Table II. Changes of Rf Values with or without Spraying of Cupric Sulfate

	$\text{NH}_2\text{---}\langle\text{benzene ring}\rangle\text{---COOH}$	$\text{CH}_3\text{CONH---}\langle\text{benzene ring}\rangle\text{---COOH}$	$\text{CH}_3\text{CONH---}\langle\text{benzene ring}\rangle\text{---CHNHNHCONH}_2$
Spray	0.25	0.43	0.40
Without spray	0.51	0.56	0.39

Solvent: BuOH+H₂O

Temp.: Room temp.

尿中分解物の検出 チオアセタゾーン 100mg 内服後, 散剤の場合は5~12時間の尿を集め約 1/20~1/50 に, エンテリックコーティング錠の場合は 15~24 時間の尿を集め約 1/50~1/100 に 37° 以下の温度で減圧濃縮, これに約 2 倍量のエタノールを加え尿含有物質を沈澱せしめ少し加温, よく攪拌後遠心分離, 上澄液をとりその 0.3~0.5 cc を濾紙上の原点に何回にも分けて塗布. なお対照にはこのエタノール脱塩尿に対照とすべき試料を 1~5% の割に水またはエタノールに溶かした液を 3~5% の割に加え同様に塗布する. 別に尿中の本試薬による呈色物質のスポットの位置を知るためチオアセタゾーンを含有しない尿を用いて同様に処理して対照とした. チオアセタゾーン及び *p*-アセトアミノ安息香酸は水飽和ブタノール溶媒で Rf 0.51 及び 0.43 の位置に明瞭にそのスポットが認められたが, *p*-アミノ安息香酸は Rf 0.57 で, 尿中の呈色物質の Rf 0.55 の位置にあるものとやや重なって認められたので, 更に 3%アンモニア水飽和ブタノール溶媒で展開したところ Rf 0.06 の位置に対照と共にスポットを認めた.

エンテリックコーティング錠内服の場合には対照の *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンと同じ Rf 0.42 の位置に試薬噴霧により直ちに呈色するスポットを認め硫酸銅溶液を噴霧したときは原点よりの上昇を認めなかった. 従つてこのときは *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンが排泄されたものと認めた.

グルクロノラクトンチオセミカルバゾンの合成 グルクロノラクトン及びチオセミカルバジドを等 mol 宛とり, 出来るだけ少量の熱湯に溶かし放置すると固化. 水または希エタノールより再結晶, mp 211~212°. 計算値 C 33.71, H 4.45, N 16.86, 実験値 C 33.66, H 4.46, N 16.50.

京都大学医学部薬学科

U. D. C. 615.778-092.21

235. 有田隆一: チオアセタゾーンの体内変化に関する研究 (第 4 報)

チオアセタゾーンの消化器管中における分解について

Takaichi Arita: Studies on the Change of Thioacetazone *in vivo*. IV.

On the Decomposition of Thioacetazone in the Intestinal Tract.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

Decomposition of *p*-acetylaminobenzaldehyde thiosemicarbazone (thioacetazone) in the digestive tract was examined by paper chromatography. Thioacetazone is decomposed into *p*-acetylaminobenzaldehyde and thiosemicarbazide in artificial gastric juice and is also deacetylated to form *p*-aminobenzaldehyde thiosemicarbazone. Its decomposition in the intestines was examined with artificial enteric juice, duodenal mucous enzyme from a rabbit and bovine, and intestinal flora (*Escherichia coli communior*, *Streptococcus faecalis*, and *Lactobacillus acidophilus*). No change occurred in artificial enteric juice and *Escherichia coli*, but thioacetazone was deacetylated by intestinal mucous enzyme, *Strept. faecalis*, and *Lact. acidophilus*. *p*-Acetylaminobenzaldehyde was also found to be deacetylated by the Lactobacilli.

(Received March 26, 1956)

チオアセタゾーンの消化器管中における分解については青木等¹⁾ はインドール塩酸による呈色及びジアゾ反応を用いて胃液中での分解を検討し, *p*-アセトアミノベンズアルデヒド及び *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンの生成を報告し, 光井等²⁾ は人工胃液で 15 分後にすでに脱アセチル化されることを認め, 豊島³⁾ はコリンエステラーゼに対する阻害作用より考えてチオアセタゾーンは *p*-アセトアミノベンズアルデヒドとチオセ

1) 青木: 薬学研究 23, 97(1951).

2) 光井: 臨床と研究 29, 24(1952).

3) 豊島: 薬学研究 24, 595(1952).

ミカルバジドに分解されるものと推定し報告している。著者は第3報において尿中に排泄せられる分解物について報告したが、チオアセタゾンを内服したとき、消化器管中でどのような形に分解して吸収されるかを知るため本実験を行つた。胃の場合その主な消化酵素はペプシンである。胃における分解を検討するために実際の胃液を用いる代りに人工胃液を用いてもその結果には大差はないと思われるが、腸の場合には多種の酵素を有した腸内に生息する細菌類も多いので、これ等について夫々検討を行う必要がある。

胃における分解 チオアセタゾーンの胃中における分解については実際の胃液を用いて検討するのが望ましいが、困難なので Toplis の処方による人工胃液を用いて実験を行い、その分解物を薄紙クロマトグラフィーにより展開しその分離検出を行つた。分解物としては *p*-アセトアミノベンズアルデヒド、*p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾン及びチオセミカルバジドを検出した。この際チオセミカルバジドはそのままではブタノール溶媒では検出が出来ないので、検液を濃縮する際ブドウ糖を加えグルコースチオセミカルバゾンとして検出した。また *p*-アセトアミノベンズアルデヒドセミカルバゾンは第3報に報告した硫酸銅溶液噴霧法により検討したが、殆んど呈色は認められなかつた。

人工腸液による分解 最初に主に腸液の液性によるチオアセタゾーンの変化をしらべるため Toplis の処方による人工腸液を用いてその変化を検討したが、分解は全く認められなかつた。

腸内酵素による分解 Toplis の人工腸液では酵素としてはパンクレアチンのみを加えているが、実際には腸内には多種の酵素があり人工腸液のみの検討では充分でないので家兎及び牛の十二指腸より小腸上部の腸粘膜酵素を用いてその分解の有無を検討した。家兎の場合はその腸粘膜を集め、これに 1.5%重炭酸ナトリウム液を加えて酵素液なし、これにチオアセタゾーンを加えて反応せしめ別にチオアセタゾーンを加えない対照を作り、その比較を行つた。反応後検液及び対照液のジアゾ化を行つたところ検液は明らかに呈色を認めたが、対照液では呈色を認めず、次に水飽和ブタノール溶媒で薄紙クロマトグラフィーを行い検出したところ、*p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンと思われるスポットを得たので、更に硫酸銅溶液噴霧を行い検討したが、このときは原点よりの上昇は認められなかつた。従つて腸粘膜酵素によつてチオアセタゾーンは脱アセチル化されたものと認めた。次にまた牛の腸粘膜を集めアセトンパウダーとなし、同様に実験したが前記同様脱アセチル化されることを認めた。集めた腸粘膜中には腸内細菌の混入も考えられるが、少なくとも腸内でチオアセタゾーンが脱アセチル化されることは確実である。

腸内細菌類による分解 腸内には多数の細菌類が生息しているので、腸内におけるチオアセタゾーンの分解を検討する際にはこれ等の有する化学作用を無視することは出来ない。腸内に生息する細菌の主なものは大腸菌及び乳酸菌であり、従つてこれ等の中より大腸菌としてその代表的な *E. coli communior* を、また乳酸菌中より *Streptococcus faecalis* 及び *Lactobacillus acidophilus* を用い、これ等によるチオアセタゾーンの分解を検討した。

大腸菌による分解： 大腸菌による分解については糞便より分離した数種の大腸菌がチオアセタゾーンを脱アセチル化するとの報告⁴⁾があるが、これには菌種の記載がなかつたので、著者は *E. coli communior* を用いて記載の方法⁵⁾に従つて追試を試みたのであるが、脱アセチル化を認めることは出来なかつた。また平板ブイオン寒天培地に培養した *E. coli communior* を集め、pH 7.4 の磷酸緩衝液に浮遊せしめた洗滌菌体浮遊液を調製し、これにチオアセタゾーンを加えてその分解を検討したが全く分解は認められなかつた。またこの菌浮遊液にブドウ糖を加えて同様に実験したが、同じくチオアセタゾーンの分解は認められなかつた。従つて大腸菌中少なくとも *E. coli communior* ではチオアセタゾーンの分解は行われぬものと認めた。

乳酸菌による分解： 乳酸菌によるチオアセタゾーンの分解を検討するため *Strept. faecalis* 及び *Lact. acidophilus* を夫々乾燥酵母エキス少量を加えたブドウ糖ブイオン培地に培養し菌体を集め、夫々 pH 7.4 の磷酸緩衝液に浮遊せしめた洗滌菌体浮遊液を作り、これにチオアセタゾーンを加えて 37° に保ちその分解の有無を検討した。約 12 時間後この菌体浮遊液を遠心分離し、上澄液の一部についてジアゾ化を行つたところ、明らかに呈色を認めたのでこの検液を濃縮し薄紙クロマトグラフィーにより展開。チオアセタゾーンの脱アセチル化したもの即ち *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンと思われるスポットを認めた。次に硫酸銅溶液噴霧法により検討したが、このときは原点よりの上昇は認められなかつた。尙呈色にはエールリッヒ試薬を用いたのである。

4) 藤井：東京医事新誌 68, No. 5, 7(1951).

5) 藤井：小児科診療 13, 199(1950).

が、対照のチオアセタゾーンを加えない洗滌菌体浮游液の上澄液中には本試薬による呈色物質は認められなかつた。従つてチオアセタゾーンは乳酸菌により脱アセチル化されるものと認めた。また洗滌菌体浮游液にブドウ糖を加えて同様にチオアセタゾーンの分解を検討したところ、このときは脱アセチル化されたものは極めて少なく、*p*-アセトアミノベンズアルデヒドとグルコースチオセミカルバゾーンのスポットを認めたが、このとき最後の液性は約 pH 4 になつていたので、この分解は酸性のために生じたものであらうと思われる。

次にチオアセタゾーンの場合と同様にして *p*-アセトアミノベンズアルデヒド及び *p*-アセトアミノ安息香酸について乳酸菌による脱アセチル化を検討したところ、前者は脱アセチル化されて *p*-アミノベンズアルデヒドを生じたが、後者の場合には全く脱アセチル化は認められなかつた。従つて第3報に報告した尿中より検出された *p*-アミノ安息香酸は胃中で生じた *p*-アセトアミノベンズアルデヒドが腸内で脱アセチル化されたものと思われる。

以上によりチオアセタゾーンを内服するときは胃において *p*-アセトアミノベンズアルデヒドとチオセミカルバジドとに分解し、また一方では脱アセチル化され *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンを生じ、次に腸内においてはチオアセタゾーンは脱アセチル化を受け *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンとなり、また胃において分解して生じた *p*-アセトアミノベンズアルデヒドも同様に脱アセチル化されて *p*-アミノベンズアルデヒドとなることを認めた。

本実験に際して終始御指導を戴いた京都大学薬学科掛見教授、鈴木教授並びに宇野助教授に深く感謝し、また本実験に使用した菌の中 *E. coli communior* は京都大学医学部微生物学教室保存のものを、*Strept. faecalis* 及び *Lact. acidophilus* はビオフェルミン製薬保存のものを夫々分与して戴いたものであることを附記して感謝する。

実 験 の 部

人工胃液及び腸液の調製 Toplis の処方により調製。次にその処方を示す。

人工胃液		人工腸液	
塩化ナトリウム	1.40 g	重炭酸ナトリウム	15.0 g
塩化カリウム	0.50 g	パンクレアチン (U. S. P.)	2.8 g
塩化カルシウム	0.06 g	蒸留水	全量 1000 cc
塩酸 (36%)	6.944 g		
ペプシン (U. S. P.)	3.20 g		
蒸留水	全量 1000 cc		

人工胃液による分解 人工胃液約 200 cc 中にチオアセタゾーン約 100 mg を加えよくふりまぜた後 37° の孵卵器に入れ 4 時間放置し、後これを炭酸ナトリウムで中和、pH を約 7 としこれにブドウ糖約 0.5 g を加え 1/10~1/20 の容量になるまで 37° 以下の温度で減圧濃縮、濃縮液に同量乃至 2 倍量のエタノールを加え少しく加温してよくふりまぜた後遠心分離。この上澄液約 0.1 cc を濾紙上の原点に塗布し水飽和ブタノール溶媒により一次元上昇法を用いて展開する。呈色法は第3報に報告した方法により行い対照とその Rf を比較して確認した。その結果分解物として *p*-アセトアミノベンズアルデヒド (Rf 0.80)、*p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーン (Rf 0.43)、チオセミカルバジド (グルコースチオセミカルバゾーンとして検出 Rf 0.06) を検出した。

腸粘膜酵素による分解 家兎の新鮮な十二指腸及び小腸の上部をとり切開して水洗しその粘膜を集め、この 3 倍量の 1.5% 重炭酸ナトリウム液を加えてよくふりまぜ、チオアセタゾーン 50~100 mg を加え再びよくふりまぜて 37° で 6 時間放置後約 2 倍量のエタノールを加え少しく加温してよくふりまぜた後遠心分離、上澄液を約 1/20 の容量になるまで 37° 以下の温度で減圧濃縮、この濃縮液に再び 2 倍量のエタノールを加えて上記操作を繰返し遠心分離してその上澄液約 0.1~0.2 cc を濾紙上の原点に塗布し、水飽和ブタノール溶媒を用いて一次元上昇法により展開。呈色法は上記方法によつた。その結果 *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーン (Rf 0.43) の生成を認めた。

腸粘膜アセトンパウダーの調製 牛の新鮮な十二指腸及び小腸上部の粘膜を集め、これに約 5 倍量の冷却した精製アセトン液を冷却しつつ加えよくかきまぜて直ちに吸引ろ過、沈澱を集め再びこの操作を繰返し、沈澱を冷アセトンでよく洗い乾燥。乾燥後これを粉末として実験に供する。この粉末 5 g に 5 倍量の 1.5% 重炭酸ナトリウム液を加えよくかきまぜチオアセタゾーン約 50 mg を加え上記同様に操作してその分解を検討した結果、同じく *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンの生成を認めた。

洗滌菌体浮游液の調製 大腸菌の場合はブイヨン寒天培地に 24 時間、乳酸菌の場合は乾燥酵母エキスを 0.5 % の割に加えたブドウ糖ブイヨン培地に 18 時間培養した菌体を集め、蒸留水で洗滌した後遠心分離して上層液を捨てる。この操作を数回繰返して十分に菌体を洗つた後、菌量が乾燥菌量として 1 cc 中約 10 mg となるように pH 7.4 の磷酸緩衝液に浮遊せしめる。この 30 cc にチオアセタゾーン 20~30 mg を加えよくふりまぜ孵卵器中に 37° に保ち 12 時間放置。ブドウ糖添加の場合はこの洗滌菌体浮游液に局方ブドウ糖を 0.5~1.0% の割に

溶解して実験を行った。

洗滌菌体浮游液によるチオアセタゾン分解物の浮紙クロマトグラフィー 反応した洗滌菌体浮游液を遠心分離し、上澄液をとりこれに約2倍量のエタノールを加えて37°以下の温度で約1/20の容量になるまで減圧濃縮し、この濃縮液に再びその2倍量のエタノールを加えて少しく加温しよくふりまぜた後、遠心分離してその上澄液をとり約0.1ccを浮紙上の原点に塗布、水飽和ブタノール溶媒により一次元上昇法により展開。別にチオアセタゾンを加えない洗滌菌体浮游液を同様に処理したもの及び検液の一部に2~3%の

-

アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンのエタノール溶液を1~5%の割に加えたものを対照として同時に展開し、そのRfを比較。硫酸銅溶液噴霧法は第3報に記載した方法によつた。なお

-

アセトアミノベンズアルデヒド及び

-

アセトアミノ安息香酸の場合の溶媒は3%アンモニア水飽和ブタノールを用いて同様に行つた。展開は何れも室温で行つた。Table I にそのRfを示す。

Table I. Rf of Thioacetazone and its Decomposition Products

	Solvent	
	BuOH+H ₂ O	BuOH+3% NH ₄ OH
CH ₃ CONH- -CHNNHCSNH ₂	0.46	—
NH ₂ - -CHNNHCSNH ₂	0.43	—
CH ₃ CONH- -CHO	0.80	0.85
CH ₃ CONH- -COOH	—	0.12
NH ₂ - -CHO	—	0.80

京都大学医学部薬学科

U. D. C. 615.778-092.21 : 576.851.21.095.18

236. 有田隆一：チオアセタゾーンの体内変化に関する研究（第5報）

Streptococcus faecalis R によるチオアセタゾーンの脱アセチル化について

Takaichi Arita : Studies on the Change of Thioacetazone *in vivo*. V.

Deacetylation of Thioacetazone by *Streptococcus faecalis* R.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

Deacetylation rate of thioacetazone by the washed-cell suspension of *Streptococcus faecalis* R at each pH between pH 4 and 9 was examined and it was found that the deacetylation was the most active at around pH 7.4. The buffers used in these experiments were Clark-Lubs buffer of pH 4~7 and pH 8~9 and phosphate buffer of pH 7.4. Periodical determination of the deacetylation rate of thioacetazone with washed-cell suspension prepared with phosphate buffer of pH 7.4 showed that deacetylation was practically completed in about 40 hours. The amount of dried cells was 10 mg./cc. and the concentration of thioacetazone, 68 γ/cc. Addition of glucose to 1% ratio in this washed-cell suspension of pH 7.4 resulted in virtual cessation of deacetylation after about 3 hours and the rate of deacetylation effected was also small. The pH of the sample solution tended to become acidic with passage of time, the pH becoming about 4 after 24 hours.

(Received March 26, 1956)

さきに第4報において著者は腸内におけるチオアセタゾーンの分解を検討した際、これが脱アセチル化されて

-

アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾンを生成し、この反応は特に乳酸菌により強く促進されることを報告した。*Strept. faecalis* による脱アセチル化については Dolin¹⁾は diacetyl を酢酸とアセトインに分解することを報告している。しかしチオアセタゾーンの如き化合物の脱アセチル化については未だ報告が見られない。

1) Dolin : J. Bacteriol. **69**, 51(1953).