

T B1-698 の吸収及び排泄について

名古屋市立大学薬学部

木下彌兵衛・森山 繁隆・米沢 久夫

名古屋大学医学部 内科第一講座

近 藤 九・水 野 厚 生

(昭和 26 年 8 月 7 日受付)

TB₁-698 (以下 TB₁ と省略) の体液中の定量法に関しては既に R. Pehnisch¹⁾ Ingeborg. u Heilmeyer²⁾, O. Wollenberg³⁾, Wernits⁴⁾, 青山・岩山⁵⁾氏等により報告せられているが、著者等は TB₁ の血中濃度及び尿中濃度の測定を種々試みた結果可成り満足せられる方法が得られたので報告する。その方法は O.Wollenberg. の行つたデアゾ化法を基礎として試みたもので TB₁ の脱アセチル化及び Coupling の方法を稍々異にしている。O. Wollenberg の方法によれば尿及び血清中の TB₁ はまず p-Toluene Sulfonic acid. を使用して脱アセチル化を行い Phenyl- α -naphthylamine と Coupling させてその呈色度を測定するのである。著者等は血清中の濃度測定では、血球中の TB₁ の量が無視されており、又時間的に数回、同一人から採血する為血清ではかなり多量の血液を必要とする点から全血液中の TB₁ の測定を種々試みた結果血液中の蛋白の量が極めて多いため、TB₁ を酸によつて簡単に脱アセチル化しようとしても、その前に蛋白の凝固が起つて TB₁ が吸蔵せられ、あるいは常法によつて三塩化醋酸を使用して除蛋白を行つても、その洗滌の中に TB₁ が吸蔵せられ、いずれの場合でも甚だ低い値しか得られないので、塩酸と長時間加熱煮沸して TB₁ だけでなく蛋白もその大部分を加水分解して可溶性のアミノ酸として吸蔵による障害を除いた。又 Coupling には 1-(β -Diethylamino-ethylamino)-naphthaline を使用した。すなわち TB₁ を含有する血液を濃塩酸と煮沸して TB₁ の脱アセチル化を行うと同時に血中の蛋白の大部分をアミノ酸とした後、TB₁ の脱アセチル化によつて生じた。アミノ基を亜硝酸でデアゾ化し、1-(β -Diethylamino-ethylamino)-naphthaline を加えて発色させ光電光度計を使用して測定した。この方法によると、TB₁ は 1 ml 中 0.03 γ まで定量することができる。以下著者等の血中及び尿中濃度測定法並びにその説明及び検討の結果をのべる。

測 定 法

1) 血液：血液 0.5 ml を還流冷却器を摺り合せとしたフラスコ中にピペットで正確に取り、これに 20% 塩酸 5ml を加えて約 8 時間煮沸を続けて加水分解した後、こ

の液をメスフラスコ中に移し、水を加えて全量を 10ml とする。次にこの液を遠心分離して、その上澄液を 4ml ずつ二本の試験管にとりこの各々に水 10ml ずつ加える。この二つの液にそれぞれ 0.5% 亜硝酸ソーダ溶液 0.5ml を加えて室温で約 20 分間よくふりまぜてから尿素の飽和溶液 3 ml を加えて、再び気泡が出なくなるまでふりまぜた後に、一方の液には水 1 ml を加えて対照試験液とし(これを第一液とする)、他方の液には 0.1% 1-(β -Diethylamino-ethylamino)-naphthaline oxalate 溶液 1 ml を加えてよくふりまぜて発色させた後(これを第二液とする)30分以上経てから、第一液と第二液との光の透過率を比較する。この測定には EPO-A 型光電光度計(日立製作所製)を使用しフィルターは橙色の 600m μ のものを用い液層は 30mm の槽によつて行つた。この槽に各対照試験液(第一液)と被検液(第二液)を入れて絞りを調節して第一液の透過率を 100% とした後、第二液の透過率を求める。ここに得られた第二液の透過率の値と予め濃度既知の標準液から測定して算出された恒数 K (算出法後述)の値とによつて第二液の濃度が算出せられる。この算出する場合の第二液の透過率は実測した値に、次に述べる補正値を加算したものである。この補正値は TB₁ を服用させる前の同一人の血液を上記述べたのと同様に操作して得られた第一液と第二液の透過率の差である。

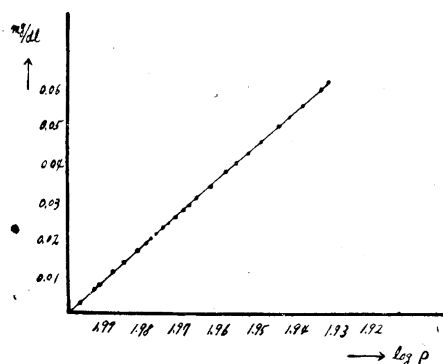
この値を測定した被検液の透過率に加算したものを被検液の透過率として濃度の算出に使用せねばならない。

濃度既知の標準液は次のようにして調製する。血液 2.5ml に 20% 塩酸 25ml を加えて、約 8 時間煮沸し、殆んど大部分の蛋白を加水分解した後、水を加えて全量を 50ml とし、更にこの液を遠心分離し、その上澄液を 4ml ずつ 10 本の試験管に取る。これと別に TB₁ 10mg を正確にとつて、20% 塩酸 10ml に溶解させた後、水を加えて 1 l とした液(1mg/dl の TB₁ を含む)の 20ml を取り、これに更に 20% 塩酸 50ml を加え、約 4 時間煮沸し脱アセチル化した後、全量を水にて 100ml とした液(1ml 中 0.002mg)を調製し、この液を 0.2ml, 0.4ml, 0.6ml, ……2.0ml と順次に前の 10 本の試験管に加え各々を水で全量 14ml とし、この 10 種類の濃度の液を上

に述べた方法によつてジアゾ化し、Coupling させて発色させ、その透過率を測定してKの値を求める。

このKの算出は Lambert u Beer の法測により $\frac{\log P_0}{\log P} = KC$ より得られる。Po は絞りを調節して透過率を 100 としたもので、P はその時の実測した透過率に補正値を加算したもの、C は濃度とすると K はその溶液についての恒数である。従つて標準液の透過率を測定してKの値を算出して透過率と濃度の関係のグラフ(第1図)を作製しておくで濃度の算出に便利である。

第1図 透過率と濃度の関係



2) 尿：尿中 TB₁ の排泄はかなり多量なるが故にその方法も上記方法を簡易化して行つた。尿1 mlを採りこれをメスフラスコにて水を加えて 10ml とし 10 倍稀釈となしたものの二つ作り、その各々に 20% 塩酸 2ml を加え 30 分水浴中で加水分解し、冷後水で 14ml に補正し後上記方法で一方を対照試験液となし他方を被検液となし同時に発色させた TB₁ 標準液 (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, ……1.0…2.0mg/dl) と 30 分後、ワルボール氏比色計を以て測定する。而して標準液の調製は上記に準ずるので省略す。

説明及び検計

血中の全 TB₁ 量の約 70~75% が蛋白中に吸蔵される場合があるから、血液中 TB₁ 全量による呈色が現われないので甚だ低い結果しか得られないことを知つた。著者等はこの点を考慮して TB₁ の脱アセチル化のみならず、血中の蛋白も共に加水分解する方法を採つた。しかしこれに使用する酸の濃度が低いと加水分解に非常に長時間を要するから塩酸が常圧で約 20% のとき恒沸点を示すことより 20% 塩酸を加えて長時間煮沸することとした。

加水分解に要する時間は次の方法により分解液のアミノ窒素を測定し、最大値を示す時間を求めた。すなわち血液 1.5ml に 20% 塩酸 15ml を加えて煮沸し、1, 2, 5, 10, 20 時間毎に室温に冷却したものをそれぞれ 1 ml ずつ取り、これをメスフラスコにて水を加えて 10ml としたものを 2ml 取り van Slyke 法によつてアミノ

窒素を定量した。又同様に血液 2.5ml に 20% 塩酸 25ml を加えて煮沸し、5, 8, 10, 12, 15 時間毎に室温に冷却してそれぞれ 1 ml ずつとり、アミノ窒素を定量した。この結果約 8 時間で略々一定の値を示しそれ以上の時間を加水分解してもアミノ窒素の量の増加は極めて少いから蛋白の大部分が加水分解されるものと認めた。

ジアゾ化の場合に約 20 分間は必ずふりませなければならない。TB₁ だけであれば亜硝酸の消費も少く、これに要する時間も短かくてすむが血中の蛋白の加水分解によつて生じたアミノ酸もまた亜硝酸を消費するから充分に反応させるためには過剰の亜硝酸ソーダを加えてよくふりませなければならない。

ジアゾ化に要する亜硝酸ソーダ溶液の最少必要量は次のように定めた。上に述べたようにして調製した 1 ml 中 0.0006mg の TB₁ を含む血液の加水分解液について、前記の測定法と同様に操作して、0.5% 亜硝酸ソーダ溶液の量だけを 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7ml と順次に変化させてジアゾ化して、Coupling させて現われた色相を比較すると亜硝酸ソーダ溶液の量が 0.05ml より 0.5 ml に増加するに従つて呈色が次第に濃くなり 0.6ml 以上になつても 0.5ml の場合と大体同じ程度の色相であつたから最少必要量を 0.5ml と定めた。この量は実際には過剰量であるが反応をなるべく早く完結させるには、これ位の量が必要である。

ジアゾ化の後に過剰の亜硝酸は尿素によつて除去するが、この亜硝酸と尿素の反応は室温では徐々にしか進行しないから注意して、はげしくふりませて窒素の気泡が出ないことを確めなくてはならない。あるいは尿素の代りにスルファミン酸の溶液を使用すると短時間で亜硝酸の除去が出来る。

所定の通りに操作するとこの場合、液は、pH 1.5~2.0 である。この程度の液性で 1-(β-Diethylamino-ethylamino)-naphthaline を Coupling させると発色が鮮やかな紫色となり鋭敏である。pH 値が大きい溶液では甚だ不鋭敏である。

この Coupling に使用する試薬は修酸塩として合成し保存するが、この結晶は時日を経ると帯赤紫色に着色し、又水溶液も着色するから、特に溶液としては長期の保存に耐えない。著者等は使用直前に合成し、精製して溶液としたものを使用した(この合成法は後述)。

TB₁ を脱アセチル化して、ジアゾ化してから、1-(β-Diethylamino-ethylamino)-naphthaline を Coupling させる時、この試薬を加えてから 30 分の間は次第にその色相が濃くなり、約 30 分の後には一定となるから呈色の測定は 30 分後に行わなくてはならない。しかし必要以上に時間を経過させることは避けねばならない。長時間の後にはまた試薬が変化し、色相が赤味を帯びるようになる。

第1表 血液中 Tb_1 の検出

採取 Tb_1 量 mg.	1 ml 中の Tb_1 mg	透過 率	Kの 値	検出 Tb_1 量 mg	1 ml 中の Tb_1 mg	誤 差	採 血 時 間 mg/dl	
1	0.0004	0.000029	99.3	26.5	0.00039	0.000028	-0.00001	0.2
2	0.0008	0.000057	98.5	"	0.00082	0.000059	+0.00002	0.4
3	0.0012	0.000086	97.9	"	0.00115	0.000082	-0.00005	0.6
4	0.0016	0.000114	97.1	"	0.00160	0.000114	± 0	0.8
5	0.0020	0.000143	96.4	"	0.00199	0.000142	-0.00001	1.0
6	0.0024	0.000171	95.7	"	0.00238	0.000170	-0.00002	1.2
7	0.0028	0.000200	95.0	"	0.00279	0.000199	-0.00001	1.4
8	0.0028	0.000200	95.0	"	0.00279	0.000199	-0.00001	1.4
9	0.0032	0.000229	94.2	"	0.00324	0.000230	+0.00004	1.6
10	0.0032	0.000229	94.3	"	0.00318	0.000227	-0.00002	1.6
11	0.0036	0.000257	93.6	"	0.00358	0.000256	-0.00002	1.8
12	0.0036	0.000257	93.6	"	0.00358	0.000256	-0.00002	1.8
13	0.0040	0.000286	92.9	"	0.00400	0.000286	± 0	2.0
14	0.0040	0.000286	92.9	"	0.00400	0.000286	± 0	2.0
15	0.0044	0.000314	92.2	"	0.00442	0.000315	+0.00002	2.2
16	0.0048	0.000343	91.5	"	0.00482	0.000344	+0.00002	2.4
17	0.0052	0.000371	90.8	"	0.00522	0.000372	+0.00002	2.6
18	0.0056	0.000400	90.2	"	0.00560	0.000400	± 0	2.8
19	0.0060	0.000428	89.5	"	0.00600	0.000428	± 0	3.0
20	0.0064	0.000457	88.9	"	0.00636	0.000454	-0.00004	3.2
21	0.0068	0.000485	88.2	"	0.00680	0.000485	± 0	3.4
22	0.0072	0.000514	87.6	"	0.00718	0.000513	-0.00002	3.6
23	0.0076	0.000542	86.9	"	0.00762	0.000543	+0.00002	3.8
24	0.0080	0.000571	86.3	"	0.00798	0.000570	-0.00002	4.0

濃度既知の標準液について測定し補正した透過率と、これより得られたKの値及び測定によつて得られた濃度は第1表に示す。この値から濃度と透過率の関係をグラフで示すと第1図のような直線となる。

Tb_1 を含まない血液でも上に述べた測定と同様な操作を行うと僅かではあるが帯赤紫色を呈し、透過率は試薬を加えない時、すなわち第一液を100とすると、この場合の第二液は100より小さい透過率を示す。例えばこの第二液が92の透過率を示したとすると被検液や標準液の第二液の測定した透過率に試薬の着色による透過率の値すなわち $100-92=8$ を加算せねばならない。この補正を必要とする原因は血液の加水分解によつて生じたヒスチジン等が試薬と反応するのではないかと推定されるがこの点は更に研究を継続して明らかにしたい。なおこの測定法はスレフミン類やパスが共存すると妨害される。

尿中の測定は、 Tb_1 の含有量が高い。

から、その操作は簡単である。著者等は始め塩酸を以て加水分解して濃褐色に着色した尿を、酸性白土を以て脱色及び除蛋白し遠心分離を行いその上澄液につき上記と同様方法で発色させ、Dubosk 氏比色計で比色定量したが、この際50%以上、 Tb_1 が吸蔵されるため可成りの誤差を認める為、次に発色させた色素を Amylalkohol に転溶させ、Amyl 層又は水層を比色せんとしたが、Amyl 層への転溶率が時間的に一定せず又その時使用する試薬自身にてもかなり転溶率に差がある為、以上の方法を中止し、ワルボール氏比色計を使用した。これはかなり正確で誤差範囲も少い。なお10倍稀釈尿を用いた理由は、10倍以下では加水分解後濃褐色となり比色が困難であり又10倍以上では誤差が大である。

1-(β -Diethylamino-ethylamino)-naphthalene Oxalate の製法：

この試薬の製法^{6) 7) 8)} は α -Naphthylamine Diethylamino-ethanole 各々 0.2mol をフラスコに入れてエーテルを加えて溶解し、塩酸ガスを飽和させる。エーテルを留去して、塩化石灰4g、臭化ソーダ4g、塩化第二銅2gを加えて175~181°Cで8時間加熱後、内容物を塩酸に溶解して、濾過し濾液を炭酸ソーダでアルカリ性にして、エーテルで抽出する。このエーテルを留去して残留物を減圧蒸留して190°Cで

留出する部分を集める。この3~4gを小さいフラスコに取り約1.5mlの無水アルコールに溶解し、これに修酸の無水アルコール飽和溶液を加えて振りまぜると修酸塩の結晶が析出する。次で傾瀉により母液を除き3回新しい無水アルコールで結晶を洗浄する。洗液は母液と合併して水浴上で静かに濃縮して結晶を取る。結晶は無水アルコールから再結晶を行う。修酸塩の純品は160°Cで熔融する。この際、修酸のアルコール溶液を過剰に加えると目的物の修酸塩に修酸が混入して分離が困難となる。

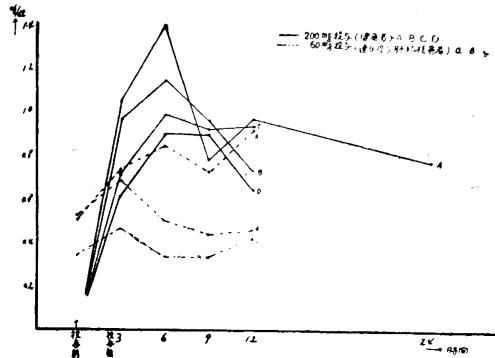
実験成績

上記方法を以て血液及び尿中の Tb_1 の濃度を測定した成績は下記の如くである。

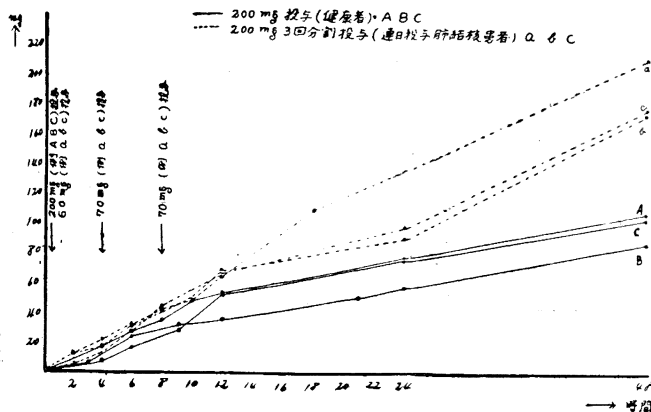
1) 血中濃度：我々はまず健康人4名(A, B, C, D)を選び、 Tb_1 200mgを1回に経口投与し3, 6, 9, 12, 24時間後にそれぞれ採血した。その成績は第2図に示す

通りで大体6時間で最高濃度に達し、その値は0.89~1.39mg/dlである。次に肺結核患者にして1日200mg連用、現在迄の投与量、60gの患者3名、(a, b, c.)を選び、試験量60mg(連日投与となつている200mgは1日3回分割投与とし一回の投与量は60,70,70mgである)を投与する。而して試験投与は連日投与法による最終投与後15時間で行つた。爾後3, 6, 9, 12時間後採血し、その濃度を測定するに第2図に示す通りあまり著しい動揺を示さず、0.46~0.91mg/dlの最高濃度を示す。しか

第2図 血中濃度



第3図 尿中排泄状況



し TB₁ の血中濃度はかなり個人差を生ずるようである。これは Ingeborg. u. Heilmeyer の成績、すなわち300mg 投与後、血清中濃度は4~6時間で0.3~0.6mgに達するとあるが、これより高い値が出ているが全血を用いた為であると思われる。

2) 尿中濃度：尿中濃度もまず上記健康人、A, B, C. を以て TB₁200mg を1回に投与後測定した結果は、第3図に示す通りかなり長時間排泄がつづき、24時間後28~38%, 48時間後、42~53%排泄される。次に上記結核患者、a, b, c. を以て、試験量200mgを、連日投与法による最終投与15時間後放尿させ、60mg、次いで4時間毎にそれぞれ70mg 2回合計3回分割投与して測定した結果は第3図の通りで、健康人のそれよりかなり高度に排泄される。しかしこれもかなり個人差をみとめる。尿に関しては O. Wollenberg より簡単な我々等の方法による成績も、O. Wollenberg の成績すなわち24時間後20~30%排泄され、48時間後40%前後排泄されるとあるのに近くそれより高い値が得られている。

文 献

- 1) Behnisch, Mietzsch, & Schnidt:
Am. Rev. Tuberc. 61: 1, 1950.
- 2) Ingeborg & Heilmeyer;
Arch. exper. Path. u. Pharmacol.
210: 424, 1950.
- 3) Wollenberg: D.M.W. 75: 899, 1950.
- 4) Wernits: Klin. Wschr, 28: 200, 1950.
- 5) 青山・岩山: 薬学研究, 23: 97, 1951.
日本臨床, 8; 801, 1950.
- 6) Stunzgaad: Chem. Zentralb, 1: 925
1941.
- 7) 津田: 薬学, 2: 34, 1948.
- 8) 下沢・吉田: 化学の領域, 2: 29, 1948.