

2 INAH の体内変化に関する研究 (第1報)

INAH の定量法及び体内分布について

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)

薬学科長 岩本 多喜男

緒 言

イソニコチン酸ヒドラチド (以下 INHA と略す) が抗結核薬として登場 (1952年) して以来、INHA に関する臨床的研究は勿論、基礎的研究も亦多数発表されている。著者は INHA が体内に吸収されてから排泄されるまでの間に、如何なる経路をへて如何なる変化を受けるかを追及せんとし、本研究を開始した。特に INAH が大量投与により種々の急性中毒を起すので、この点についての INAH の生体内分布の実験的研究の結果からその機構を解明せんとした。

INAH の生体内分布並びに吸収、排泄を見るためには INAH の生体内定量を行わなければならない。然るにこの方法について現在までに報告されているものは、何れも血液及び尿中の定量法であつて、臓器や組織中の INAH の定量法については、僅かに Roth¹⁾ 等が Isotope を用いて測定したもの等一、二にすぎない。それ故先ず組織内 INAH の定量法を確立することが必要である。

著者は化学的定量法について数種の方法につき追試を行い、臓器や組織中の INAH を系統的に定量し且つ同時にその分解産物であるイソニコチン酸 (以下 INA と略す) 及びヒドラチンをも分別定量する方法を確立せんとした。

かくてこの方法により INAH 及び INA 等の体内分布を検討するため、INAH を動物に注射して急性中毒を起さしめ、一定時間毎に血液・尿を採取して検索を行い、又各臓器を摘出して定量した。又肝臓において INAH が如何に捕捉されるかを検討するため、猫の肝臓による灌流実験を行つた。

実験方法及び成績

I INAH の定量法の検討

INAH の定量法で現在迄に発表されているものは第1表に示す通りである。

このうち著者は 1～3 の方法を詳細に追試した。他の方法についてはなお検討中であるが、何れの方法も原法通りでは満足な結果が得られないことを知つた。そこで種々検討した結果第10図及び第11図の如き方法を確立した。1～3 の方法を図示すれば次の如くなる。

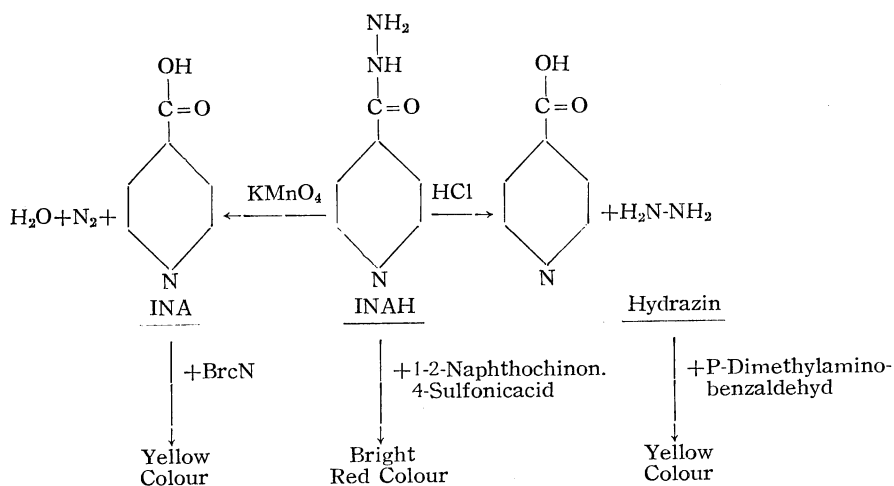
各方法の基礎的実験方法と成績は次の通りである。

1. P-Dimethylamino-benzaldehyd 法

検体 1～3 cc をとり、これに硫酸アンモン 3.2g 及び 0.5N-NaOH 1cc を加え、20% イソアミルアルコールエーテル混液と共に 10～30 分間振盪し、遠心分離して有機層 30cc をとり、これに 0.1N-HCl 4 cc を加えて 5 分間振盪

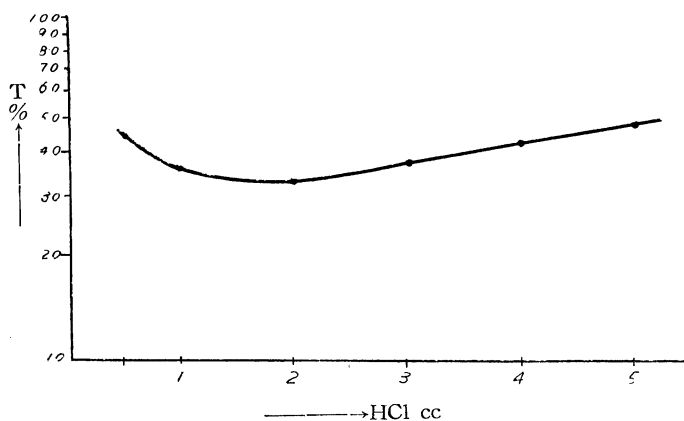
第 1 表 INAH の 定 量 法

番号	方 法	著 者
1	P-Dimethylaminobenzaldehyd 法	Kelly, Poet ²⁾
2	Brom-cyan 法	Rubin, Mueller ³⁾
3	1-2-Naphthochinon-4-sulfonicacid 法	青木, 掛見 ⁴⁾
4	磷モリブデン酸法	小沢, 清本 ⁵⁾
5	Salicylaldehyd+FeCl ₃ 法	青木, 寺井 ⁶⁾
6	1-Chlor-2-4-Dinitro-benzol 法	Scott ⁷⁾
7	Isotope (C ¹⁴) による法	Roth, Manthei ¹⁾
8	Volumetric Methode	Harting ⁹⁾
9	Polarograph による法	館 ⁸⁾
10	微生物学的定量法	Tabenken, Dolan ¹⁰⁾
11	K ₃ Fe (CN) ₆ +HAc 法	Jacobs ¹¹⁾



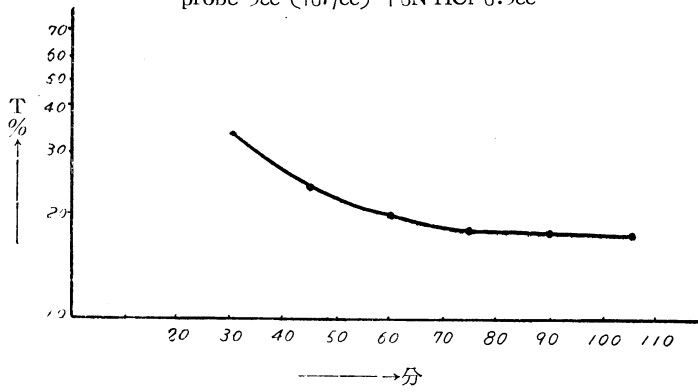
遠心分離後酸性層をとり、6N-HCl 0.5cc 及び本試薬 (P-Dimethylamino-benzaldehyd) 1.2g を無水アルコール 20 cc とにかし、12N-HCl 2 cc を加える。用時調製) 1cc を加えて重湯煎上 100°C 45 分間加熱放冷後 0.1N-HCl を加えて 4cc とする。これを比色管に入れて光電比色計によりその黄色を比色する (フィルター 460m μ)。

第 1 図 塩酸添加量と透過率
probe 5cc (10r/cc), 6N-HCl 添加 全量 10cc



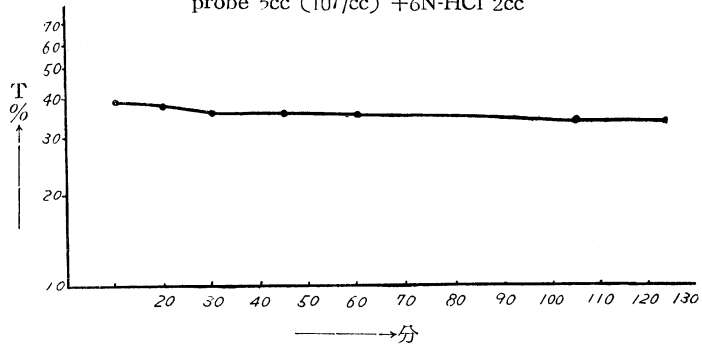
第2図 加熱時間と透過率

probe 5cc (107/cc) + 6N-HCl 0.5cc



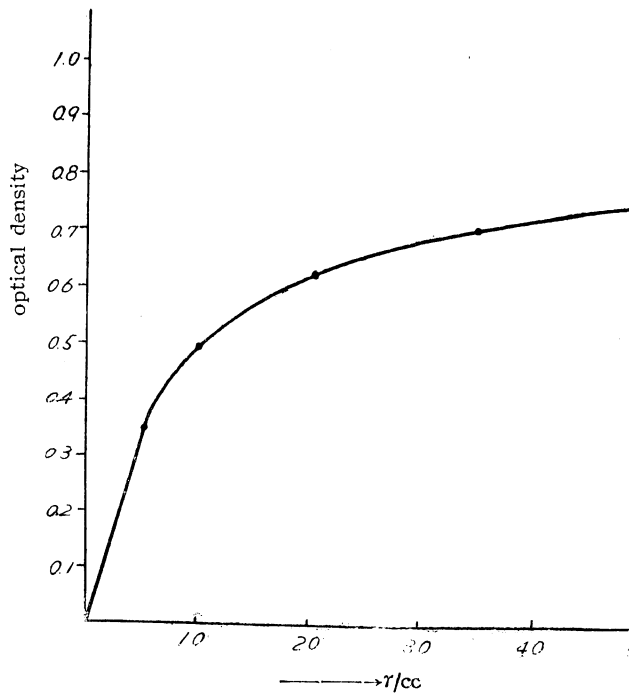
第3図 反応後の経過時間と透過率

probe 5cc (107/cc) + 6N-HCl 2cc



第4図 INAH 検量曲線

0.1N-HCl 10cc + 6N-HCl 1cc + P.D.A.B 1cc



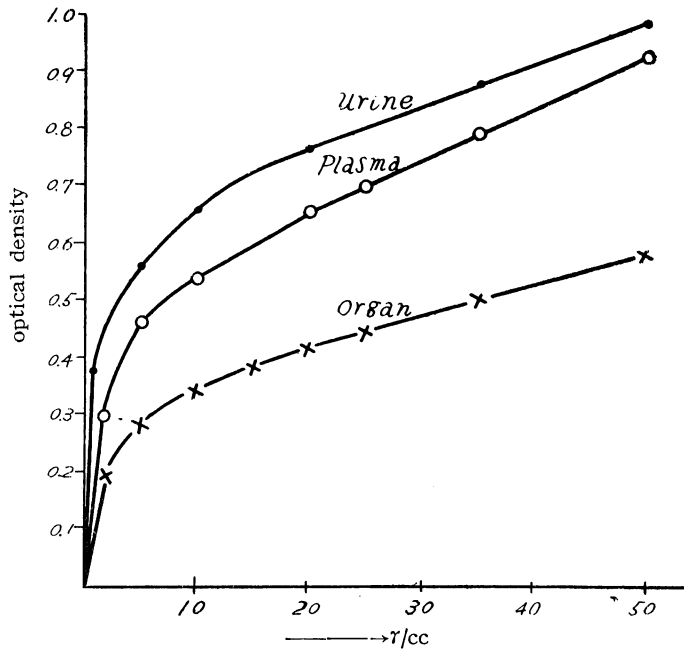
この方法で先ず INAH を加水分解する時の鹽酸濃度を検討した。

その結果は第 1 図の通りで、6N-HCl を用いる場合は 2cc を使用する時最大の吸光度を示した。

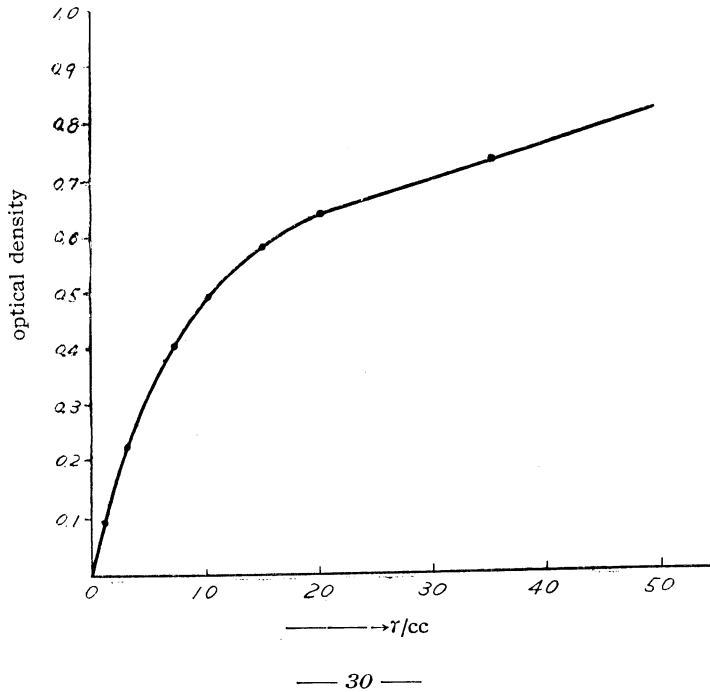
次に加熱時間と吸光度の関係は第 2 図に示す如く、加熱 1 時間ではほぼ最大に達し、以後の変化は緩慢であつた。又加熱後の時間経過と吸光度の関係は第 3 図の如く、漸次吸光度は大となるが甚だしい変化は見られなかつた。

ついで標準検量曲線を作製した。

第 5 図 urine, plasma, organ の検量曲線



第 6 図 ヒドラチンの検量曲線



まずブランクとして0.1N-HClに純 INAH の結晶をとかりて夫々 1~50r/cc の溶液 7 本をつくり、0.1N-HCl のみのブランクを加えて計 8 本を前記の抽出操作を除いて処理して比色した。

その結果は第 4 図の通りで大体比色定量法として応用出来ることを知った。

次に、尿・血漿及び肝等について検量曲線を作製した。

尿・血漿はダングステン酸ソーダと硫酸で除蛋白し、肝は摘出後同量のリンゲル液と共に Homogenate としたものを検体とした。

この成績は第 5 図の通りである。

検体を加水分解せずに、そのままこの方法を用いて検体中の遊離ヒドラチンを定量するために、別に塩酸ヒドラチンを肝臓 Homogenate に加えて検量曲線を作製した。

この結果は第 6 図の通りである。

以上の方法で妨害物質となるものは、ウロビリノーゲン、アミノ糖類、バス、チピオン等があるので、これ等が多量存在する場合はこの方法は正確な結果を示さない。

2. Brom-cyan 法

検体 2cc をとり 16cc の蒸留水を加えて第 7 図の如き特殊試験管に入れ、更に 10% タングステン酸ソーダ 1cc 及び $\frac{2}{3}$ N-H₂SO₄ 1cc を加えてはげしく振盪する。

試験管を 90~100°C の重湯煎に入れ、最初の 5 分間は絶えず、後の 5 分間は時々振盪して計 20 分間加熱する。この間 Glass Bulb で試験管をかぶせておく。次で冷水中に入れて急冷し遠心分離する (2,000 回転、5 分間)。上壁にくっついた粒子をとり除くために試験管を机上でこつこつ叩く。再び 5 分間遠心分離する。上層部 15cc をとり 50cc のビーカーに入れ、40% KMnO₄ を滴下してピンク色がはつきりつくまで入れる。低温 (50°C 以下) で約 5cc になるまで蒸発する。この間もしピンク色が消失すれば KMnO₄ 液を追加する。

次に 1% l-アスコルビン酸溶液をピンク色の消えるまで滴下する。この液を重湯煎上に蒸発乾固してこれに 0.2% K₂HPO₄ 溶液 4cc を加え、Rubber-Policeman (ガラス棒の先にゴム管をつけたものでよい) ではげしくビーカーの壁をこすり、イソニコチン酸液を得る。これを小遠心沈殿管に入れ 5 分間 1,500 回転で遠心分離し透明な上澄 2cc をとり比色管に入れる。

比色する際はアンモニアバッファー (K₂HPO₄ 87g, NH₄Cl 107g を 500cc の水にとかし、28% NH₄OH 6.7cc を加え、更に水を注加して全量 1,000cc とする)、2cc を加えて混和する。これに 10% ブロムシアン 5cc を加えて栓をして、すばやく混和する。415m μ のフィルターを用いて生じた黄色を比色する。ブロムシアンを加えてから 2 分乃至 2 分半で最高濃度を示す。

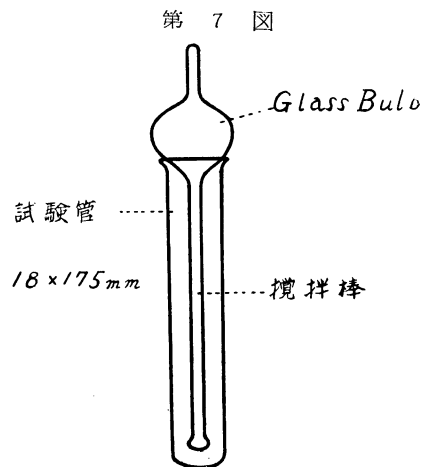
この方法を用いて標準検量曲線を作製した結果は第 8 図の通りである。

この方法はかなり鋭敏であるが、体内中に存するイソニコチン酸 (分解して生じた) 及びニコチン酸 (イソニコチン酸として 0.1mg% 乃至 0.2mg% 存在する) をも同時に測定する。

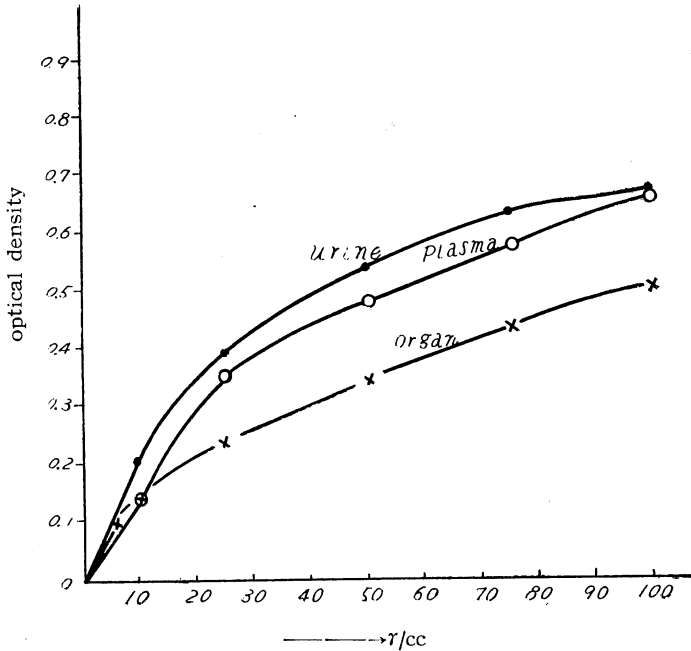
そこでイソニコチン酸は体液を KMnO₄ で酸化する前に定量し、INAH を酸化して後定量した値から差引くことによつて INAH のみを定量した。

又 KMnO₄ 処理後 MnO₂ が生成して液がやや着色する欠点があり、常にブランクテストをしなければならぬ。

もう一つの欠点としては、ブロムシアンは極めて有毒であり且つ皮膚や眼粘膜を刺戟するので



第 8 図 プロムシアン法による検量曲線



危険であり及扱いに注意を要することである。

3. 1-2-Naphthochinon-4-Sulfonicacid 法

1% 硫酸カリを10%の割合に血液に加え、血漿 1cc をとり水 8.8cc を加え、次に N-HCl 0.1cc を加えて時々振盪する。3分後 N-NaOH 0.3cc を加えて攪拌し氷水中で冷却し、0.2%の本試薬 (0.2%水溶液) 0.1cc を加えて攪拌後直ちに遮光し、氷水中に入れて30分放置後2分以内に吸光度を測定する (フィルター460 μ)。

次に別の血漿 1cc に水 6.8cc を加え N-HCl 0.1cc 及び M/100 NaNO₂ 2cc を加え時々振盪し、3分後 N-NaOH 0.3cc を加えて攪拌し、氷水中に冷却後、本試薬 0.1cc を加えて遮光し、再び氷水中30分冷却後比色する。

前に測定した吸光度からこの値を差引き、その差を求めて標準検量曲線により INAH の測定をする。この曲線は第9図の通りであつた。

本法は除蛋白を行わず、又アミノ酸に対しても呈色するので上記のようにその都度空検を行わなければならない。即ち NaNO₂ により INAH を分解してその他の発色物のみを残しブランクとしたわけである。

又この際イソニコチン酸、ヒドラチン、ニコチン酸等は発色しないが、チピオン、パスでは発色する。

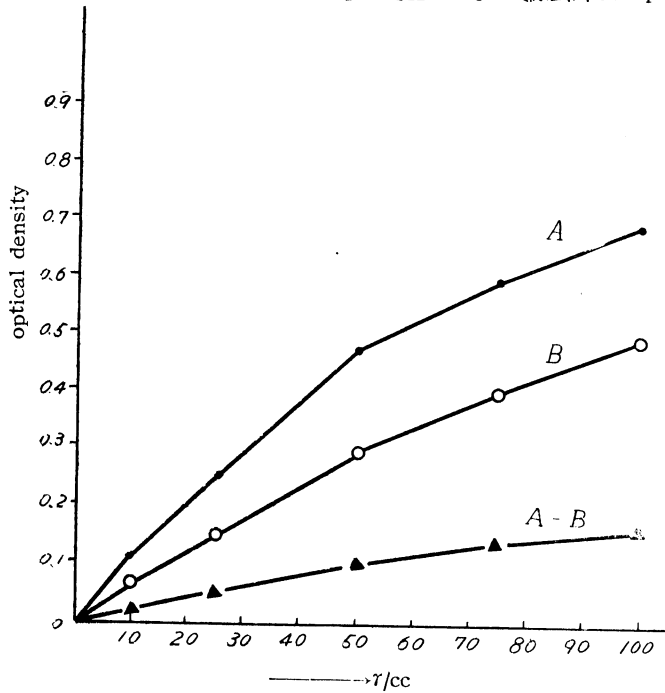
そこでこれを改良するために除蛋白を行つたところ、結果は良好で空検を要しない場合が多かつた。

以上の諸方法を追試検討した結果、尿・血漿及び臓器中の定量法として第10図及び第11図に示した方法が最も良好な成績を示した。

この際、尿・血漿と臓器を別法にした理由は前者が硫酸々性のタングステン酸ソーダで除蛋白され、同時に抽出されるに対し、後者はこの方法では抽出されないから20%イソアミルアルコールエーテル混液で抽出したからである。又第11図のプロムシアン法で INAH を比色定量する際の液の PH が重要で PH 8.2 にすることが必要であつた。

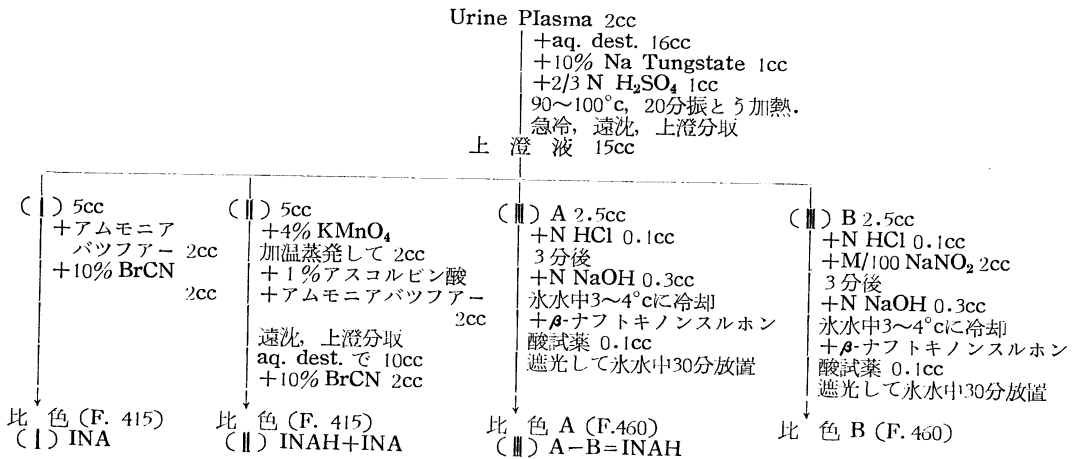
第 9 図

A: NaNO₂ で処理せぬもの B: NaNO₂ で処理したもの (除蛋白した plasma)



第 10 図

Colorimetric Estimation of INAH and INA (I)



第 11 図

Colorimetric Estimation of INAH and INA (II)

Organ Homogenate 2g
 + 硫酸 3g
 + 1/2 N NaOH 1cc
 + 20% Isoamyl ether 30cc
 30分振とう, 5分遠沈
 有機層 20cc
 + 0.1 N HCl 8cc
 5分振とう, 分液
 塩酸層 8cc

(I) 2cc +アムモニア バッファ- 4cc (pH 8.2) +10% BrCN 2cc	(II) 2cc +4% KMnO ₄ 加温蒸発して 1cc +1% アスコルビン酸 +アムモニアバッファ- 4cc 遠沈、上澄を分取 aq. dest. で 15cc +10% BrCN 2cc	(III) A 2cc +N NaOH 0.6cc 氷水中3~4°Cに冷却 +β-ナフトキノンスルホン 酸試薬 0.1cc 遮光して氷水中30分放置	(IV) B 2cc M/100 NaNO ₂ 2cc 3分後 +N NaOH 0.6cc 氷水中3~4°Cに冷却 +β-ナフトキノンスルホン 酸試薬 0.1cc 遮光して氷水中30分放置
比色 (F. 415) (I) INAH	比色 (F. 415) (II) INAH+INA	比色 A (F. 460) (III) A-B=INAH	比色 B (F. 460)

II INAH 及び分解産物の体内分布

実験動物として体重2~3kgの猫を使用した。INAHのリンゲル溶液を250mg/kg宛股静脈から注射し、一定時間毎に採血、採尿した。又各臓器は夫々異つた猫を用いて一定時間毎に屠殺し摘出して定量に供した。

尿及び血漿中の INAH は第10図の方法で定量し、イソニコチン酸は検体を酸化する前にブロムシアン法で定量した。又遊離ヒドラチンは検体を塩酸で分解する前に定量した。

臓器については第11図の方法で定量した。これ等の定量結果は第2表の通りである。

第2表 INAH の体内分布

時間	器 官	血 漿	肝 臓	腎 臓	脊 髄	肺 臓	大 脳	尿	備 考
5分		220	90	87	73		53		不 安
		1.0							
15		106	92	120	90	96	120		痙れん発作
		1.0							
30		87	132	163		140	168		痙れん最高
		1.7	1.2	1.1		1.2	1.2		
45		125	190	135		176	142	18	硬 直
		1.8	1.2	1.1		1.5	1.5	1.7	
60		106	43	80		92	91	52	死 後
		2.0	1.4	1.3		1.7	1.7	3.0	
ルミナル 50mg/kg 投与		37	9		3		27		INAH 75mg/kg 静注、死後

(註) 各欄の左上数字は INAH, 右下数字はイソニコチン酸を表わす。単位 r/cc 又は r/g。

これによつて見ると、INAHの血中移行及び体内各臓器への移行は極めて早く且つ短時間に高濃度に達することがわかる。即ち肝、腎、脊髄、大脳等には既に注射後5分で現われ、漸次高濃度となり、約30分後には夫々最高濃度に達する。肝では45分で190r/cc、腎では30分で163r/cc、肺では45分で176r/cc、大脳では30分で168r/ccの濃度を示した。

分解産物であるイソニコチン酸の濃度は各臓器共極めて低く、時間と共に多少は増加するが、1時間後で2r/cc程度であつた。

尿中の INAH 及びイソニコチン酸は極めて少く、急性中毒の場合は得られなかつた。

又遊離ヒドラチンは、どの場合も殆んど證明出来なかつた。なお急性中毒の場合、注射後約30分で INAH 特有の中樞性痙れん又は間代性痙れんの発作を見るが、この痙れんを鎮静する目的でルミナルを注射した一例では、INAHの体内濃度は他の場合に比べてやゝ低目であつた。

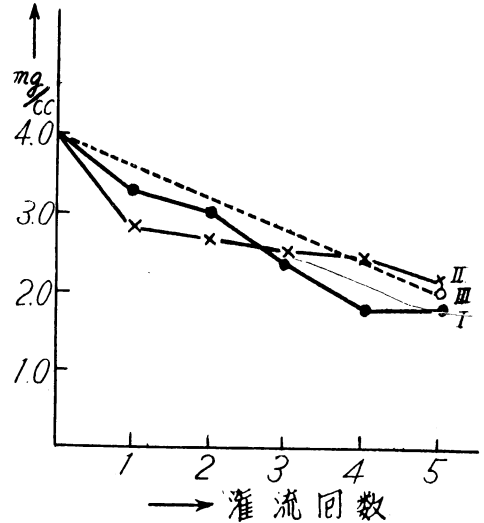
III 猫肝臓灌流実験

健康な猫の肝臓を摘出し37°Cの恒温槽中に懸垂し、門脈から0.4%のINAHリンゲル溶液120ccを1回約10分を費して5回灌流せしめた。

1回毎の灌流液（これは次第に黄色を帯びてくる）の一部を採取してINAHを定量した。同様の実験を3回繰返した定量結果は第12図の通りである。

3回の実験結果INAHの濃度は何れも原濃度の約 $\frac{1}{2}$ 以下となつた。この最後の灌流液を動物実験により毒性の変化を調べた所、毒性は原液の約 $\frac{3}{4}$ であつた。

第12図 INAHの猫肝臓灌流実験



總括並びに考按

著者はINAHの体液中及び臓器中の定量法を確立し、これを以てINAHの体内分布の状態及びその肝捕捉の状態を明らかにしたが、INAHの毒性の本態については未だ疑義がある。即ち松家、山本¹²⁾はINAHの急性中毒による種々の症状を観察した際、最も顕著な中毒症状である中枢性痙攣は、200mg/kg静注の場合、注射後30分で発作し約30分間継続すると述べている。これを著者の実験結果と比較すると、INAH注射後約30分で各臓器共最高濃度に達することで一応説明がつくが、急速に大脳にも移行することから見て、INAHそのものがこの痙攣を起すと考えることはいささか疑問である。

又猫肝臓灌流実験において、最後の灌流液のINAH濃度は原液の $\frac{1}{2}$ 以下であるにも拘らず、その毒性は $\frac{3}{4}$ しか低下しない点を考え合せて、INAHの毒性はINAHそのものでなく、INAHの分解産物乃至は抱合物質で、INAHより更に毒性の強い物質により惹起されるのではないかと考えられる。この物質がINAHの分解産物であるイソニコチン酸やヒドラチンでないことは既に松家及び山本の報告¹²⁾によつて化学的にも薬理学的にも確められている。即ち未知の有毒物質であると推定すべき可能性が大きい。著者もこれについて今後探求するつもりである。

なお分解産物のイソニコチン酸は、INAHの少量投与の際に尿中に多量に排泄されるとRitter等¹³⁾が述べているが、著者の急性中毒実験では極めて少量しか認められなかつた。

INAHの体内変化物質については、その後二、三の報告¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾があるが、著者¹⁷⁾も又数種の変化物質を認めたので近く報告する予定である。

結 論

1. INAHの体液中並びに臓器中の定量法につき検討し、INAH並びにその分解産物であるイソニコチン酸及びヒドラチンを分別定量する系統的方法を確立した。
2. INAHの急性中毒の際においてINAH及びその分解産物が生体内に移行分布される状態を明

らかにした。

3. 肝臓灌流実験により INAH が肝に捕捉される状況を観察し興味ある結果を得た。
4. INAH の毒性の本態は INAH 自身の毒性でなく、INAH の分解乃至抱合産物であることを推論した。

この研究の一部は、北海道結核対策委員会 INAH 小委員会の研究として行つたものである。この報告の要旨は薬学雑誌¹⁸⁾に発表した。

この研究の機会を与えられた中村豊所長並びに厚生省北海道医務出張所長有末四郎博士に御礼申上げる。又終始御指導を賜わつた札幌医大薬理学教室田辺教授に深謝の意を表する。

文 献

- 1) Roth, Manthei : Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 81, 566 (1952)
- 2) Kelly, Poet : Am. Rev. Tuberc., 65 (4) (1952)
- 3) Rubin. Mueller : Diseases of Chest, 21, 439 (1952)
- 4) 青木 : 最新医学, 7, (6) (1952)
掛見 : 診断と治療, 昭和27年10月号
- 5) 小沢, 清本 : 薬学雑誌, 72, (8) 1059 (1952)
- 6) 青木, 寺井 : 医療, 6, (11) 63 (1952)
- 7) Scott : J. Pharm. & Pharm., 4 (10) (1952)
- 8) 館 : 化学の領域, 6 (8) 42 (1952)
- 9) Harting : J. Am. Pharm. Assoc., XIII, (5) 323 (1953)
- 10) Tabenken, Dolan : Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 80, (4) 613 (1952)
- 11) Jacobs : J. Am. Pharm. Assoc., Scient. Edt. June, 346 (1953)
- 12) 松家, 山本 : 日本薬理学会雑誌, 43, (3) § 165 (1953)
- 13) Ritter, Dreker : Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 79, (4) (1952)
- 14) 小沢, 清本 : 医学と生物学, 27(3) 110 (1953)
- 15) 伊藤 : 生化学, 25 (5) 338 (1953)
- 16) Hughes : J. Pharm. & Exp. Ther., 109 (4) 444 (1953)
- 17) 岩本 : 日本薬学会第74回年会で発表 (1954)
- 18) 岩本 : 薬学雑誌, 74, (1) 36 (1954)