Summary

Near-ultraviolet absorption of quinoline *N*-oxide and its derivatives in various solvents was determined and following results were obtained:

1) In solvents of weak polarity not possessing any active hydrogen, bathochromic effect is very great compared to the corresponding quinolines but, with the increase in the polarity of solvents, hypsochromic effect increases that in acid solution or in conc. sulfuric acid, the absorption becomes almost equal to that of corresponding quinolines. From these results, the contribution of the electronic state of the *N*-oxide group in the molecule is discussed. It was concluded that the chief reason is the solvation effect was comparatively examined with the solvation effect of pyridine *N*-oxides.

2) The near-ultraviolet absorption appearing in naphthalene and quinoline compounds was explained by the directional properties of electronic vibration.

(Received May 10, 1952)

297. 伊藤四十二*, 高昌英伍*, 宇井 博**: 魚類脳下垂体の研究 (第2報***)

魚類脳下垂体の ACTH 作用****

Yosoji Ito*, Eigo Takabatake* and Hiroshi Ui**: Researches on the Fish Pituitary. II. Adrenocorticotropic Activity of Fish Pituitary Gland.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo* and
Pharmacological Institute, Tokyo Jikeikai Medical College**)

脳下垂体前葉ホルモンの一つである ACTH は、臨床、基礎医学の各方面に非常に広く応用され、化学的研究も大いに進展しているが、簡単に取量の良い製法による量産が望まれている。然し我が国では原料脳下垂体の集荷難と、製品の効力検定に多数の脳下垂体摘出動物を必要とするなどの為にその製造研究が活潑に行われているとはいえない。原料としては豚脳下垂体が最も多く用いられているようであるが、羊、牛、鯨(長須、白長須、座頭) 脳下垂体からも抽出されている。この中で牛は含量が少ないといわれる。我々は我が国の環境を考え罐詰工場に入荷する多数のカット、マグロ等の魚類に著目し、先ずカット脳下垂体の ACTH 作用を検討した。又別に入手したメジ及び魚類ではないがイワシ鯨脳下垂体についても実験を行った。

ACTH の検定には脳下垂体摘出ラッテを用いなければならぬが、その技術は必ずしも容易ではなく、而も厳密な定量を行うには多数の動物と標準品を使用することが不可欠であるが、我々の実験条件ではこの点に完璧を期することは困難であり尙不満な点もあるが、現在迄に得た結果を報告する。

実験材料 カット (*Katsuwonus vagans*) は入丈、伊豆方面で漁獲後約 10 日を経て罐詰工場に集荷されたものの脳下垂体を採取しアセトンに浸漬、のち乾燥粉末とした。3790 箇分の乾燥粉末 11.5 g.

メジ (*Thunnus orientalis*, マグロの 90 cm 内外のもの) は伊豆南端附近で漁獲、約 6 時間後に脳下垂体を採取直ちにドライアイスで凍結、翌日凍結乾燥した。50 箇分の乾燥粉末 160 mg.

イワシ鯨 (*Balaenoptera borealis*) は北海道近海で捕獲、厚岸に於いて脳下垂体を採取しアセトンに浸漬したものの乾燥粉末を製した。6 頭分の乾燥粉末 10 g.

実験方法 1. 検定法: Sayers 等¹⁾の副腎アスコルビン酸 (AsA と略記) 減少法によつた。ラッテは購入

* Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

** Shiba Atago-cho, Minato-ku, Tokyo.

*** 第1報, 伊藤, 行方: 本誌 71, 956 (1951).

**** 日本薬学会年会発表 (1952).

1) Sayers, Sayers, Woodbury: Endocrinology 42, 379 (1948).

後少くとも7日間 20~25° に保温して飼育してから、中尾、大森法²⁾に従つて脳下垂体を摘出し、翌日検定に使用検体は股静脈内又は大腿部筋肉内へ注射。AsA は Roe, Kuether³⁾ 法により測定、比色には国産光電管比色計を使用。

2. 抽出法 カツオは Li 等⁴⁾ の方法に準じた。即ちカツオ脳下垂体アセトン乾燥粉末 (K-A) 5 g に水 45 cc を加えてよく混合し、水 20 cc, 濃 HCl 5 cc, アセトン 200 cc の混合液を加え攪拌抽出後遠心分離。抽出液に4倍量のアセトンを加え1夜氷室に放置。沈澱をグラスフィルター上に集めアセトン、エーテルで洗滌、真空乾燥し 465 mg, 抽出残渣を 200 cc, 150 cc 宛の 80%アセトンで2回, pH 1.2 で抽出, 抽出液に5倍量のアセトンを加え夫々乾燥し 245, 25 mg を得 (各沈澱を混合 K-B)。K-B 1.375 g を水 10, 5, 5 cc 宛3回 pH 2.0 で攪拌抽出, 抽出液にアセトン9倍量を加う。沈澱は乾燥して 910 mg (K-C)。K-C 600 mg を水 28.2 cc に pH 3.0 で溶解, 飽和 NaCl 水 1.8 cc を攪拌下に滴下, 遠心分離で沈澱を除き, 上澄液に食塩を加え飽和させる。沈澱を遠心分離してとり約5ccの水に浮遊させセロファン膜に入れ流水に対して透析, 膜内液を pH 3.0 とすれば澄清溶液となる。凍結乾燥し 330 mg (K-D)。K-D 150 mg を 0.2 N HCl 15 cc に溶解, 沸騰水浴中に1時間置く。冷後 1 N NaOH で pH 3.0 としそのまま凍結乾燥し 300 mg (K-E, 中和によつて生じた NaCl を含む)。K-A 10 g から得られるべき各フラクションの量は K-B 1.43 g, K-C 950 mg, K-D 520 mg, K-E 約 500 mg (NaCl を除いて)。

イワシ鯨についてはカツオの K-C フラクションまで行つた。アセトン乾燥粉末 10 g より S-C 480 mg。

メジ脳下垂体凍結乾燥粉末 100 mg は, 0.1N HCl 1 cc, アセトン 4 cc に混じ, 濃 HCl で pH 1.2 とし 30 分室温で攪拌抽出後遠心分離。上澄液 4.2 cc にアセトン 12.6 cc を加え1夜氷室に放置後遠心分離, アセトンで2回洗滌, 真空乾燥し 7 mg (T-B)。

尚 K-A→K-E の過程を Fig. 1 に示す。

実験結果 標準 ACTH reference standard は用いられないので Armour の ACTHAR, Lot No. K 32604 と J 80311 について検定した結果を Table I に示す。尚参考の為 Sayers 等による LA1A の検定データーを併記しておく。

Fig. 1 Extraction of Bonito ACTH[#]

[#] Li 等の方法に準ず。

2) 中尾、大森：成医会雑誌 65, 26 (1950)。

3) Roe, Kuether: J. Biol. Chem. 147, 399 (1943)。

4) Li, et al.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78, 665 (1951)。

Table I Assay of Standard ACTH (ACTHAR)

ACTHAR Lot No.	Dose γ/100 g	Adrenal ascorbic acid concentration			
		Left	Right	Difference	Rate of depletion
		mg/100 g adrenal			
K 32604	2.5	405	344	61	15.0%
		398	328	70	17.6
		301	264	37	12.3
		average		56	15.0
	5.0	488	338	150	30.7
		495	369	126	25.5
		420	315	105	25.0
		average		127	27.0
J 80311	2.5	474	398	76	16.0
		445	364	81	18.2
		346	240	106	23.7
		331	291	40	12.1
		317	282	35	11.0
		average		68	16.2
LA1A *	0.6	Average of 4 rats		39	3.69
	1.2	" "		70	18.4
	2.4	" "		155	33.0

* Data obtained by Sayers, et al¹⁾.

カツオ, メジ, イワシ鯨抽出物についての検定結果を Table II に掲げる.

Table II ACTH Activities of Extracts of Bonito, Tuna and Sei Whale.

Sample	Dose *		Adrenal ascorbic acid concentration			
	per 100 g of body wt.		Depletion mg/100 g adrenal		Rate of depletion	
	wt.	N	individuals	average	individuals	average
Bonito K-C	5mg(M)	0.7mg	52, 27, 14	22	43.9, 34.2, 29.0 died by toxicity	35.7
	5	0.7	211, 159, 98	156		
	2.5	0.35	34, 20, -1	18		
	1.25	0.175	90	90		
K-D	100 γ	13.3 γ	143, 97, 83, 77	100	26.2, 22.4, 17.5, 19.2	21.4
K-E	75 γ	8.7 γ	122, 118, 106	115	26.0, 21.9, 30.4	22.8
	25	2.9	166, 100, 90	119	32.6, 19.5, 25.3	25.8
	12.5	1.45	111, 48	80	22.9, 13.3	18.1
	5	0.58	-37, -1	-19		
Sei whale S-C	2 mg	148 γ	81		17.4	
	5(M)	370	98, 87, 87, 80, 74, 34, 19	68	15.0, 25.2, 27.6, 20.4, 18.1, 9.8, 5.0	17.5

S-C'	1	74	140, 100	120	33.2, 22.2	27.7
Tuna T-B	100 γ		138, 94 2 rats died by toxicity.	116	27.6, 26.6	27.1
T-B'	100		80, 70, 69	73	21.8, 17.9, 22.6	20.8

S-C'=acid-heat treated S-C

T-B'=acid-heat treated T-B

Intravenous injection except (M)=intramuscularly injection

考察 1) 検定法 endogenous ACTH の影響を除く為に脳下垂体摘出動物を用いなければならぬが、副腎の重量、組織学的所見による maintenance 又は repair test⁵⁾ と AsA による adrenal ascorbic acid depletion method¹⁾ とでは製品によつて効力が平行せず幾つかの方法で検定すべきであるとも云われる⁶⁾ が、現在最も一般的に使用されている後者をとつた。AsA を指標としても検体投与前の測定を行わない Munson 法 (Armour ではこの方法によつている) は、Sayers 法の如く左右の差をとるよりも動物が多く要るように考えられる。AsA には可成りの個体差があるので、差の絶対値をとると、差の左 (注射前値) に対する百分率で表わすのと何れからよい検定効果を得られるかは検討中である。尙 AsA は飼育条件殊に温度によつて著しく影響されるから試験前の動物の飼育に注意が肝要である。

2) 抽出法 Li 等⁷⁾ が羊、Sayers 等⁸⁾ が豚脳下垂体から始めて ACTH を均一な蛋白として単離したが、何れも酸性アセトン (約 80%) で抽出しアセトン濃度を高めて生ずる沈澱 (acid acetone powder 又は crude prolactin) から出発している。その後 ACTH は蛋白を加水分解した polypeptide でも有効なことが見出され多くの研究が行われている。Li 等⁴⁾ は食塩分割、酸性熱処理という簡単な方法で臨床に使用出来る ACTH を得量よく製している。我々もこれに従つてカツオ脳下垂体を抽出した。イワシ鯨では資料の関係で C フラクシオンで止めたが、K-C、S-C は crude prolactin に相当する。

Sayers 等⁹⁾ は豚、鼠、人脳下垂体の ACTH 含量を比較するのに夫々の凍結乾燥物を 0.01N NaOH で抽出し検体とした。又 ACTH 投与後の各臓器への分布状況を観るのに凍結乾燥臓器を酸性 80%アセトン抽出、95%での沈澱をとつて検体としている¹⁰⁾。メジ脳下垂体について前者の方法では良結果を得なかつたので後者の方法を採用した。

3) 検定結果 ACTH の reference standard が入手出来なかつたので、ACTHAR K 32604, J 80311 を標準品とした。その検定結果は Table I に見るように Sayers 等のデーターと比較すると反応が弱く見受けられる。これはおそらくラットの感受性の相違によるらしく、もつと多数の動物について検定しなければならぬが、reference standard に対して±10%はの標準誤差で検定するのに 100~150 匹を必要とする¹¹⁾ ので我々の現在の条件下では困難であるが他日再検討したい。然し定性的に ACTH 作用の有無を知ることは充分可能である。Morris¹²⁾ はラットの strain が非常に重要で多くの strain では感受性が鈍く且反応が不規則で AsA を指標とする ACTH 検定に使用出来ないという。我が国では純系ラットを得ることも容易ではないので厳密な生物検定を行うにはこうした根本的問題から解決しなければならぬ。

カツオよりの抽出物で、K-C は 5 mg (体重 100 g 当り、以下略) で AsA は平均 22 (mg/100 g 副腎、以下略) の低下で作用が認められないが毒性も現われない。静注すると 1.25 mg でも作用が認められ、5 mg では著明である (AsA 減少 156)。然し静注では毒性が激しく注射後間代性痙攣を起し間もなく死亡することが屢々である。非常に徐々に注射すれば生存はする。K-D の酸性溶液を熱処理後 pH を調製して与えれば 100 γ で AsA は 100 減少し、K-E は 75~12.5 γ で明らかに AsA を減少させたが 5 γ では作用が見られなかつた。

5) Simpson, Evans, Li: Endocrinology **33**, 261 (1943).

6) Reinhardt, Li: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **77**, 229 (1951).

7) Li, Simpson, Evans: J. Biol. Chem. **149**, 413 (1943).

8) Sayers, White, Long: Ibid. 425.

9) Burns, Merkin, Sayers, Sayers: Endocrinology **44**, 439 (1949).

10) Richards, Sayers: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **77**, 87 (1951).

11) Thompson: Private communication.

イワシ鯨の S-C は 2~5 mg 筋注で AsA の減少が見られるが, 静注では 1 mg を酸性熱処理して投与すると 120 減少し ACTH 作用は明らかで而も毒性はない。

メジの T-B はそのまま 100 γ 与えると毒性は強いが生存した例では 116 の AsA 減少を認め, T-B を酸性熱処理すると毒性は消失し ACTH 作用は残つて 73 の減少を認めた。

以上を通覧すると, AsA による ACTH 検定には静注が必要条件であること, C フラクシオンは静注で毒性を呈するが酸性熱処理によつて毒性のみ消失して ACTH 作用はそのまま残ることが分る。又メジの T-B は他のフラクシオンに比し粗製のものであるが, その割には強く ACTH 作用を示していることは, 原料を新鮮ならちに凍結乾燥したためであろう。原料入手の際大いに留意すべきことである。

我々の研究は未だ数に於いて充分ではなく, 標準品との厳密な比較も行つていないので定量的に魚類脳下垂体の ACTH 含量を云々することは出来ないが, 哺乳類 ACTH に関する文献, 例えば Li 等⁴⁾ が羊からの酸性熱処理物 2 γ で AsA 111 の減少を報告しているのに比し K-E は効力が弱いようである。これも ACTHAR 検定の項に述べた如く, ラットの感受性が問題で一概に弱いとは断言できない。今後我々の出来る条件内で如何によい検定効果を挙げるべきかを検討し, 又多量の原料を得て系統的に研究したい。

カツオ, メジ脳下垂体を分与され, 又採取に盡力下さつた林兼水産工業株式会社, イワシ鯨脳下垂体を提供された大洋漁業株式会社, ACTHAR を惠贈された第一製薬株式会社中野勇氏に深甚の謝意を表す。又アスコルビン酸測定に協力された東大薬学科山形紀子嬢に感謝する。

東京大学薬学科, 東京慈恵会医科大学薬理学教室

Summary

By the adrenal ascorbic acid depletion method of Sayers, et al.¹⁾, the ACTH activity was examined with the pituitaries of bonito (*Katsuwonus vagans*), tuna (*Thynnus orientalis*) and sei whale (*Balaenoptera borealis*). The crude prolactin fractions were found to be toxic but the toxicity disappeared upon acid-heat treatment and only the ACTH activity could be observed. Since the number of rats used under the present experimental conditions were limited, the results could not be discussed quantitatively but it can be qualitatively defined that fish pituitaries also possess ACTH activities. The extract from the bonito pituitary by the method of Li, et al.³⁾ possessed 12.5 γ /100 g. efficacy.

(Received May 13, 1952)

298. 藤川福二郎, 沢口 元, 瀧村萌子: 飲食物防腐剤の研究 (第53報*)

Fukujiro Fujikawa, Gen Sawaguchi and Myoko Takimura:

Antiseptics for Foodstuff. LIII.

(Kyoto College of Pharmacy**)

本報では第一群の化合物として Orexin I, Orexincitrat, *p*-Nitrobenzoesäure, *p*-Aminobenzoessäure, *p*-Sulfonamidbenzoessäure (II), *p*-Nitrozimtsäure-*o*-nitrophenylester (III), 4-Acetylaminobenzaldehydthiosemicarbazone (Tibion, Teben), Vitamin B₁ 並びに Vitamin B₆ の塩酸塩, 2-Cyclohexylorcin (IV), 6-chlor-2-cyclohexylorcin (V), 2,4-Dioxy-3,5-dichlorvalerophenon (VI), 6-*tert*-Amyl-2-naphthol (VII), Caperatsäure (VIII) 及び Vitamin K₃ (IX)¹⁾, Furacin 等の 16 種の化合物, 第二群の化合物としては 2,4-Dioxyacetophenon, 2,4-Dioxyvalerophenon (X), 4-*tert*-Amylresorcin のナトリウム塩 (XI), 2,6-Dibrom-

* 第 52 報: 本誌 72, 692 (1952).

** Yamashina-misasagi, Higashiyama-ku, Kyoto.

1) 富安, 豊水, 野中, 塚本: 醸酵工学雑誌 29, 187 (1951); 30, 1 (1952).