

INH の Lathyrogenic Effect に 関 する 研 究

(第1報) われわれの実施した Hydroxyproline の定量法について

村 田 彰

国立療養所東京病院

受付 昭和 39 年 9 月 26 日

LATHYROGENIC EFFECT OF INH*

Report I. Quantitative Determination of Hydroxyproline

Akira MURATA

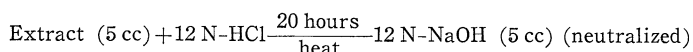
(Received for publication September 26, 1964)

In order to make the experiments with chick embryos for the purpose of investigating about the influence on fetus by the dosage of INH, which is widely used today for the treatment of tuberculous patients, it was necessary to determine hydroxyproline quantitatively in the 1M. sodium chloride extract from the long bones of chick embryos treated with INH.

The method of determination was almost the same as that of Robert E. Newman and Milan A. Logan, but somewhat changed because of availability of laboratory instruments.

Procedures: The tibia and the femur were stripped of muscles, tendon and periostium, minced with scissors and extracted in 20 volumes (v/w) of 1M. cold saline buffered with phosphate (pH. 7.6, ionic strength 0.02). The extract was shaken for 24 hours at 5°C., then centrifuged at 15,000 r. p. m. for 1 hour (Model Tominaga Factory, Toyo No. 71).

The supernatant solution was passed through a glass filter, No. 4. The viscosity was measured with the Ostwald viscosimeter. The extract was analysed for hydroxyproline, for hydrolysis of extracted collagen is:



1 cc. of this neutralized sample was used for the determination of hydroxyproline content by Newman and Longan's method. The recovery of hydroxyproline from a bovine achilles tendon by our method was 95~100%.

* From Tokyo National Chest Hospital, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

[I] Sweet pea より抽出した β -aminopropionitrile

これは Chick Embryo に畸形を起こす¹⁾ことが報告され、1960 年 Gross, Levene および Orloff²⁾らはこのような薬剤で処理した、いわゆる Lathyratic Chick Embryo の組織が脆くなつて、Collagen が食塩水で抽出されやすくなることを報告した。翌 1961 年、Levene³⁾は結核の治療剤である INH にも、これと同じような作用があることを報告した。その詳細については後報にゆずるが、時あたかもサリドマイド畸形が新聞を賑わしたあ

とであつたので、薬剤の胎児に及ぼす影響に注目し、まずわれわれが日常用いている INH に関する Lathyrogenic Effect を検討するため、Levene らのいう、易抽出性の Collagen を定量する必要がある。その方法は Neuman や Logan⁴⁾らが行なつた方法に準じたが、われわれのところで蛋白分解に用いる Autoclave がなかつたので、少し時間がかかるが、どこの研究室でもできるような方法を実施した。

[II] われわれが実施した Chick Embryo の長骨より抽出した Hydroxyproline の定量法

Fig. 1. Sketch of Apparatus Used for Protein Hydrolysis

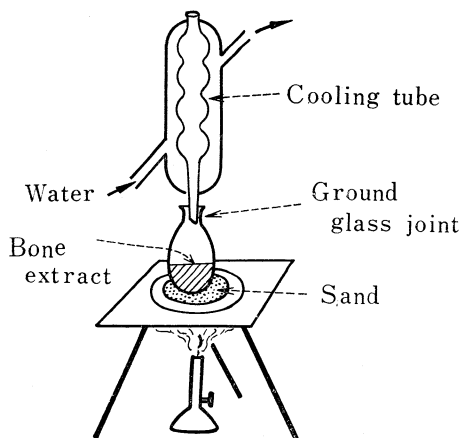
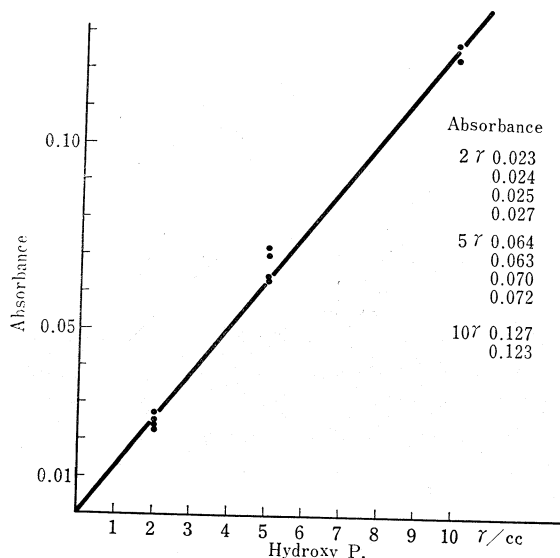


Fig. 2. Standard Curve of Hydroxyproline



(a) 抽出法

Jibiae および Femora から筋肉、腱、骨膜をはぎとり、鋏で細かく切る。次に 20 倍量 (v/w) の 1M 冷食塩水 (phosphate Buffer pH 7.6 でイオン強度 0.02 使用) で 5°C, 24 時間振とうしながら抽出した。

抽出液は 15,000 rpm (富永製作所製遠沈器, 東用第 71 号) 1 時間遠沈し, その上清は glass filter No. 4 で濾過し, この濾液について 5°C の低温室で Ostwald の Viscosimeter No. 1 で粘性度を測定したのち, この液を次の Hydroxyproline 定量に用いた。

(b) 定量前処置

上述の Sample (20 倍稀釈となつている) 5 cc を小形の茄子型コルベンにとり, 同量の 12N-HCl を加えて, 円底冷却管を図 1 のごとく装置して 20 時間加熱して Collagen を分解する。このさい, あわがぶつぷつわ

かに出る程度に加熱する。次に 12N-NaOH 約 5 cc で中和し, 25 cc のメスコルベンで全量の水で 25 cc とすれば, 原液の 100 倍稀釈液が得られたことになる。この sample を用いて次の定量を行なつた。

(c) 定量法

Sample 1 cc に 0.01 硫酸銅 1 cc, 2.5N-NaOH 1 cc, 6% H_2O_2 1 cc をつぎつぎに加え, とくとき振とうして 5 分間放置後, 80°C の温浴に 5 分間浸し, この間しばしば強く振とうし H_2O_2 の過剰をこわすようにする。これは H_2O_2 が微量あつても発色を妨て orange red となるからである。次に氷冷, 水浴したのち 3N- H_2SO_4 4 cc を攪拌しながら注入し, 次に 2 cc の p-dimethylamino-benzaldehyde を加えてよく混合する。これを 70°C の温浴に 16 分間入れてのち流水で冷却し, 水を Sample としたものを対照として光電比色する (日立 FPW 4 型, フィルター 550 mμ)。

(d) 標準曲線

2γ, 5γ, 10γ/cc の L-hydroxyproline 溶液を (東京化成工業株式会社製) 標準液として上述の定量法を実施すると図 2 のごとく, 吸光度はそれぞれ 2γ: 0.023~0.027, 5γ: 0.063~0.072, 10γ: 0.127~0.123 となつて直線関係を示した。

(e) 回収試験

東京化成工業製の Bovine achilles Tendon より製造した Collagen (Hydroxyproline を 14%~13% 含有) 25 mg を蒸留水で 100 cc とし, これを倍に稀釈したものの 1 cc を被検液として上記の定量を実施したところ, この 1 cc 中に Hydroxyproline 16.3γ ないし 16.6γ 含有する結果となつた。しかしここに用いた Collagen は 14% ないし 13% の Hydroxyproline を含む製品であつたので, 計算値としては, 被検液 1 cc 中には 14% 含有として計算すれば, 1 cc 中 17.5γ であり, 13% とすれば 16.1% 含有していることになり, 測定値の 16.3γ ないし 16.6γ にははなだ近似しており, 回収率はほとんど 100 ないし 95% ということになる。

以上のことからわれわれの実施した測定法が, 使用する方法であると考えられる。

[III] 抽出された Collagen 量と Hydroxyproline および Viscosity の関係

粘度は Ostwald の Viscosimeter を 5°C の硝子水槽の中につけて測定したが, Chick Embryo に INH 7.5 mg 投与したものと, 無処置群について測定してみると, 表 1 のごとく flow time にも明らかな差が出るし, 緩衝食塩水を 1 として比較粘度 rel. η をみると対照は 1.02 で INH 投与群は 1.10 と明らかな差が出る。なお同時に測定した Hydroxyproline では, 対照が 112γ に対し INH 投与群は 578γ~500γ であつた。

Table 1. Hydroxyproline Content and Viscosity of Extract from Long Bones of Chick Embryo

	Viscosity (time)	rel. η (average)	Hydroxyproline
NaCl-Buffer	2', 13'', 8 2, 15, 0	(1.0)	
Control (INH no inj.)	2, 17, 0 2, 17, 6	(1.02)	112 γ
INH injected Group	2, 28, 5	(1.10)	578 γ
	2, 28, 0		500 γ

() indicates relative Viscosity

Table 2. Relationship between Hydroxyproline Content and Viscosity

INH Dosage	Hydroxyproline	rel. η
3.7 mg	255 γ	1.26
7.5	405	1.34
15.0	410	1.39
30.0	335	1.42
Control	95	1.12

Each group was consisted of 20 eggs, of which as much as half were not fertilized. Of the remaining eggs, about the half died in the Incubator.

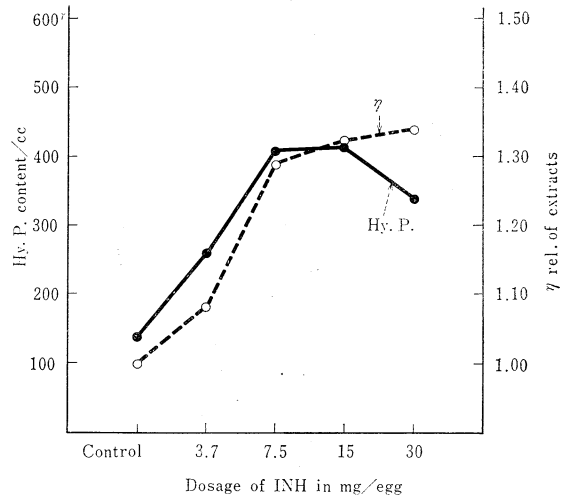
なお Hydroxyproline と Viscosity の関係をみるために次の実験を行なった。

鶏卵 100 コを 20 コずつ 5 群に分ち、孵卵器 (38°C) に incubate して 14 日目に INH をそれぞれ 3.7 mg, 7.5 mg, 15 mg, 30 mg 0.1 cc の水にとし卵殻を通して注入し、さらに 3 日間 incubate してのち、Embryo を取出し、生存しているものについて型のごとく長骨を採取して測定すると表 2 のごとく、15 mg までは INH の増量とともに Hydroxyproline 量も増加し、これに伴って rel. η も増加している。しかし 30 mg 使用群では全身の出血がひどく、わずかに 3 羽のみがやつと生きていたが、すぐ死亡したので発育もはなはだわるく、試料が少なく測定も困難であつた。表 2 を図示すれば図 3 のごとくなり、Hydroxyproline と Viscosity は比較的平行していると思われる。すなわち Viscosity を測定しても、Collagen の抽出状態をある程度知ることができる。

[IV] あとがき

Neuman や Logan らは、この測定に用いる発色法では、チロジンが Hydroxyproline の 1.5% 程度の色を出す、これは bronze 色であつて、500 m μ のフィルターを使用すること、非常に安定でアミールアルコールによく溶解することを利用して、Hydroxyproline color と区別できると述べている。また純トリプトファ

Fig. 3. Relationship between Hydroxyproline Content and Relative Viscosity of 1 M Sodium Chloride Extracts of Bones from 17 Day-Old Embryos Treated 3 days Earlier



ンも 0.7% 程度の色を出す、これは protein の加水分解による humin の形成により抑制されると述べている。よつて、このような程度のチロジンやトリプトファンが問題となる場合は一応考慮せねばならないが、われわれの実験にはこの程度のものはなんら考慮する必要がないので、この点については深く検討をしなかつた。

以上 Collagen 量測定のための Hydroxyproline の定量法について、われわれの行なつていた測定法を報告し、実用できることを述べた。

砂原院長のご校閲を謝し、本研究に種々ご助言頂いた教育大学理学部山本照子理博に感謝いたします。

なお低温室その他のご便宜を計つていただいた教育大学理学部植物学教室西沢教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ellis E. Rosenberg : Nature, 180 : 706, 1957. Teratogenic Effect of β -aminopropionitrile in the Chick Embryo.
- 2) Jerome Gross, Charles I. Levene and Sergj Orloff : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 105 : 148, 1960. Fragility and Extractable Collagen in the Lathyrus Chick Embryo. An Assay for Lathyrigenic Agents.
- 3) C. I. Levene : J. Exp. Med., 133 : 4, 1961. The Lathyrigenic Effect of INH on the Chick Embryo and its Reversal by pyridoxal.
- 4) Robert E. Neuman and Milan A. Logan : J. B. C., 184 : 299, 1950. The Determination of Hydroxyproline.