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).

従つて著者は *Strept. faecalis* R の純粋培養を行い、反応時の pH と脱アセチル化の関係及び脱アセチル化の速度について検討を行った。

先ず反応時の pH とチオアセタゾーンの脱アセチル化量の関係を検討するため pH 4~9 の各緩衝液に蒸留水で数回充分に洗滌した菌体を浮遊せしめて各 pH の洗滌菌体浮遊液を調製し、これにチオアセタゾン溶液の一定量を加え、乾燥菌量約 10 mg/cc, チオアセタゾン濃度 68 γ /cc の溶液となし 37° で 1 時間反応せしめた後 *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量を比色定量。その結果 Fig. 1 に示すように pH 7.4 でその生成量は最大値を示した。従つてこの脱アセチル化には pH 7.4 附近が最も適していることを知った。この際使用した緩衝液の中 pH 4~5 及び pH 8~9 の緩衝液は全く燐酸塩を含まぬものであるが、なお可成りの脱アセチル化が認められた。

次にチオアセタゾーンの濃度を 68 γ /cc とし乾燥菌量 10 mg/cc とした pH 7.4 の洗滌菌体浮遊液を用いて時間的にその脱アセチル化率を測定したところ Fig. 2 に示すように次第にその分解速度は減少し 40 時間後においてはほぼ脱アセチル化は完了することを認めた。

Fig. 1. Influence of pH on Deacetylation

Fig. 2. Relationship between Deacetylation and Time

洗滌菌体浮遊液にブドウ糖を添加したときは脱アセチル化が殆んど行われなことは第 4 報において述べたが、これは Fig. 1 の pH と脱アセチル化量の関係において示すように pH が酸性に傾けばその分解量は減少するので、この場合も添加したブドウ糖の酵酵により乳酸を生じ pH が酸性に傾き、このため脱アセチル化反応が進まなくなつたのではないかとと思われる。この場合の pH の変動と脱アセチル化率について時間的に測定した結果 Fig. 3 に示すように pH は時間と共に次第に酸性に傾き、それにつれて脱アセチル化の速度は 1 時間後より急に減少し 3 時間後よりは殆んど反応が進まなくなることを認めた。

なお本実験には定量法として *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる呈色を利用した比色定量法を採用した。本試薬は呈色範囲が広く本実験では抽出を行わずに呈色せしめたので *p*-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾン以外の呈色物質の存在も考えられる、従つてこれをしらべるため菌浮遊液にチオアセタゾン溶液を加える代りに水を加えてさきの検体と同様に調製したものを対照として定量を行ったが、この中には本試薬による呈色物質は認められなかつた。

Fig. 3. Influence of the Addition of Glucose on Deacetylation

以上により *Strept. faecalis* R によるチオアセタゾーンの脱アセチル化反応は pH 7.4 附近で最もよく促進され、乾燥菌量 10 mg/cc, チオアセタゾン濃度 68 γ /cc としたとき約 40 時間ではほぼ完全に脱アセチル化されることを知った。またこれにブドウ糖を添加するときは 1 時間後より反応速度は急に減少し 3 時間以後は殆んど進まなくなることを認めた。

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する。

実験の部

洗滌菌体浮游液の調製 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 *Strept. faecalis* R を36°で18時間培養した後遠心分離して菌を集め，蒸留水で数回充分に洗滌後，菌体を少量の蒸留水に浮遊せしめその1cc当りの乾燥菌量を求める。別にチオアセタゾーンの一定濃度の水溶液を調製，pH 4~9の各緩衝液に菌液及びチオアセタゾーン溶液を適当な割合に加えて全体として乾燥菌量10 mg/cc，チオアセタゾーン濃度68 γ/ccの洗滌菌体浮游液を調製，検体とした。

p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンの定量 (1) 定量法：チオアセタゾーンを加えて一定時間反応せしめた検体の洗滌菌体浮游液約1ccをとり遠心分離，上澄液0.5ccをとり，これにpH 1のClark-Lubs 緩衝液2.5ccを加え，1% p-ジメチルアミノベンズアルデヒドエタノール溶液1ccを加えて呈色せしめ，その吸光度を測定。別に対照として調製しておいたチオアセタゾーンを含有しない洗滌菌体浮游液を同様に操作してその吸光度を求め，さきに得た値から差引き，その差を *Strept. faecalis* により生成した p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンによる吸光度とし，予め作製しておいた検量曲線よりその対応する濃度を求める (AKA 光電管比色計 フィルター S 43, cell 1 cm). (2) 検量曲線の作製：p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーン 20 mg を精密に秤り蒸留水 10~20 cc を加え，これに塩酸数滴を加えて溶解，更に蒸留水を加えて全量 100 cc とし 2.0 mg% 溶液を作る。この溶液を用いて 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 mg% の溶液を作り，その 0.5 cc をとり定量法と同様に操作して検量曲線を作製。 (3) 定量法の検討：本試薬の呈色に及ぼす pH の影響を検討するため pH 0.1~6.0 に亘る各緩衝液を用いて定量法にしたがい，各 pH における吸光度を測定したところ pH 1 においてその吸光度は最大であつた。次に pH 1 の緩衝液を用いたとき，p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーン以外にこれにチオアセタゾーンが混在している場合の影響について検討するため，10 mg% チオアセタゾーン水溶液 0.5 cc について定量法と同様に操作し，その吸光度を時間的に測定，その変化をしらべたが 10 分後においてもその吸光度の変化は認められず，その吸光度は試薬による吸光度と一致。したがってチオアセタゾーンが混在するときも本定量法による p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンの測定値に対して少なくとも 10 分迄は未変化のチオアセタゾーンの影響は認められない。また 2 mg% p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーン溶液について本試薬による呈色の安定度をしらべたが 30 分後においてもその吸光度に変化は認められなかつた。

Fig. 4. Calibration Curve of
p-Aminobenzaldehyde Thiosemicarbazone

各種 pH の洗滌菌体浮游液によるチオアセタゾーンの脱アセチル化 緩衝液としては Clark-Lubs の pH 4, 5, 6 及び 7, 8, 9 の緩衝液及び pH 7.4 の磷酸緩衝液を使用。各緩衝液を用いて試験管中に洗滌菌体浮游液を調製し孵卵器に入れ 37°，1 時間保つた後直ちに遠心分離，上澄液をとり p-アミノベンズアルデヒドチオセミカルバゾーンの定量を行つた。なおこの際各検体とも pH は異なつてゐるが，その 0.5 cc に pH 1 の緩衝液 2.5 cc を加えるときは pH はほぼ 1 となり pH による呈色度の影響は殆んど認められない (乾燥菌量 10 mg/cc，チオアセタゾーン濃度 68 γ/cc)。

Table I. Amount of p-Aminobenzaldehyde Thiosemicarbazone Produced in Various pH

pH	Amount of the produced H ₂ N- -CHNHNHCSNH ₂ (γ/cc.)	Composition of buffer
4	0.2	M/5 C ₆ H ₄ < 50 cc.+M/5 NaOH 0.4 cc. (diluted to 200 cc.)
5	1.5	M/5 C ₆ H ₄ < 50 cc.+M/5 NaOH 23.65 cc. (diluted to 200 cc.)
6	7.6	M/5 KH ₂ PO ₄ 50 cc.+M/5 NaOH 5.64 cc. (diluted to 200 cc.)
7	8.8	M/5 KH ₂ PO ₄ 50 cc.+M/5 NaOH 29.54 cc. (diluted to 200 cc.)
7.4	11.6	M/15 KH ₂ PO ₄ 2 cc.+M/15 Na ₂ HPO ₄ 8 cc.
8	8.7	M/5 H ₃ BO ₃ -KCl 50 cc.+M/5 NaOH 4.0 cc. (diluted to 200 cc.)
9	7.5	M/5 H ₃ BO ₃ -KCl 50 cc.+M/5 NaOH 21.4 cc. (diluted to 200 cc.)

脱アセチル化の時間的測定 上と同様にして pH 7.4 の洗滌菌体浮游液の検体及び対照を三角コルベン中に調製。37° の孵卵器中に入れ一定時間毎によくかきまぜ、その約 1 cc をとり直ちに遠心分離、上澄液 0.5 cc をとり比色定量を行つた (乾燥菌量 10 mg/cc, チオアセタゾーン濃度 68 γ /cc), その結果を Table II に示す。

Table II. Change of the Amount of *p*-Aminobenzaldehyde Thiosemicarbazone Produced with Reaction Time

Time for reaction (hr.)	Amount of the produced $\text{NH}_2\text{--}\langle\text{C}_6\text{H}_4\rangle\text{--CHNHNHCSNH}_2$ (γ /cc.)	Rate of deacetylation (%)
1	11.6	20
3	26.5	37
6	30.3	53
20	46.6	82
40	59.1	104

ブドウ糖添加時の脱アセチル化率 検体及び対照に用いる pH 7.4 の洗滌菌体浮游液は前記同様にして調製。これに 1% の割にブドウ糖を添加。その結果を Table III に示す。

Table III. Amount of the *p*-Aminobenzaldehyde Thiosemicarbazone Produced in the Presence of Glucose

Time for reaction (hr.)	pH of test solution	Amount of the produced $\text{NH}_2\text{--}\langle\text{C}_6\text{H}_4\rangle\text{--CHNHNHCSNH}_2$ (γ /cc.)	Rate of acetylation (%)
1/2	6.0~6.2	6.9	12
1	4.8~5.0	8.3	15
3	4.0~4.2	8.9	16
24	3.8~4.0	9.7	17

京都大学医学部薬学科

U. D. C. 615.778-092.21 : 576.851.21 : 576.852.24

237. 有田隆一：チオアセタゾーンの体内変化に関する研究 (第 6 報)

チオアセタゾーンと細菌酵素製剤との併用について

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

On the Administration of Thioacetazone with Pharmaceutical

Preparation of Bacteria and Enzymes.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

It was surmised from the preceding work that lactobacilli preparations would also effect deacetylation of thioacetazone. Therefore, deacetylation of thioacetazone was examined with commercial preparation, "Lactomin powder," and it was found that the rate of deacetylation was very slight, as shown in Figs. 1 and 2. However, taking of "Lactomin powder" would effect increase of lactobacilli in the intestines and the deacetylation of thioacetazone would probably increase, which suggests that these two drugs should not be used together. Examination of the concurrent use of diastase and medicinal yeast with thioacetazone was also examined but these were found not to affect thioacetazone.

(Received March 26, 1956)

チオアセタゾーンとアミノピリン類とを併用するときには可成り毒性が増加することは既に臨牀的に知られているが、チオアセタゾーンと他の薬剤との併用の際に生ずるチオアセタゾーンの変化に関する報告は見られない。著者は第 4 報及び第 5 報において乳酸菌によるチオアセタゾーンの脱アセチル化について報告したが、乳酸菌製剤もまたチオアセタゾーンを脱アセチル化することが当然予想せられるから乳酸菌製剤による脱アセチル化につ