

生体内運命よりみた Streptohydrazid の作用機序について

野 村 四 朗

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

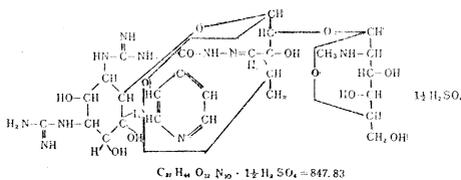
受 付 昭 和 32 年 8 月 16 日

結 言

さきに下村¹⁾はアズオトメトリー(A Z M)を用い、イソニコチン酸ヒドラジッド(I N H)誘導体の生体内運命を検する一方、マウスの実験的結核症に対する治療効果を検し、各種誘導体は少なくとも *in vivo* ではそのままの形では抗結核作用を示し難く、遊離 I N H となつて始めて強力な抗結核作用を示すことを認め、遊離 I N H のみが有効型であると報告した。一方 Quentín²⁾はアルデヒド試薬により、Streptomycin のアルデヒド基を閉鎖すると、Streptomycin の効果は消失することを報告した。ここにおいて著者は Streptomycin と I N H がヒドラツォン型に結合した Streptohydrazid につき、その生体内運命を検すると共に、その化学療法の効果を検討し、Streptohydrazid の形で Streptomycin および I N H の両者がそれぞれその効果を発揮しうるや否やを追求したので、以下その成績を報告する。

実験材料および方法

Streptohydrazid は科研製 Inamycin を使用した。本物質は Streptomycin, I N H 各 1 分子の結合物の硫酸塩で 1½ 分子の硫酸を含む。分子量は 847.83 であり、本物質 1.5 gm 中には Streptomycin 力価 1 gm, I N H 236 mg が含有されている。構造式は次の如くである。



尿中 I N H の定量には松田^{3) 4)}の A Z M 原法および那須⁵⁾の酸処理 A Z M 法を用い、健常人に Streptohydrazid 1.5 g (Streptomycin 力価 1 g, I N H 236 mg を含有) を筋肉内注射または経口投与し、それぞれの場合の 4, 8, 24 時間までの尿を集め、各尿につき定量を行った。

試験管内における Streptohydrazid よりの I N H の遊離に関しては定量的および定性的に検討した。定量法は掛見⁶⁾の変法に従つた。すなわち試料 1 ml に蒸溜水 9 ml を加え、3 分間振盪後、4 N 苛性ソーダ 0.3 ml を加えてアルカリ性とし、新たに調製した 0.2% β-ナフトキノ

ンスルフォン酸ソーダ水溶液 0.1 ml を添加発色せしめ、30 分間暗所で氷水中に放置した後、速やかに 470 mμ のフィルターを用いて光電比色した。一方対照として試料 1 ml に蒸溜水 6.9 ml, 4 N 塩酸 0.1 ml, 次いで N/100 NaNO₂ 液 2 ml を加えたものを同様に処理、発色せしめ、両者の差より I N H 量を換算した。定性には濃紙クロマトグラフィーを用いた。各実験方法についてはさらに実験成績の項に記す。

マウスの実験的結核症に対する治療実験は次の如く行つた。マウスは N A₂-Nishida 系の体重 16 g 前後のものを用い、1 群 10 匹とし、これに人型結核菌黒野株のグリセリンブイヨン 2~3 週間培養の菌浮游液(湿菌量 5 mg/ml) 0.1 ml を尾静脈に注射感染せしめ、感染翌日より 1 週 6 日間皮下注射または経口投与により各薬剤を投与し非治療対照群の 50% 致死の日まで治療を行つた。観察期間は 5 週間とした。使用薬剤は Streptomycin-sulfate (協和醸酵), I N H および Inamycin で、Streptomycin は力価をもつて表わした。各薬剤の投与量はマウス体重 g 宛の γ 数を記載した。

マウスの実験的肺炎双球菌感染症に対するこれら薬剤の感染防禦実験にも、N A₂-Nishida 系マウス体重 15 g 前後のものを用い、普通寒天培地に 24 時間培養した I 型肺炎双球菌の 10⁻⁷ mg/ml 稀釈液(ブイヨンにて稀釈) 0.3 ml を腹腔内に感染せしめた。かくて感染当日より 24 時間毎に 5 回各薬剤を皮下注射し、10 日目までの生存の有無を観察した。

マウスの実験的肺炎桿菌感染症に対する感染防禦実験にも同系マウスを使用、普通寒天培地に 24 時間培養した肺炎桿菌(Klebsilla pneumoniae) の 2 白金耳をブイヨン 4 ml に浮遊したものを第 1 管とし、10 倍稀釈法にて 3 段階稀釈したものを 0.4 ml 腹腔内に感染した。各群 10 匹のマウスに感染、3, 12, 24, 36 時間後に各薬剤を皮下注射し、感染後 7 日間生死を観察した。

実 験 成 績

1. Streptohydrazid の A Z M における態度

Streptohydrazid の水溶液の A Z M における態度は表 1 の如くで、A Z M 原法では、フェリチアンカリ A Z M (Fe A Z M), 重クロム酸カリ A Z M (Cr A Z M) 共に僅かの N₂ ガスの発生をみるにすぎず、またその発生量も

表1 Streptohydrazid のA Z M
(M/1000溶液2ml, 理論値44.8mm³0°C, 760mmHg)

	Fe A Z M 値	Cr A Z M 値
溶液作成直後原法	7.0	9.0
24時間室温放置後原法	26.0	24.5
溶液作成直後酸処理法	41.5	43.5

実験の都度一定しない。この水溶液を24時間室温に放置すると、Fe A Z M および Cr A Z M 共に理論値の約半量のN₂を発生するようになる。ところが水溶液を硫酸処理後A Z Mを行う(酸処理A Z M)と、ほぼ理論値通りのN₂ガスを発生する。藤原⁷⁾の報告した如く、Streptohydrazid は水溶液では、そのヒドラツォンとしての結合は非常に不安定であり、酸性では容易にStreptomycin とINHに分離するものと考えられる。

2. Streptohydrazid の尿中排泄状況

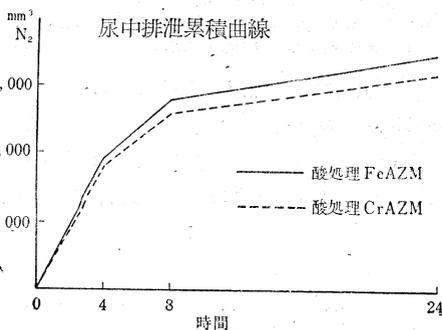
健康人にStreptohydrazid 1.5gを筋肉内注射または経口投与し、そのおのおのの尿につきA Z M原法および酸処理法を施行した。筋肉内注射の場合のA Z M原法でのN₂ガス発生量は酸処理法のそれに比し遥かに少なくStreptohydrazid のA Z Mにおける性質から考えても、原法での値は無意味と考えられる。一方経口投与時の両A Z M値の間には本質的な差異は認められなかつた。したがって以下の成績は酸処理法での値を記した。

筋肉内注射の場合には表2および図1に示した如く、4時間までの尿の酸処理両A Z Mの値は全く一致し、8時間までの尿では酸処理Fe A Z M値は酸処理Cr A Z M値を僅かながら上廻る。24時間までの尿ではその差はやや

表2 Streptohydrazid 1.5g 筋肉内注射時の時間別排泄量
(N₂理論値38586mm³0°C, 760mmHg)

	注射後時間別尿発生N ₂ 量 (mm ³)				投与量に対する比率 (%)	Cr/Fe 値
	0~4	4~8	8~24	計		
酸処理Fe A Z M 値	15067	7150	6510	28727	74.4	0.92
酸処理Cr A Z M 値	15067	6601	4650	26318	68.1	

図1 Streptohydrazid 1.5g 筋肉内注射時の尿中排泄累積曲線



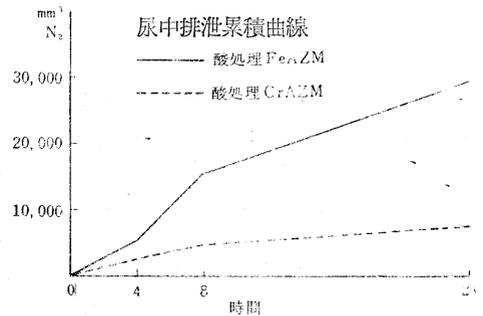
顕著となる。24時間尿中への排泄総量は投与量の約74%を示し、Fe A Z M 値とCr A Z M 値との差すなわちN-Isonicotinyl-N'-acetylhydrazine(Acetyl-I NH)は排泄総量の約10%足らずにすぎない。すなわちStreptohydrazid は筋肉内注射されれば、多くの部分はそのままの形で尿中に排泄され、一部のみが体内でStreptomycin とINHに分離するものと考えられる。

これに対し健康人にStreptohydrazid を経口投与した場合には、表3および図2に示す如く、INH投与の場

表3 Streptohydrazid 1.5g 経口投与時の時間別排泄量

	投与後時間別尿発生N ₂ 量 (mm ³)				投与量に対する比率 (%)	Cr/Fe 値
	0~4	4~8	8~24	計		
酸処理Fe A Z M 値	5431	15410	26350	49691	128.8	0.30
酸処理Cr A Z M 値	2538	4820	7610	15018	38.9	

図2 Streptohydrazid 1.5g 経口投与時の尿中排泄累積曲線



合に類似した排泄状況を示し、しかもA Z Mの原法と酸処理法との間に大差をみない。すなわち本剤は経口投与すれば消化管で容易にINHとなつて吸収されるものと考えられる。

3. Streptohydrazid よりのINH遊離に関する実験

前述の如くStreptohydrazid は経口投与すれば高率にAcetyl-I NHの排泄を認めることより、消化管内においてINHを遊離するものと考えられるので以下の実験を行った。

本剤の性質上、酸性溶液中でINHの遊離することが考えられるので、まず塩酸あるいは胃液による分解を検討した。

表4は塩酸処理の成績である。Streptohydrazid 60mg

表4 Streptohydrazid 60γから0.4N塩酸処理によるINHの遊離

	遊離INH (γ)
蒸溜水処理	0.5
0.4N 塩酸処理	6.1

注:Streptohydrazid 60γ中にはINH 9.6γを含む

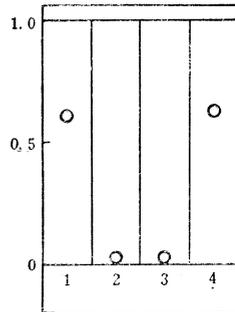
を0.4N塩酸10mlあるいは蒸溜水10mlにそれぞれ溶解せしめ、37°C、30分間恒温槽水に incubate した後、100倍に稀釈したものを1mlにつき前述の方法で比色定量した。表4に示した如く、塩酸処理せるものでは被検試料中のINH含量理論値9.6γに対し、6.1γのINHが遊離しているのを認めた。

一方上記反応液を東洋濾紙No.50にて、80%エタノール水にて展開、濾紙クロマトグラフィーにより、INHの遊離を同定した。発色はKönigの反応によつた。その成績を表5および図3に示した。

表5 0.4N 塩酸処理の際の濾紙クロマトグラフィー

反応	基質	Rf
1	INH	0.65
2	Streptohydrazid	0.04
3	同上蒸溜水処理	0.04
4	同上0.4N 塩酸処理	0.65

図3



次に胃液による分解を検した。空腹時採取した正常人胃液を濾過し、さきの塩酸の場合と同様にして実験した。本胃液は遊離塩酸度41、総酸度58であつた。INHは1.37mg/ml、Streptohydrazidは2.0mg/mlの水溶液1mlを9.0mlの蒸溜水または胃液とそれぞれ混合、37°C、1時間恒温槽中に incubate した後、10倍稀釈したものを1mlにつき比色定量した。表6に示す如く、塩

表6 胃液処理によるINHの遊離

反応	基質	INH (γ)	Streptohydrazid (γ)
蒸溜水処理		14.3	0.5
胃液処理		13.5	3.8

注：数値は遊離INHのγ数を示す
Streptohydrazidは20γ (INH含量3.2γ) を使用

酸処理の場合と同様、Streptohydrazidは胃液によりINHを遊離することを確認した。

次に腸内細菌の1つとして大腸菌によるINHの遊離の有無を検討した。普通寒天平板培地に24時間培養した大腸菌K-12株を集菌洗滌後、Potter-Elvehjemの硝子ホモゲナイザーにて湿菌量10mg/mlの菌液を作成、INHあるいはStreptohydrazidと最終M/10磷酸緩衝液(pH, 7.2)中で37°C、1時間反応せしめ、エタノールを80%となるように添加、反応を停止せしめた後、前述同様の方法によりINHの定量を行つた。その成績は表7に示した如く、大腸菌生菌液によつてはStreptohydrazidからのINHの遊離は証明できなかつた。また先にのべた如く筋肉内注射の際にも一部Acetyl-INHの排泄され

表7 大腸菌生菌液によるINHの遊離

反応	基質	INH (γ)	Streptohydrazid (γ)
蒸溜水処理		11.8	0.5
大腸菌処理		11.0	0.0

注：数値は遊離INHのγ数を示す
Streptohydrazidは20γ (INH含量3.2γ) を使用

ることから、臓器等によつてもINHの遊離する可能性が考えられる。そこで白鼠肝ホモジェネイトによる分解の有無を検討した。すなわちPotter-Elvehjemホモゲナイザーにて調製した白鼠肝ホモジェネイトを酵素材料として、大腸菌生菌液と同様に実験し、その除蛋白濾液につき定量を行つた。表8はその成績を示したものであ

表8 白鼠肝ホモジェネイトによるINHの遊離

反応	基質	INH (γ)	Streptohydrazid (γ)
incubate (-) 対照		12.8	0.8
incubate (+)		11.2	0.5

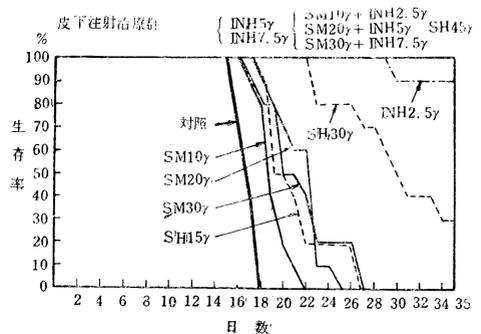
注：数値は遊離INHのγ数を示す
Streptohydrazidは20γ (INH含量3.2γ) を使用

るが、白鼠肝ホモジェネイトではStreptohydrazidからINHの遊離は証明し得なかつた。

4. マウスの実験的結核症に対する治療実験

マウスの実験的結核症に対するStreptohydrazidの治療成績は図4、5に示した。対照としてStreptohydrazidに含まれると同量のStreptomycin、INHのそれ

図4 マウス実験的結核症に対する治療実験



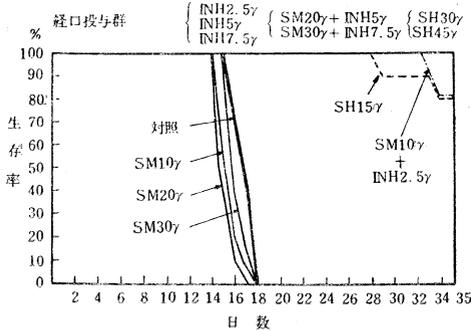
注：投与量はマウス体重gm宛γ数
SH: Streptohydrazid 15γはSM力価10γ INH約2.5γに相当
SM: Streptomycinはその力価を示す

れぞれおよび混合物にて治療した。図においてStreptohydrazid 15γとはStreptomycin力価10γとINH約2.5γを含むものであり、したがって同量のStreptomycinおよびINHのそれぞれおよび混合物により治療したものを対照としたわけである。本実験における治療日数は、17日間であつた。

図4は皮下注射による治療成績である。本実験条件ではINHは強力な抗結核作用を示すが、Streptomycin

のそれはさほど強力ではない。すなわち Streptomycin 10, 20, 30 γ /g の皮下注射でそれぞれ僅かな生存期間の延長を認めるにすぎない。これに対し I NHを含む治療群では、2.5 γ /g以上の投与でほとんど全例が生じた。しかるに Streptohydrazid 治療群では15 γ /g 治療群で僅かな、30 γ /g 群で中等度の生存期間の延長を示すにすぎず、45 γ /g にして始めて全例生存した。すなわち Streptohydrazid 中に含まれる I NHの一部のみが奏効しているにすぎない。一方経口投与群の成績は図5に示す如

図5 マウス実験的結核症に対する治療実験

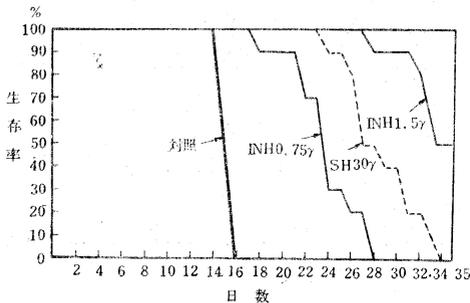


注：投与量はマウス体重mg宛 γ 数
SH: Streptohydrazid 15 γ はSM力価10/I NH力価2.5 γ に相当
SM: Streptomycin はその力価で示す

く、Streptomycin は全く効果は認めないが、Streptohydrazidは15 γ /g投与ですでに著明な生存期間の延長を認め、30 γ /g 以上では全例生存した。すなわち Streptohydrazid 中に含まれる I NH が強力な抗結核作用を示したものと解釈される。

図6は Streptohydrazid 30 γ /g 皮下投与が、I NHの

図6 マウス実験的結核症に対する治療実験
Streptohydrazid 30 γ 皮下注射と I NH
0.75 γ および 1.5 γ 皮下注射との比較



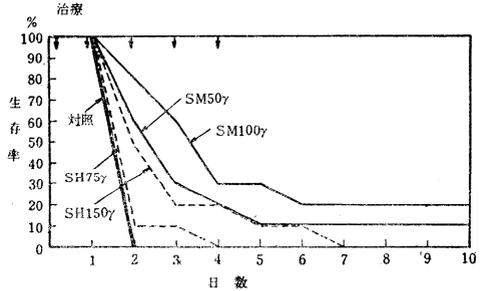
注：投与量はマウス体重mg宛 γ 数
SH: Streptohydrazid

如何なる量に匹敵するかをみた成績であるが、その効果は I NH0.75 γ と1.5 γ との中間に位することが認められる。すなわち Streptohydrazid 30 γ 中の I NH 含量は5 γ である点からみれば、皮下注射された Streptohydrazid 中の I NHはその約半が抗結核作用を示すものと考えられる。

5. マウスの実験的肺炎双球菌感染症に対する抗感染力実験

図7に示した如く、Streptohydrazid 75 γ /g 注射では

図7 マウス実験的肺炎双球菌症に対する抗感染力実験



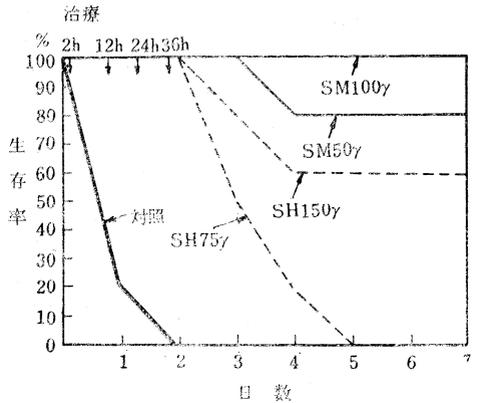
注：投与量はマウス体重mg宛 γ 数
SH: Streptohydrazid
SM: Streptomycin
SH75 γ : SM力価50 γ を含む

ほとんど効なく、Streptohydrazid 150 γ /g注射では生存期間の延長を認めるが、その効果は Streptomycin 50 γ /g 注射のそれに匹敵する。すなわち Streptohydrazid のマウス実験的肺炎双球菌感染症に対する感染防禦力はその中に含まれると同量の Streptomycin のそれに劣ることが認められた。

6. マウスの実験的肺炎桿菌症に対する抗感染力実験

図8に示した如く、非治療対照群は感染24時間以内に

図8 マウス実験的肺炎桿菌症に対する抗感染力実験



注：投与量はマウス体重mg宛 γ 数
SH: Streptohydrazid
SM: Streptomycin
SH75 γ : SM力価50 γ を含む

大半が死亡したのに対し、Streptohydrazid 75 γ /gm注射群では3~5日にまで生存期間が延長し、150 γ /gm注射群では4日目までに4匹が死亡するにとどまった。これに対し Streptomycin 注射群は50 γ /g注射群が1匹死亡したのみで、100 γ /g注射群は全例生存した。すなわち肺炎桿菌感染の場合にも Streptohydrazid の感染防禦効果はその中に含まれると同量の Streptomycin のそれよりも遥かに劣ることが認められた。

総括ならびに考案

A ZMを応用して尿中排泄状況を検した成績では、Streptohydrazid は健常人に筋肉内注射した場合には、多くの部分がそのままの形で尿中に排泄されるに対し、経口投与の場合には容易にINHとなつて吸収されると考えられる。

経口投与の場合にINHを遊離することより、消化管内でINHを遊離するものと考えられるので、INH遊離の機序につき検討した結果、胃液と同程度の酸度の塩酸あるいは正常胃液によりINHを遊離することを認めた。一方大腸菌生菌液によつてはStreptohydrazid 以下のINHの遊離は証明し得なかつた。したがつて消化管内でのINHの遊離に関しては、現在のところ胃液の酸度が重要な関係をもっているものと考えている。

また筋肉内注射の場合にも一部はINHを遊離するとの成績を得たので、白鼠肝ホモジェネイトによるINHの遊離について検討したが、その証明は得られず、体内での分解の機序については明らかになし得なかつた。

一方マウスの実験的結核症に対する治療実験により、Streptohydrazid 中に含有されるINHの治効作用を検したが、皮下注射では含有相当量のINHの効果に比し遙かに劣り、経口投与では相当量のINHに近い効果を認めた。さきのAZMによる生体内運命の成績と考え合せ、Streptohydrazid もまた下村のいう如く、他のヒドラゾン型誘導体と同様そのままの形では無効であり、そのINHの部分は遊離のINHとなつて始めて治療効果を発揮しうものと考えられる。

またStreptohydrazid 中に含まれるStreptomycinの効果を、マウスの実験的肺炎双球菌および肺炎桿菌感染症に対する感染防禦実験により検したが、この場合もStreptohydrazid の皮下注射による抗感染力は同量のStreptomycin のそれより劣ることを確認した。Quentinら²⁾は、Streptomycin のアルデヒド基をアルデヒド試薬で閉鎖すると、Streptomycin の作用が消失することを報告しているが、Streptohydrazid においても、そのままの形ではStreptomycin はその効果を発揮し難いものと考えられる。

すなわちStreptohydrazid はStreptomycin とINHに水解されて始めてそれぞれの薬効を発揮するものであるといふ。しかるに実際には注射されれば一部のみが分解されるにすぎない。臨床的にはStreptohydrazid

は肺結核に対し有効であることがすでに認められているが、その効果は体内で遊離する一部のStreptomycin とINHによるものと解釈しう。したがつてStreptomycin とINHはかかる結合型として投与するよりも、おのおの別個に投与する方が合理的であろうと考える。

結 論

1. Streptohydrazid を健常人に筋肉内注射すれば、一部はINHを遊離するが、多くの部分はそのままの形で尿中に排泄される。これに対し経口投与すれば消化管内で遊離INHとなつて吸収されるものと考えられる。
2. 消化管内におけるINHの遊離には胃液の酸度が大きな関係をもっている。
3. 各種細菌による動物実験において、Streptohydrazid の治効作用は、本剤に含まれているStreptomycin あるいはINH相当量のそれに劣る。生体内運命に関する成績と考え合せると、本剤はそのままの形ではStreptomycin, INH共にその効果を発揮し難く、両者に分解されて始めて治療効果を現わすものと考えられる。

本研究に対し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、伊藤文雄博士ならびに御協力戴いた大阪府立羽曳野病院那須博士および塩野義研究所西村博士に深甚なる謝意を表します。本研究の一部は文部省科学研究費総合研究「化学療法による結核治癒機転の研究」班の研究費によつた。記して謝意を表す。

本論文の要旨は第14, 15回日本結核病学会近畿地方会において報告した。

文 献

- 1) 下村：結核，32：481, 535, 1957.
- 2) Quentin, R.B., John, C., Harry M., Crooks, J.R., and Mildred, C.R.: J.A.C.S., 68: 2613, 1946.
- 3) 松田：生化学，26：420, 1954.
- 4) 松田：生化学，27：366, 1955.
- 5) 那須：結核，32：119, 1957.
- 6) 掛見・宇野・有田・内藤・徳島，：治療薬報，No. 496, 2, 1952.
- 7) 藤原：薬学雑誌，76：874, 1956.