

アゾトメトリーによるイソニコチン酸ヒドラゼド (INAH) の生体内運命に関する研究

第1報 INAH の生体内アセチル化について

那 須 義 則

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

大阪府立羽曳野病院

受付 昭和31年7月16日

緒 言

INAH の定量法については現在まで幾多の報告がなされているが、それらは比色法とガスメトリーに大別しうる。比色法としては、Kelly, Poet¹⁾の p-Dimethylaminobenzaldehyde 法、Rubin ら²⁾の Cyanogen bromide 法、青木ら³⁾、掛見ら⁴⁾、Short⁵⁾の β -naphthoquinone sulfonate 法、Jacobs⁶⁾のフェリチアンカリ法、Scott⁷⁾の Chlorodinitrobenzene 法、Cuthbertson ら⁸⁾および Hunter⁹⁾のピクリン酸法、Prescott ら¹⁰⁾の Pyridyl 法等が報告されており、ガスメトリーとしては Harting¹¹⁾らのフェリチアンカリ法、Strickland ら¹²⁾のヨード酸法、松田^{13,14)}のフェリチアンカリ、重クロム酸カリ併用法がある。これらのガスメトリーはいずれも INAH のヒドラゼン部より発生する N_2 量を測定するもので、操作の簡便、芳香族アミン等の薬剤の存在の影響を考慮する必要のないこと、体液中に該試薬により N_2 を発生する物質の存在しないこと、したがって抽出等の操作を必要としない等の利点がある。ことに松田の方法は発生 N_2 をアゾトメトリー (A Z M) により定量するものであり、ガスメトリー中では最も微量を確実に定量することが可能であり、さらに INAH およびその代謝産物のフェリチアンカリおよび重クロム酸カリに対する反応の差異を利用して、1-Isonicotinyl-2-acetyl hydrazine と INAH および他の代謝産物とを容易に分別定量しうるものであり、他のいずれの定量法よりも優れていると考えられる。

一方 INAH の生体内運命については、すでに早く伊藤 (文) ら¹⁵⁾ は INAH はその大部分が生体内において抗結核作用の弱い抱合体となつて尿中に排泄されることを唱え、アセチル化物形成、ヒドラゼン形成等の可能性を予言した。その後伊藤 (剛)¹⁶⁾、Hughes¹⁷⁾ は 1-Isonicotinyl-2-acetyl hydrazine が生体内で高率に形成せられることを報告し、小沢ら¹⁸⁾ は葡萄糖、焦性葡萄糖酸、 α -ケトグルタル酸とのヒドラゼンの形成されることを証明した。他方 Cuthbertson¹⁹⁾ はイソニコチンイルグリ

シンを人尿中に証明した。これらの報告において遊離の INAH の排泄量は、いずれも非常に低率であることが認められている。著者は松田の方法を応用して、健康者および肺結核患者について、INAH の生体内運命を定量的に追求し、一定の成績を得たので報告する。

実験材料および実験方法

松田によればフェリチアンカリ A Z M (Fe A Z M) による発生 N_2 量は INAH およびその抱合体の総量を表し、重クロム酸カリ (Cr A Z M) 値はアセチル化物を除く、INAH およびその抱合体を表わすものであり、したがって両 A Z M を施行し、Fe A Z M と Cr A Z M 値の差よりアセチル化物を定量しうるという。次にその定量法を述べる。

試薬 ① 飽和食塩水 A Z M 用食塩 (和光純薬) を用う。

② 10N NaOH

③ フェリチアンカリ溶液。フェリチアンカリ 20g を飽和 $NaNO_3$ 溶液 100ml に溶解する。使用前に CO_2 ガスを通じ溶解している気体をすべて CO_2 に置換せしめる。

④ 重クロム酸カリ溶液。重クロム酸カリ 2g を飽和 $NaNO_3$ 溶液 100ml に溶解し、さらに 10N H_2SO_4 液 10ml を加える。③と同じく使用前に CO_2 ガスを十分に通ずる。

実施。① Fe A Z M 試料の一定量 (1~3 ml) を正確にマイクロコルペンにとり、吸引用ゴム管を用いてアゾトメーター内に吸引し、少量の飽和食塩水でコルペン内を洗い、さらにアゾトメーター内に吸引し、メーター内容が 8 ml になるようにする。この際試料が泡立ち易い場合には、少量のトリプチリンを加えてメーター内での発泡を防ぐ。次に A Z M 用キップの装置より発生する十分に純粋な CO_2 ガスを 5~7 分間メーター内に通じ、メーター内の気体をすべて CO_2 ガスに置換せしめる。次に吸引用ゴム管を用いて上端より吸引してメーター内を陰圧とし、フェリチアンカリ溶液 0.5 ml と 10N NaOH 1 ml を下端よりメーター内に導入する。活栓を閉じて 2.5 分間振盪した後、メーターの下端を飽和食塩水内に

浸して下部活栓を開けば、メーター内のCO₂ガスはすべてNaOHに吸収せられて内部は強い陰圧となつてゐるから食塩水はメーター内に奔入する。残留する気体が発生N₂であるから、これをオイディオメーター内に導入して計量する。

② Cr AZM 上と同様に処置してメーター内をCO₂ガスで置換した後、メーター内を陰圧とし、重クロム酸カリ溶液0.5mlを導入して2.5分間振盪した後10N NaOHを導入する。さらに2.5分間振盪して、メーター内のCO₂ガスを吸収せしめた後、下端を飽和食塩水内に浸して下部活栓を開き、残留ガスをオイディオメーター

に導入して計量する。

INAH 1 mol より22.4l, 0°C 760mmHg のN₂を定量的に発生する。したがつて INAH 1 mg はN₂ 162mm³, 0°C 760 mmHg に相当する。アセチル化比率は Fe AZM-Cr AZM/Fe AZM で表わされる。

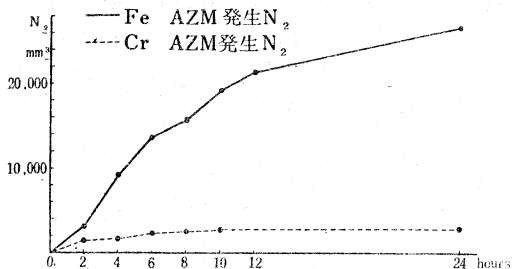
実験成績

まず健康者(体重60kg)に INAH 200mg を経口投与し、2時間毎に尿を集め Fe AZMならびに Cr AZM を施行し、24時間までの排泄状況を検した。表1, 図1はそれぞれの発生N₂量の各時間別値ならびにその累積

表1 健康者 INAH 200mg 投与, 時間別排泄量

時間別 AZM(mm ³)	発生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe AZM 値	3561	5759	4647	1915	4011	1944	3199	26080	159	79.5	89.9
Cr AZM 値	1521	201	488	270	240	0	0	2720	16	0.8	

図1 健康者 INAH 200mg 経口投与, 累積曲線



曲線を示したものである。INAH 200mg はN₂ 32700mm³ 30°C 760mmHg に相当する。図1に見られる如く Fe A

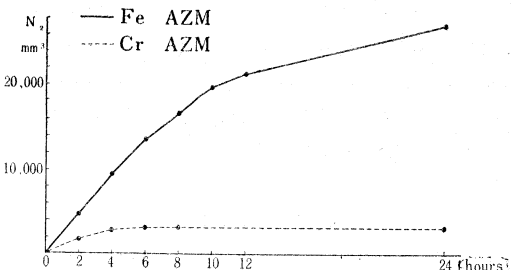
ZM値は漸次上昇して24時間では投与総量の80%を示すに反し、Cr AZM値は8時間で上昇を止め、24時間では Fe AZM値の10%を示すにすぎない。すなわち INAH 200mg を経口投与した場合24時間尿中に159mg が尿中に排泄されるが、排泄量の90%はアセチル化物となつてゐる。またアセチル化物以外の代謝産物は初期には比較的多量に排泄されるが、急速に減少し10時間以後では全然排泄されず専らアセチル化物のみが排泄される。この成績はほぼ松田の報告に一致する。

次に生体内でアセチル化される薬剤 P A S, Sulfazine をそれぞれ10g, 4g 併用内服して INAH のアセチル化に及ぼす影響を検したが、表2, 図2 および表3, 図3 に

表2 健康者 INAH 200mg, P A S 10g 併用, 時間別排泄量

時間別 AZM	発生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe AZM 値	2445	4564	4890	5097	2282	1630	6031	24939	152	76.1	88.8
Cr AZM 値	652	2630	1630	326	0	0	0	4238	2.5	1.2	

図2 健康者 INAH 200mg, P A S 10g 併用, 累積曲線



示した如くそのアセチル化比率はおのおの86.2%, 88.0%で INAH 単独投与時との間に差異を認めなかつた。

また INAH と相乗作用を示すといわれる薬剤 Pyrazinamide 3g を併用内服した例を表4, 図4 に示したが、この成績も排泄量, アセチル化比率とも INAH 単独投与例と差異を認めなかつた。なお P A S, Sulfazine, Pyrazinamide は上の実験における条件では INAH の両 AZM に影響しない。

次に INAH を3ヵ月連用内服した重症肺結核患者につ

表3 健康者 INAH 200mg, Sulfazin 4g 併用, 時間別排泄量

時間別 A Z M	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe A Z M 値	2614	4180	6158	2570	4452	857	4583	25394	154	77.1	86.2
Cr A Z M 値	888	1251	1216	158	0	0	0	3513	21	10.8	

図3 INAH 200mg, Sulfazin 4g 併用内服, 累積曲線

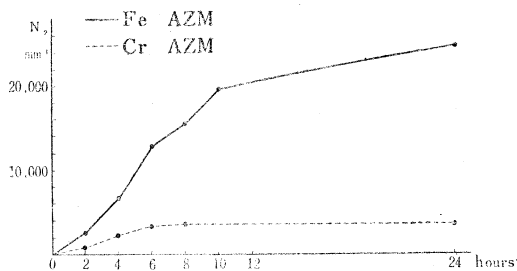


図4 健康者 INAH 200mg, Pyrazinamide 3g 併用, 累積曲線

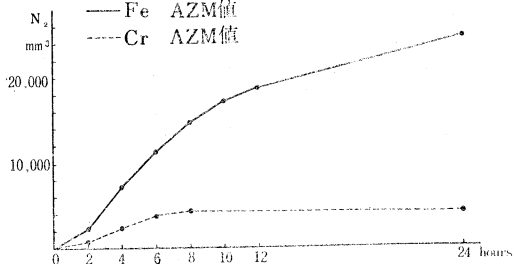


表4 健康者 INAH 200mg, Pyrazinamide 3g 併用, 時間別排泄量

時間別 A Z M	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe A Z M 値	4864	4672	4256	3134	2880	1515	5735	27056	166	82.6	88.0
Cr A Z M 値	1956	1056	304	42	0	0	0	3258	19	9.5	

表5 肺結核患者 INAH 200mg 単独, 時間別排泄量

時間別 A Z M	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe A Z M 値	7298	7396	4067	2440	1382	868	4101	27552	168	84.1	90.8
Cr A Z M 値	1296	658	94	62	0	0	0	2112	13	6.5	

図5 肺結核患者 INAH 200mg 単独, 累積曲線

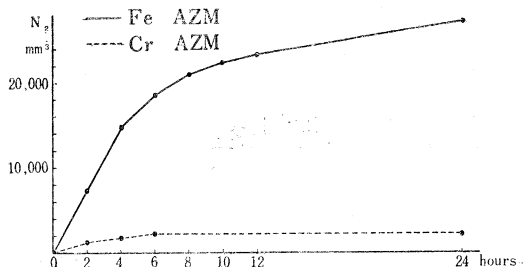


図6 肺結核患者 INAH 200mg, P A S 10g 併用

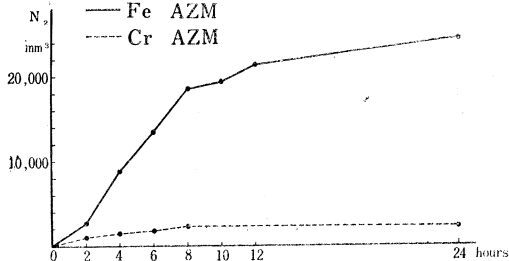


表6 肺結核患者 INAH 200mg, P A S 10g 併用, 時間別排泄量

時間別 A Z M	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
Fe A Z M 値	2711	6094	4786	5012	1009	1925	2894	24431	149	74.5	90.5
Cr A Z M 値	1112	679	131	433	0	0	0	2355	14	7.2	

表7 INAH 200mg, Pyrazinamide 3g 併用, 時間別排泄量

時間別	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
A ZM											
Fe A ZM 値	7396	3543	5510	3501	2000	450	1150	23550	140	70.0	88.7
Cr A ZM 値	1837	410	311	42	0	0	0	2600	16	7.9	

図7 肺結核患者INAH 200mg, Pyrazinamide 3g 併用

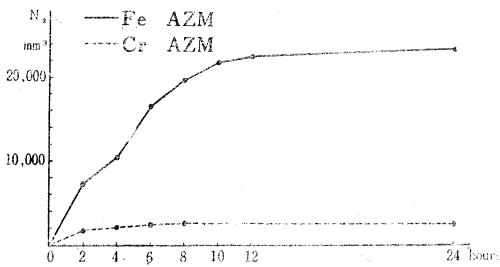


図8 肺結核患者 INAH 800mg (pro kg 18mg) 内服

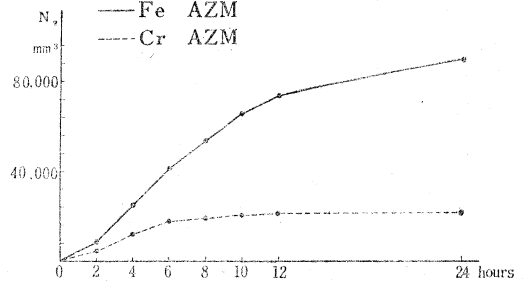


表8 肺結核患者 INAH 800mg (pro kg 18mg) 内服, 時間別排泄量

時間別	発 生 N ₂ 量 (mm ³)								INAH 換算値 (mg)	投与量 に対する 比率 %	Fe-Cr Fe 値%
	0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~12	12~24	計			
A ZM											
Fe A ZM 値	8172	16768	20212	8109	11259	9092	18908	92520	665	70.7	77.0
Cr A ZM 値	5562	7068	5101	1784	1586	1159	0	21260	130	16	

き, INAH単独, P A S 10g 併用, Pyrazinamide 3g 併用投与してその尿中への INAH排泄状況を検した。ただし実験前48時間はすべての薬剤投与を中止した。表5, 6, 7 および図 5, 6, 7 はその時間別排泄量ならびに累積曲線を示したものであるが, 長期 INAH使用肺結核患者も INAHの代謝状況は, 健康者1回投与例に変わらない成績を示した。

表8, 図8は INAHの大量800mg (pro kg 18mg) を肺結核患者に経口投与したものである。24時間で投与量の70%を尿中に排泄するが, そのアセチル化比率は77%で pro kg 4~5mg の如き常用量の投与時に比しややアセチル化比率の低下する成績を認めた。急激に大量の INAH が吸収されるため, アセチル化されずにそのまま排泄される割合が大きくなるためと考える。

考 案

Strickland ら¹²⁾ はヨード酸ソーダによるガストロリーで INAHの血中濃度を測定し, P A S を併用するもその値は INAH単独内服の場合に等しいことを示したが, 一方 Johnson²⁰⁾ は鳩肝のアセトン乾燥粉末と反応さすことにより観察される INAHの減量が, P A S, Sulfonilamide で阻害されることを認め, INAH と P A S, Sulfonilamide が共存するときはそれらのアセチル化が互に牽制されるものと解釈し, INAH, P A Sを併用する

ことにより有効 INAH濃度が INAH単独内服時に勝ることを示唆した。

著者は上のようなアセチル化阻害現象が生体内で見られるや否やを検すべく, 健康者ならびに肺結核患者に INAH単独投与の場合と P A S, Sulfazim, Pyrazinamide を併用した場合との INAHの尿中排泄状況およびそのアセチル化比率を A ZMにより検したが, それらの間に有意の差異を認めえなかつた。ただ INAHを pro kg 18mg の如き大量に投与した際にはアセチル化比率がやや低下する傾向を認めた。

結 論

健康者ならびに INAHを長期投与せる肺結核患者につき, INAH の尿中排泄状況を A ZMにより検し次の如き成績を得た。

- 1) INAH 200mg を経口投与した場合, その約80%が24時間尿中に排泄されるが, その約90%はアセチル化物として排泄される。
- 2) P A S, Sulfazim, Pyrazinamide を INAH と併用内服したが, INAH の排泄状況に著変なく, そのアセチル化阻害も認められなかつた。
- 3) INAH を大量投与した際の尿中アセチル化物の排泄比率は, 少量投与の際に比し低下する傾向を認めた。

本研究に対して終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師堂野前教授ならびに御指導御鞭撻戴きました河盛助教授、伊藤文雄博士に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) J.M. Kelly and R.B. Poet : Am. Rev. Tbc., 65, 484, 1952.
- 2) S.H. Rubin, L. Drekter, J. Scheiner and E. De-Ritter : Dis. of Chest, 21, 439, 1952.
- 3) 堂野前・河盛・伊藤・山本・青木・岩山: 最新医学, 7, 955, 1952.
- 4) 掛見・宇野・有田・内藤・徳島: 治療薬報, No. 496, 2, 1952.
- 5) E.I. Short : Lancet, No. 6813, 656, 1954.
- 6) Jacobs : Science, 118, No. 3057, 142, 1953.
- 7) Scott : Dis. of Chest, 21, 439, 1952.
- 8) W.F.J. Cuthbertson, D.M. Ireland and W. Walf : Brit. med. J., No. 4862, 609, 1954.
- 9) G. Hunter : Brit. med J., No. 4913, 585, 1955.
- 10) B. Prescott, G. Kaufmann, W.D. James : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 84, 704, 1953.
- 11) H. Harting und P.V. Gerzants : Acta Medica et Biologica, 2, 643, 1954.
- 12) R.D. Strickland and W. Hentel : Am. J. Clin. Path., 24, 988, 1954.
- 13) 松田: 生化学, 26, 420, 1954.
- 14) 松田: 生化学, 27, 366, 1955.
- 15) 堂野前・河盛・伊藤・山本・青木・岩山: 最新医学, 7, 955, 1952.
- 16) 伊藤剛: 生化学, 25, 338, 1953.
- 17) H.B. Hughes : J. Pharm. Exp. Therp., 109, 444, 1952.
- 18) 小沢・清本: 医学と生物学, 27, 110, 1953.
- 19) W.F. Cuthbertson, D.M., Ireland and W. Wolff : Biochem. J., 55, 669, 1953.
- 20) W.J. Johnson : Nature, No. 174, 744, 1954.