UDC 615.785.092.259 : 547.497.1

161. 新谷 茂：チオセミカルバジドの痙攣作用について

Shigeru Shintani : Studies on the Convulsive Effect of Thiosemicarbazide.

(Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

Examination on spasmodic action of thiosemicarbazide on mice revealed that the action is suppressed by phenobarbital, ethylurethan, and diphenylhydantoin, and also by pyridoxine, pyridoxamine, and pyridoxal. This spasmodic action was found to be increased by breeding the mice for one week on a pyridoxine-deficient diet or by oral administration of 1 mg./10 g. body weight of INAH, which would supplement the experiments of Parks and others.

(Received February 21, 1957)

種々のチオセミカルバゾン誘導体の抗結核性については多くの研究者により試みられている。チオセミカルバジド(以下 TSC と略記)そのものはその毒性が強く Dieke¹⁾は多くの実験動物においてその痙攣作用を明らかにした。Parks ら²⁾は *Tetrahymena geleii* の TSC による増殖抑制が低濃度のピリドキサミン (PAM) により回復することを見出し、それをマウスの TSC による痙攣発作に対して試みたところ、明らかに抑制されることを認めた。そしてその場合ピリドキシン (PIN) およびピリドキサル (PAL) では抑制せずしかも VB₆ 欠乏飼料で 27 日間飼育したが毒性の増大を認めなかつたと報告している。著者³⁾はさきに 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidine (OMP) によるマウスの痙攣が微量の VB₆ 群により抑制されしかもその毒性が VB₆ 欠乏飼料でマウスを飼育することにより有意に増大することを見出した。その際その実験の目安として TSC によるマウスの痙攣作用について追試したところ、Parks らの報告と異つた結果を得たのでその成績と若干の知見について報告する。

実験方法 実験動物、観察期間その他の実験条件はすべて OMP に関する実験³⁾に準じて行つた。

実験結果 1. マウスに対する痙攣作用 TSC の皮下または経口投与による投与量と痙攣作用との関係は Table I に示すようである。その最小完全痙攣発作量はマウス体重 10 g 当りそれぞれ 0.15 および 0.25 mg で、投与後 1~2 時間の潜伏時間を経て突然疾走痙攣を起し後肢強直して窒息性呼吸麻痺で死亡した。最初の発作は

Table I. Toxicity of Thiosemicarbazide

Dosage mg./10 g.	Oral	Subcutaneous
0.5	5/5* (0.9)**	5/5 (1.0)
0.25	〃 (1.4)	〃 〃
0.2	4/5 (1.7)	〃 〃
0.15	3/5 (1.8)	〃 (1.7)
0.125	0/5	3/5 (1.9)
0.1		0/5

* No. of convulsions/No. of test animals

** Latent period (hours)

殆んど致死的で大部分 4 時間以内に死亡し OMP による症状と同様であつた。試みに溶性フェノバルビタール、エチルウレタン、クロルプロマジン等の麻酔剤およびジフェニルヒダントイン、メフェネシン等の抗痙攣剤についてその痙攣抑制効果を OMP の場合と比較したところ、Table II に示すように溶性フェノバルビタール、エチルウレタンおよびジフェニルヒダントインによつて抑制されメフェネシンにはその効果を見なかつた。クロルプロマジンについては顕著な潜伏時間 (3~5 時間) の延長効果を認めたのみで抑制せずむしろクロルプロマジンの作用を阻害するようであつた。これらの関係はほぼ OMP と同様であつた。

* Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) S. H. Dieke : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **70**, 688(1949).2) R. E. Parks, Jr., G. W. Kidder, V. C. Dewey : Ibid. **79**, 287(1952).3) 新谷 : 本誌 **76**, 13, 15(1956).

Table II. Effect of Narcotics and Anticonvulsive Materials on the Convulsion caused by TSC and OMP in Mice

Materials*	Dosage mg./10 g.	Intervals**	Response**	
			TSC 0.2 mg./10 g.	OMP 5 mg./10 g.
Phenobarbital	1.0	Before 10 mins.	0/5	0/5
Ethylurethan	8.0	"	0/4	0/5
	4.0	"	1/4	3/5
	2.0	"	2/4	5/5
	1.0	"	5/5	—
Diphenylhydantoin	0.5	"	0/4	0/5
Chlorpromazine	0.1	"	5/5 (5.0) ****	5/5 (7.1)
	"	After 10 mins. and 3 hrs.	" (3.4)	2/5
Mephenesin	3.0	Before 10 mins.	5/5	3/3
	"	After 30 mins.	3/3	—

* Injected intraperitoneally

** Administered at the intervals from TSC and OMP injections

*** No. of convulsions/No. of test animals

**** Latent period (hours)

Table III. Inhibitory Effect of Pyridoxine Group on the Convulsion caused by Thiosemicarbazide in Mice

Dosage of TSC	0.5 mg./10 g.		0.2 mg./10 g.	
Dosage of VB ₆ *	PIN	PIN	PAM	PAL
1.0 (mg./10g.)	0/5			
0.5	5/5 (2.6) **	0/5		
0.2		"	1/5 (1.6)	0/5
0.1	5/5 (2.2)	"	2/5 (2.1)	2/5 (2.5)
0.05		2/5 (1.7)	4/5 (1.3)	4/5 (2.2)
0.02		5/5 (1.8)		
0.01		" (1.5)		5/5 (1.3)
None	5/5 (1.0)		10/10 (1.3)	

* Pyridoxine group injected subcutaneously 10 minutes before administration of TSC

** Latent period (hours)

2. VB₆ 群の痙攣抑制効果 TSC の完全痙攣発作量に対する VB₆ 群の抑制効果は TSC 投与 10 分前に皮下注射することによつて観察した。その結果 Table III に示すように、PIN、PAM および PAL のいずれもよく抑制し、そのうち PIN が最も強く TSC 投与量の 1/4 でも 60% の抑制率を示した。TSC の体重 10 g 当り 0.5 mg の投与では 2 倍量の PIN を要したが 1/5 量でも潜伏時間の延長を見た。またその抑制効果は Table IV に示すように経口または腹腔内投与のいずれによつても TSC 投与 1 時間前から投与後 30 分以内の時期に投与すればよくその抑制効果を示した。

Table IV. Inhibitory Effect of PIN* administered at various Intervals from TSC** Injection

Intervals	Subcutaneous	Oral
Before 60 mins.	0/3	0/3
" 30 "	"	"
After 10 "	0/4	"
" 30 "	1/3 (1.2) ***	1/3 (1.6)
" 60 "	3/3 (1.3)	3/3 (1.2)

* 0.2 mg./10 g. body weight.

** 0.2 mg./10 g. body weight, subcutaneously. *** Latent period (hours)

3. VB₆ 欠乏飼料による TSC の毒性増加 合成 VB₆ 欠乏飼料⁴⁾ で 7 日間飼育したマウスの TSC による痙攣作用をマウス 1 匹当り 1 日 40 γ の PIN を加えた VB₆ 負荷飼料で同様に飼育したマウスのそれと比較した。また OMP について認められた INAH による毒性の増大を見るため固型飼料** で飼育しながら 7 日間 INAH を体重 10 g 当り 1 mg の割合で毎日経口投与したマウスについても TSC に対する感受性の変化を検べ

4) 新谷：本誌 77, 736(1957).

た. なお OMP による成績をこれらの実験の効果の目安とした. これらの結果は Table V に示されるように, VB₆ 負荷飼料群での TSC のマウス体重 10 g 当り 0.2 mg による 30% の痙攣発作に対して, 欠乏飼料群では体重 10 g 当り 0.075 mg で 75% の痙攣発作を示し両群の間に高度の差が認められた. また INAH 連続投与群も体重 10 g 当り 0.1 mg で 75% の痙攣作用を示して負荷飼料群との差が見られた.

Table V. Effect of Pyridoxine-deficient Diet and Oral Administration of INAH upon the Convulsive Effect of TSC in Mice

Materials	Dosage mg./10 g.	PIN-deficient* Diet	INAH Administ- ration**	Control***
TSC	0.2			1/3
	0.1	3/3****	3/4	0/3
	0.075	3/4	1/3	
	0.05	1/3	0/3	
OMP	2.5			3/3
	1.0	3/3	2/3	0/3
	0.5		1/3	
	0.3		0/3	

* Fed on synthetic PIN-deficient diet for 1 week

** Oral administration of 1 mg. per 10 g. body weight of INAH per day for 1 week

*** Fed on synthetic PIN-deficient diet supplemented with 40 γ of PIN per animal per day for 1 week

**** No. of convulsions/No. of test animals

考 察 TSC のマウスに対する最小完全痙攣発作量は皮下または経口投与でそれぞれ 0.15 および 0.25 mg で 1~2 時間の潜伏時間を経て致死の疾走痙攣を起した. それは PIN, PAM および PAL のいずれによつても TSC 投与量の 1/2~1/4 量で抑制する. Parks らは PAM のみにその効果を認めているが本実験ではむしろ PIN の方がその作用が強い. また VB₆ 欠乏飼料で 27 日間飼育したにも拘わらず TSC の毒性の増大を認めていないが, 本実験では 7 日間で明らかに 2~3 倍その毒性が増加した. Parks らのこれらの見逃しの原因については明らかでない. 同じカルボニル試薬であつてもヒドロキシルアミンは PIN によりその痙攣を抑制され, INAH はむしろ相乗的であるがいずれも VB₆ 欠乏飼料によつて増大しない. この点 TSC の痙攣作用は OMP と類似している. しかし OMP の場合には PAL が最もその抑制効果が強かつた. また川島⁶⁾は *Saccharomyces carlsbergensis* の TSC による増殖抑制が PIN, PAM および PAL のいずれによつても回復しないという. なおオオアセタゾンの尿中排泄分解物としてグルクロン酸チオセミカルバゾンが知られているが⁹⁾, グルクロン酸による TSC 痙攣の抑制効果は認められなかつた.

本実験から TSC が如何なる機序で痙攣を起すかを説明することは出来ないが, 少なくとも脳幹以上にその作用点を有することはフェノバルビタールおよびジフェニルヒダントインにより抑制されることからうかがわれる. また VB₆ 欠乏による TSC 毒性の増加は脳内 VB₆ 酵素系への影響を示すものであろう. このことは西沢⁷⁾によつて示された TSC 投与による脳グルタミン酸デカルボキシラーゼの活性低下が PIN によつて正常に保たれるという実験結果からも推論される.

結 論 TSC の痙攣作用をマウスについて検討したところ次のような結果を得た.

1. その最小完全痙攣発作量は皮下または経口投与でそれぞれマウス体重 10 g 当り 0.15 および 0.25 mg であつた.
2. その痙攣は 1~2 時間の潜伏時間ののち疾走痙攣を起して致死したがフェノバルビタール, エチルウレタンおよびジフェニルヒダントインにより抑制され, メフェネシンには影響を受けなかつた. かくしてその作用点が脳幹以上にあることを推測した.
3. またその痙攣は PIN, PAM および PAL のいずれによつてもよく抑制され, そのうち PIN が最も強く TSC 投与量の 1/4 でも 60% の抑制率を示した. しかもその効果は皮下または経口投与でも TSC 投与 1 時間前から 30 分後のいずれの時期においても認められた.
4. VB₆ 欠乏飼料で 7 日間飼育するか或いは INAH を体重 10 g 当り 1 mg を 7 日間連続投与することによ

** 自家製または市販品.

5) 川島: 本誌 77, 758(1957).

6) 有田: 本誌 76, 984(1956).

7) 西沢: ビタミン 10, 532; 11, 347(1956).

りマウスの TSC に対する感受性が 2~3 倍増大することを見出した。かくして Parks らの実験に見逃しのあることを認めた。

本研究に当り終始御指導御鞭撻を賜わった岡見生産部長, 研究所長桑田 智博士, 第四部長渡辺 厚博士及び同主任研究員荒蒔義知博士に謹謝する。またチオセミカルバジドを戴いた京大薬学科高木康夫氏に深謝する。なお本研究を報告する機会を与えられた山崎試験課長に厚く御礼申し上げる。

武田薬品工業株式会社大阪工場試験課

UDC 615.361.013.85-014.2

162. 松島早苗, 難波脩一: 胎盤中の性腺刺激ホルモンに関する化学的研究 (第3報*)

胎盤より性腺刺激ホルモンの分離

Sanae Matsushima and Shuichi Namba: Chemical Studies on Placental Chorionic Gonadotropin. III. Isolation of Chorionic Gonadotropin from Human Placental Tissue.

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Manufacturing Co.**)

The chorionic gonadotropin (HCG) extracted from human placenta was obtained in nearly homogeneous state by column chromatography through Hyflo Super-Cel. However, this method of isolation was found to give a poor yield and it was difficult to obtain the product in a large amount, which made it impossible to carry out detailed studies on chemical and physicochemical properties. Further studies on its method of purification were carried out and it was found that the concurrent use of fractional precipitation by ethanol and salting-out gave human chorionic gonadotropin, thought to be homogeneous, in comparatively high yield.

(Received March 12, 1957)

胎盤よりアセトン及びエタノールを用いる分画沈澱または分画抽出により約 400 IU/mg の粗 HCG が得られること及び粗 HCG を Hyflo Super-Cel を用いるカラムクロマトグラフィーにより均質に近い HCG が得られることは既に報告した²⁾。しかし Hyflo Super-Cel を用いるカラムクロマトグラフィーによる方法は収率が悪くまた大量の製品を得るためには實際上種々の困難があり, そのため製品について詳細な化学的及び物理化学的研究を行う事が出来なかつた。そこで HCG の精製法について更に研究した結果, エタノール分画沈澱法及び塩析法の併用により比較的容易に, しかも高収率で均質な HCG を得ることが出来た。またイオン交換樹脂 Amberlite XE 64 を用いるカラムクロマトグラフィーによつて同程度の純度の HCG を得ることが出来た。

実験方法

1. 粗 HCG の製法: 第1報¹⁾において報告した pH 4.8 の 50%エタノールで抽出する方法によつた。
2. エタノール分画沈澱法及び塩析法による HCG の精製: 前項の方法によつて得られた粗 HCG を原料とし Table I 及び Table II に示す方法によつて行つた。
3. カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー: カチオン交換樹脂 Amberlite XE 64 を用い Hirs 等³⁾の方法により精製を行つて得た Na 型の樹脂を洗液が pH 7.0~7.5 になる迄水洗して使用した。吸着剤 10 g を内径 1.2 cm のガラス管に充填し, 試料 50 mg を 30 mg/cc の濃度に pH 3.5 の酢酸に溶解して展開した。次にカラムを蒸留水, 80%エタノール, 10%の酢酸ナトリウムを含有する 38%エタノールで順次に溶出した。溶出液は 3~5 cc ずつフラクションコレクターで分画し 270 m μ における紫外部吸光係数を測定して各フラクション中の蛋白濃度を推定した。その結果蛋白質を含有することが認められたフラクションは pH を 5.0 とし, エタノールを加えてその濃度を 80%とし一夜放置して生ずる沈澱を凍結乾燥した。
4. 沪紙電気泳動分析: pH 8.6, イオン強度 0.1 のベロナル緩衝液を溶媒とし, Whatman No. 1 の沪紙を

* 第2報: 本誌 76, 682(1956)。

** Shimosakunobe, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken.

1) 松島, 難波: 本誌 76, 678(1956)。

2) 松島: 本誌 76, 682(1956)。

3) C. H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein: J. Biol. Chem. 200, 493(1953)。