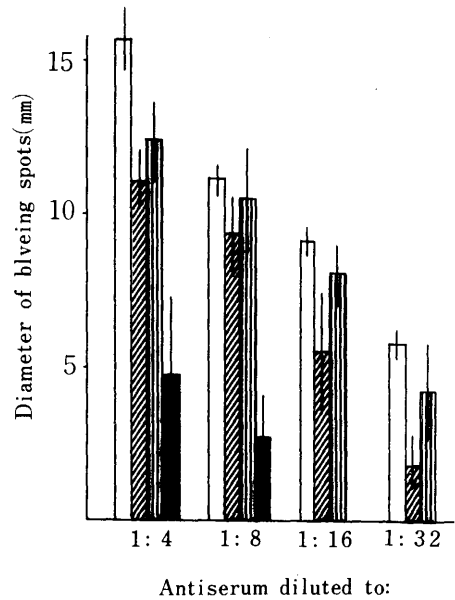


Table III. Inhibitory Effect of Oral Administration of AB-50 and Its Related Compounds on Reagin-mediated PCA in Rats

Compd. ^{a)}	Diameter (mm) ^{b)} of blueing spots evoked by antiserum diluted to:			
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Control	13.8±1.2	10.9±0.6	7.1±0.6	3.3±1.2
AB-50	11.4±0.9	7.0±0.8*	1.5±0.9*	0
AB-24	13.5±0.6	9.7±0.2	7.2±0.2	3.8±0.4
AB-60	14.1±0.4	11.4±0.5	9.8±0.3	7.8±0.6
DSCG	13.6±0.1	11.6±0.3	9.3±0.7	6.9±0.8

a) A dose of 500mg/kg of each compound was administered 30 min before challenge.

b) Means ± S. E.

* Statistically significant difference from control; $p < 0.01$.

第4章 AB-50の抗アレルギー作用

AB-50を経口投与した場合、100mg/kgでPCAを抑制する傾向が、500mg/kg以上の投与量で明らかな阻害作用が認められた。また、直接十二指腸内に注入した場合には20mg/kgで顕著な作用を示した(Table IV, V)。いずれの場合も抗原注射の30分前に投与するのがもっとも効果的であった。

AB-50はIgE様抗体‘HTA’によるPCAばかりではなく、ウサギ抗血清によるモルモットPCAに対しても経口投与で阻害作用を示し(Fig. 3)、さらにラットおよびモルモットにおけるアナフィラキシー・ショック死に対しても防御的に働き、延命効果を持たらした。

Table IV. Effect of Oral Administration of AB-50 on Reagin-mediated PCA in Rats

Dose ^{a)} (mg/kg)	Diameter (mm) ^{b)} of blueing spots evoked by antiserrum diluted to:		
	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Control	13.9±1.2	10.9±0.6 (5.2±0.9) ^{c)}	7.2±0.6
AB-50	50	14.5±0.5	10.2±0.2 (3.8±0.5)
	100	13.3±0.7	8.5±0.5 (2.5±0.6)
	500	11.4±0.9	7.0±0.8 (2.4±0.5)
	1000	7.7±2.4	4.4±2.3 (1.4±0.5)

a) AB-50 was administered orally 30 min before challenge.

b) Means ± S. E.

c) Numerals in parenthesis indicate quantity (μ g) of dye extravasated in the reaction site.

しかし、AB-50はヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなどの化学伝達物質による皮膚反応に対しては阻害作用を示さず、また抗炎症作用を有さないこともカラゲニン足浮腫法により明らかにされた。

AB-50をラットの血漿あるいは肝ホモジネートで処理すると容易にAB-23に変換し、この変換はin vivoでも起ることが確かめられているのでAB-50の生体内での活性型はAB-23であると考えられる。

Table V. Effect of Intrastomach or Intraduodenal Administration of AB-50 on PCA in Rats

	Dose ^{a)} (mg/kg)	Route of administration	Diameter (mm) ^{b)} of blueing spots evoked by antiserum diluted to:	
			1 : 4	1 : 8
Control			10.4±0.4	8.0±0.3
AB-50	20	duodenum	2.7±0.7	0.3±0.3
	40	duodenum	2.5±1.6	0.3±0.3
	100	duodenum	2.0±0	0.7±0.3
	100	stomach	9.3±1.9	5.3±2.2

a) AB-50 was administered 30 min before challenge.

b) Means ± S. E.

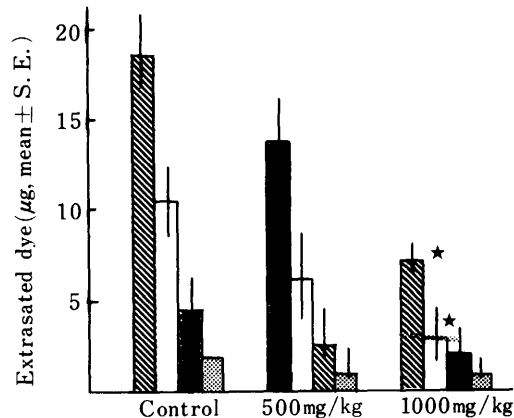


Fig. 3. Effect of Oral Administration of AB-50 on PCA in Guinea Pigs.

Dilution of antiserum;

1 : 400 (▨), 1 : 800 (□), 1 : 1600 (■),

1 : 3200 (▩).

* $p < 0.05$,

AB-23はヒトIgE-抗ヒトIgE complexによるラット腹腔肥満細胞の脱顆粒現象 (Table VI), 並びに卵白アルブミンに対するラットHTAによる腹腔内アナフィラキシー性ヒスタミン遊離 (Fig. 4) を阻害した。

以上の結果からAB-50はIgEばかりではなくIgG様抗体によるPCAに対して経口投与で阻害作用を示し, このような作用は抗原抗体反応による肥満細胞からのヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離阻害に基づくものであり, 化学伝達物質に対する直接拮抗作用や抗炎症作用は有していないことが判明した。

Table VI. Inhibitory Effect of AB-23 on IgE-anti-IgE-mediated Rat Mast Cell Degranulation

	Treatment	Degranulation ^{a)} (%)	Inhibition (%)
Control		48±5.1	
AB-23	1×10 ⁻⁴ M	3±0.1	93.7
	1×10 ⁻⁵ M	2±0.1	95.9
	1×10 ⁻⁶ M	3±0.1	93.7
	1×10 ⁻⁷ M	10±1.7	79.2
DSCG	1×10 ⁻⁴ M	2±0	95.0
	1×10 ⁻⁵ M	1±0.1	97.9
	1×10 ⁻⁶ M	5±0.3	89.6
	1×10 ⁻⁷ M	29±3.1	39.6

a) Values are means ± S. E. of triplicate experiments.

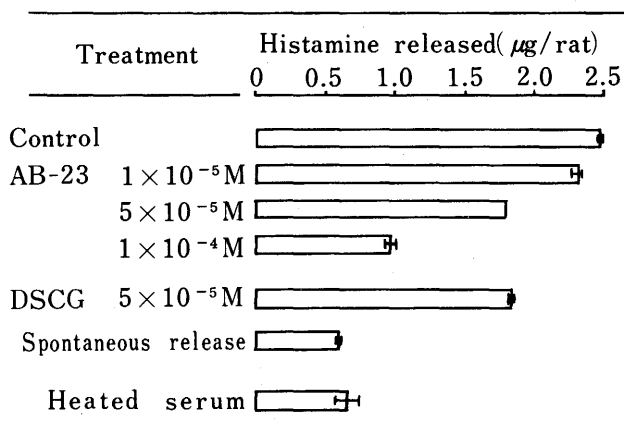


Fig. 4. Inhibitory Effect of AB-23 on Antigen-induced Histamine Release in the Rat Peritoneal Cavity

Heights of columns and vertical lines represent the means ± S. E. of four animals per group.

第5章 2, 4-Bis(salicylamido) benzoic acid (AB-23) の抗補体作用

Bis(salicylamido) benzoic acid類は加温溶血反応に対して強い阻害作用を示す(第1章参照)ばかりではなく、免疫溶血反応に対しても顕著な阻害作用を示し、AB-23, AB-27の作用はEDTAやクエン酸ソーダ、あるいは非ステロイド性抗炎症剤よりも強かった(Fig. 5)。

強い活性を示したAB-23について、その作用部位を検討した結果、ヒツジ赤血球とそれに対する抗体の結合反応に対してはまったく影響を与えず、引き続いて起る補体の結合連鎖反応を阻害することが明らかになった。AB-23による免疫溶血反応阻害作用は薬物および補体の濃度に依存し、大量の補体添加によって起る溶血を防止するためにはより高濃度の薬物の添加が必要であった。またAB-23により溶血を免れた赤血球に、薬物を除去後、新しく補体を再添加すると溶血反応が起った。これらの

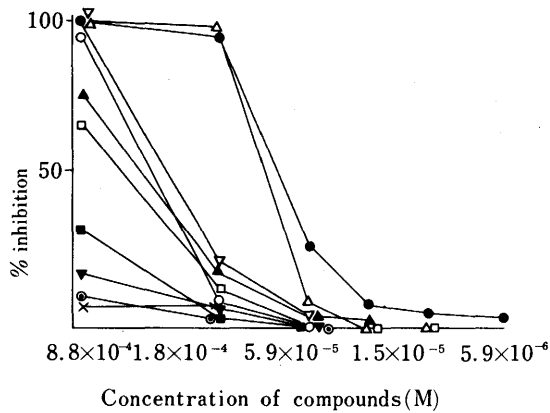


Fig. 5. Dose-response Relationships of Various Compounds in Immune Hemolysis.

- : AB-23
- : AB-22
- ⊙ : salicylic acid
- : mefenamic acid
- △ : AB-27
- × : phenylbutazone
- ▼ : DSCG
- ▲ : AB-19
- ▽ : sodium citrate
- : EDTA

結果から AB-23は感作赤血球に補体が結合するのを阻害することが示唆され、この可能性は免疫粘着反応に対する阻害作用により明確にされた。AB-23による溶血阻害作用は Ca^{2+} および Mg^{2+} に対するキレート作用によるものではない。また EDTA や EGTA の場合は補体を添加してから 8 分後に加えたのでは作用が認められないのに対し、AB-23は15分後に添加しても阻害作用を示すことから、本物質は金属イオンを必要としない補体第3成分から第9成分までの late component の連鎖反応を阻害することが示唆された。この考えは、AB-23が zymosan による alternative pathway を介した補体の活性化を防禦するという事実により強く支持された。

第6章 AB-50のアルサス反応および抗腎抗体によるラット腎炎に対する影響

抗腎抗体によるラット腎炎の発症およびモルモットにおける受身アルサス反応に対して AB-50は経口投与で顕著な阻害作用を示した (Table VII, Fig. 6)。これらの反応は、それぞれ Coombs の第 II および第 III 型のアレルギー反応の代表的実験モデルであり、補体が重要な役割を演ずることが知られている。AB-50は抗原抗体反応に引き続いて起る補体の結合反応を阻害することにより両反応を阻害するものと考えられる。

Table VII. Inhibition by AB-50 of Protein Excretion in Urine after Nephrotoxic Serum Injection into Rats

Days after NTS injection	Dose (mg/kg)	No. of rats	Urinary Volume (ml/16hr)	Urinary protein	
				(mg/ml)	(mg/16hr)
3	0	15	8.1±1.0	12.1±2.0	94.1±18.4
	100	8	7.3±0.9	8.2±3.0	48.4±14.4
	200	16	6.1±0.5	7.6±1.8	45.3±10.5*
	500	12	6.9±1.1	4.6±1.1**	26.7± 5.9**
4	0	15	7.7±0.7	33.9±4.1	235.3±26.2
	100	8	6.1±0.5	27.5±3.9	164.3±23.1
	200	16	6.4±0.6	24.4±3.8	138.2±20.0**
	500	12	6.4±0.9	13.9±3.0***	84.8±17.0***

Statistical significance compared with control group;

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.01$

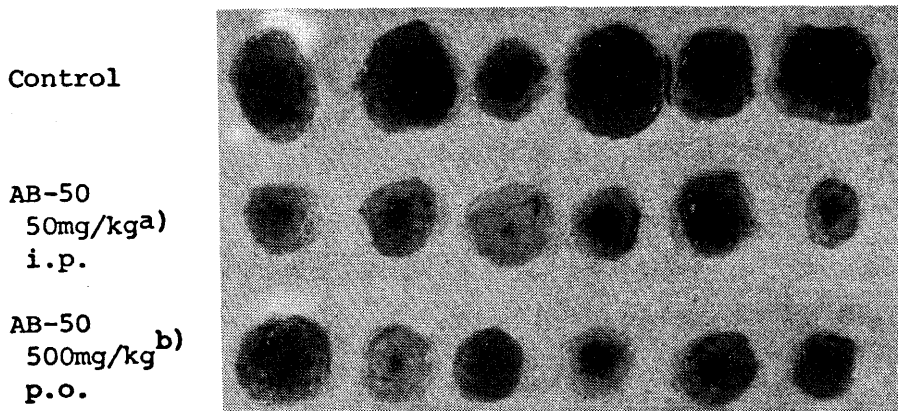


Fig. 6. Effect of AB-50 on Passive Arthus Reaction in Guinea Pigs

- A dose of 50mg/kg of AB-50 was given intraperitoneally 15 min before subcutaneous injection of antigen (1 mg).
- A dose of 500mg/kg of AB-50 was administered 30 min before antigen challenge.

Photograph shows hemorrhage observed on the inside of the skin 5 hr after antigen injection.

第3編 総括

数十種のアミノ安息香酸誘導体について、加温溶血反応および免疫溶血反応に対する作用を検討した結果、bis(salicylamido) benzoic acid類が両反応を顕著に阻害した。その後、bis(salicylamido) benzoic acid類は、肥満細胞膜に対しても安定化作用を示し、Compound 48/80による細胞外へのヒスタミン遊離を阻害し、このような作用にもとずき、ラットHTAによるPCAに対して顕著な阻害作用を示すことが判明した。さらに経口投与で有効な化合物を見つけ出すために、bis(salicyl-

amido) benzoic acid の関連化合物について検討を加えた結果、AB-23 のジアセチル体である AB-50 が、経口投与でもっとも強い PCA 阻害作用を示した。しかし、AB-50 はヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなどの化学伝達物質に対する直接拮抗作用や抗炎症作用は有さない。AB-50 の生体内での活性型と考えられる AB-23 は Compound 48/80 やデキストランによるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離、および IgE-抗 IgE complex によるラット肥満細胞の脱顆粒現象、あるいは HTA による腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離を阻害した。このように、AB-50 の作用様式は D S C G のそれとかなり類似していることが判ったが、D S C G とは異なり AB-50 は経口投与でも効果を発揮し、その上、D S C G が無効である IgG 様抗体による PCA に対しても顕著な阻害作用を示すという新しい特徴を有している。さらに大きな特徴は抗補体作用を有していることであり、抗腎抗体によるラット腎炎やアルサス反応に対する AB-50 の阻害作用は、抗原抗体反応に引き続いて起る補体の結合連鎖反応あるいは活性化反応を防止することによるものと思われる。

以上のごとく、AB-50 は広い作用スペクトラムを有する内服可能でユニークな抗アレルギー剤であることが判明した。

論文の審査結果の要旨

経口投与でも有効な抗アレルギー剤の開発をめざして一連のアミノ安息香酸誘導体を合成し、2, 4-Bis(2-Acetoxybenzamido) Benzoic Acid が有効であることを認めた。さらに、何故有効かを加温溶血反応、免疫溶血反応、ヒスタミン遊離作用等から追跡し、内服可能でユニークな抗アレルギー剤の研究方法を確立した。

よって、学位論文として価値あるものと認めた。