色針状晶 (H_2O), mp 183.5~185°. $C_{15}H_{22}O_5N_8$ 計算値 C 36.6, H 3.8, N 19.0, 実験値 C 36.75, H 3.8, N 18.7.

erythro-体 (VII) の閉環による cis-2,3-Dimethylpiperazine (IX) の合成 erythro-体 (VII) 10 g, dioxane 60 cc 及び Raney Ni 1 g をオートクレーブに入れ水素にて 1400 Lb/inch² に加圧. 190~200° に 6 時間加熱振盪. 反応後触媒を濾取し, 母液を塩酸性として減圧で濃縮. 析出する HCl 塩を NaOH 溶液でアルカリ性とし Et_2O で抽出. 常法により処理し遊離塩基 bp 165~178°, 4.5 g (収率理論の 52%) を得. 留液は直に結晶する. この結晶について tosylate をつくり, MeOH から再結晶. 無色プリズム晶, mp 136.5~137.5° の cis-tosylate (III) 及び少量の 無色柱状晶, mp 203~205° の trans-tosylate (IV) を得. それぞれ前報* に於いて合成した cis-及び trans-tosylate と混融, 融点降下を認めず.

threo-体 (VIII) の脱水閉環反応 threo-体 1.3 g, dioxane 10 cc 及び Raney Ni 0.5 g をオートクレーブに入れ erythro-体と同様にして遊離塩基 bp 160~178°, 0.7 g (収率理論の 62.4%) を得. tosylate による検索の結果, 無色プリズム晶, mp 137~138.5° の cis-tosylate (III) 及びごく少量の mp 201~203° 無色針状の trans-tosylate を得. それぞれ混融試験をして確認.

京都大学医学部薬学科

UDC 615.711 : 591.412.7 : 636.2 : 599.5

75. 守屋 寛：哺乳類の心臓筋肉中に存在する強心性物質について（第1報）

Hiroshi Moriya : Studies on a Cardiotonic Substance in Mammalian Heart Muscle. I.

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Manufacturing Co.*)

In order to find the substance present in the cardiac muscle that promotes contraction of cardiac muscles, a method for quantitative bioassay was devised using a special apparatus for perfusion of excised heart of a frog (*Rana nigromaculata*) and frog unit of effective substance was determined. The effective substance was extracted and purified by the method using acetic acid, ether, ethanol and phenol, and a sample with maximum purity of 600 U./mg. was obtained, although this substance seemed to contain still some accompanying impurities. The effective substance would not be a homogeneous. The substance responsible for its action is not a protein, is of comparatively low molecular weight, and is extremely easily soluble in water, soluble in dilute ethanol and dilute acetone, but generally insoluble in organic solvents. It is comparatively stable to heat. The substance which accelerates contraction in excised heart of a frog was not the substance that depresses dog's blood pressure that was present in the crude preparation of the former.

(Received October 2, 1957)

1920年代より Haberlandt 等¹⁾によつて各種動物の心臓筋肉中に心臓収縮促進物質が存在することが報告され、いわゆる心臓ホルモンとして知られて来たが現在迄この生物学的作用について若干の報告²⁻⁵⁾があるのみで化学的な詳細な研究は殆んど行われていない. この間に一部ではこの作用物質の本態はアデニール酸 (AMP) 或いはアデノシン 3 磷酸 (ATP) であろうと考えられたり⁶⁾, また近年に至つて Szent-Györgyi 等⁷⁾がいわゆる ATP, actomyosin 系の筋収縮の代謝と結びつけて心臓の収縮に一つの仮説を立てているが, 著者はさきに牛および鯨の

* Shimosakunobe, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken.

1) L. Haberlandt : Abderhaldens Handbuch der biologische Arbeitsmethodik 5, 237(1928); "Das Herzormon" (1930). 2) A. Weiss, et al. : Lancet 71, 320(1951).

3) H. Blömer : Schweiz. Med. Wochschr. 45, 1908(1951).

4) F.C. Lu, et al. : Rev. can. biol. 12, 423(1953).

5) E. Witzleb, et al. : Klin. Wochschr. 32, 297(1954).

6) D.W. Bennett, et al. : J. Physiol. 72, 288(1931).

7) A. Szent-Györgyi : "Nature of Life" (1948); A. Szent-Györgyi : "Chemistry of Muscular Contration" (1947).

Fig. 1. Dose-response Relationship of Heart Extract
by Perfused Isolated Frog Heart

心筋よりかかる作用物質を抽出し、水性抽出分割が確かに循環器系に作用して心臓収縮を促進する作用があること、またこの作用物質の本態が ATP, アセチルコリン, カルノシン (β -alanylhistidine) そのものではないことについてそのあらましを予報として報告⁸⁾したが、その後この有効部分の化学的精製および性質について新しい知見を得た。

Fig. 2. Assay of Concentrated Heart Extract by Perfused Isolated Frog Heart

先ず有効成分の生物学的試験方法を確立するために検討した結果、トノサマ蛙の摘出心臓を八木式を改良した方法で灌流するのが次の点で最もすぐれている事を見出した。1. 或る条件下で 2~3 時間は心搏動収縮の振幅が殆んど減衰しない。2. 或る検体の一定用量を反復用いて常にはほぼ同一の反応を示す。3. 適当な用量の範囲内では用量が異なればそれに応じてはつきり異なつた反応が現われる。ガマ蛙の心臓は比較的長時間の使用に堪えず、ゼニガメの心臓は操作上の難点があり、その他家兎、猫などを試みたが、何れも有効成分を追求するための方法としては確実性がなかつた。

Table I. Components of Perfusate

NaCl	6.0 (g)
KCl	0.3
NaHCO ₃	0.2
CaCl ₂	0.2
H ₂ O	1 L

次に有効成分を精製濃縮する標準となる製品を作製するために牛の心筋を蒸留水で 90° で抽出しエタノールを加えて濃度 60 v%にて沈澱物を除去してエキスをとしたもの (S-1) に前記の生物学的試験を行い、この 1 mg が平均してトノサマ蛙の心臓収縮促進による振幅増大の閾値を示す時、この 1 mg を 1 蛙単位と定めて (S-1) を標準品とした。また後記の粗粉末 (A) の製法によつて 50 U/mg 前後のものが常時抽出されることが判つたので、以後この粗粉末 (A) を各ロット毎に生物試験を行つたものを第 2 の標準品 (S-2) として使用した。

Table II. Yield and Purity of Crude Powders of A (Bovine) and WA (Whale)

Crude powder	Fresh organ (kg.)	Yield (g./kg.)	Purity (frog unit/mg.)
A	5.4	4.8	54
WA	1.0	4.8	24
A	5.6	5.1	50
A	3.3	4.0	54
A	3.3	7.3	45
A	3.1	4.7	60

8) 守屋: 第 75 回日本薬学会年会発表(1955)。

抽出精製に当つては、有効物質は非常に水に溶け易いので、直接中性または酸性の水性抽出を行うと効力収量は大きであつたが不純物を多く抽出し以後の精製が全く困難である、即ち心筋をアセトン、メタノールで順次処理したものから 40v %エタノールで抽出することによつて不純物を含有することが少なく効力が高いことを発見し、粗粉末 A (牛約 50 U/mg) および WA (鯨) を製した。この結果は Table II のごとくであるが鯨の場合は牛よりやや純度の悪いものがほぼ同量得られた。

Table III. Yield and Purity of Fraction AcR

Starting material		First acetic acid concentration (%)	Product		Recovery (%)	Rate of purity
(g.)	(U./mg.)		(g.)	(U./mg.)		
0.245	180	95	0.052	270	32	1.5
9.0	54	80	5.7	70~100	50~75	1.4~2
4.2	60	90	0.320	120~150	15~20	2~2.5
6.8	60	95	1.6	80	37	1.3
6.8	60	80	1.05	200	62	3.3
28.5	60	80	2.55	350	63	5.8

粗粉末 A を酢酸で抽出しエーテルで沈澱せしめたものを更に水で抽出しエタノールで沈澱させ濃縮粉末 (AcR) 100~300 U/mg を製した。この場合、酢酸の濃度と AcR の得量、純度との関係は Table III の通りであるがこれにより酢酸の抽出濃度は 80% が最適である。この他の溶媒、沈澱試薬、吸着剤に対する性質は Table IV および V の通りである。有効物質はアセトンには 33% で溶け 60% にすると沈澱し、ブタノールではその含水度に従つて有効物質が移行するが、54 U/mg 2.7 g を原料として 10 管の分液ロートで酢酸酸性ブタノール、水系による効力の分配を検討したところ有効部分は原点水層部から 81 U/mg 1.7 g のものが回収された。メタノールでは無水状態では有効成分は抽出されず、50% とした上澄液からは痕跡の効力が回収されたのみであつた。フェノールに対してもその含水度に従つて溶解するが、水・フェノール・酢酸 (1:3:16) の溶液からエーテルで沈澱させ更にエタノールで処理して 600 U/mg のものを得た。この他セロソルブ、水酸化バリウム、アニリンを用いて精製を試みたが、何れも効力の回収悪く、硫酸塩析によつて沈澱せず、ライネッケ塩、燐タングステン酸、ピクロン酸、トリクロル酢酸、酢酸バリウム等の沈澱剤を 5~50 U/mg のものに應用したが何れも効力の回収

Table IV. Fractionation by Various Solvents

Starting material		Fractionation	Product		Recovery (%)
(g.)	(U./mg.)		(g.)	(U./mg.)	
10.0	60	Ethanol 40% ppt.	1.5	135	34
				13.5	
		60% ppt. I	3.0	100	50
			2.5	75	31
3.0	60	Ethanol 50% ppt.		180	
		supn.		9	
0.5	10	Ethanol 40% supn.		50	
0.57	20	Ethanol 83% ppt.		36	
				10	
0.5	55	Acetone 33% ppt.	0.1	20	7
			0.23	72	59
0.5	55	Acetone 60% ppt.	0.15	85	46
			0.13	33	16
1.0	35	{ Butanol layer		12	
				45	
0.2	55	{ Phenol layer	0.01	27	2.5
			0.11	16~48	14~42
0.585	60	{ Acetic acid, Ether	0.025	600	43
		{ Phenol, Ethanol }			

Table V. Fractionation by Various Precipitation and Absorption Reagents

Starting material		Fractionation	Product		Recovery (%)
(g.)	(U./mg.)		(g.)	(U./mg.)	
2.8	60	Saturated Ba(OH) ₂ { ppt. supn.	0.082 1.725	15 12	0.7 12.1
1.9	60	0.9 Saturated (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5.4	0.055	trace	
1.5	54	Reinecke reagent { ppt. supn.	0.1 0.216	10~15 20	1 5.6
1.9	60	Phospho-wolframate { ppt. supn.	0.024 0.109	trace 60	 5.8
3.0	15	Picloronic acid { ppt. supn.		0.3 40	
2.3	25	Trichloro-acetic acid ppt. 5%	0.2	4	1.5
2.8	55	(Activated charcoal absorption pH 5) { 90% Acetic acid elute 50% Acetic acid elute	0.112 0.052	13 6	1 0.2
1.9	60	(Activated charcoal absorption pH 5) { 100% Acetic acid elute. Phenol-water (3 : 1) elute	0.115 0.075	45 100	4.5 8
1.5	60	(Activated charcoal absorption pH 5) { Phenol elute Phenol-water (3 : 1) elute	0.004 0.014	trace trace	
0.64	33	Alumina absorption pH 3 { not absorbed pH 7 elute	0.48 0.1	10 trace	
1.14	60	Fuller's earth absorption pH 4 not absorbed	0.84	36	44

Table VI. Relationship between Frog Unit and prehypotensive Activity

Fraction	Frog unit U./mg.	Hypotensive activity
S-1	3/4	0.5
S-1	4	1
AcR	30	0.83
AcR	180	0.05

が極めて悪かつた。次に吸着剤に対する作用は、50~60 U/mg のものに活性炭を酢酸酸性水溶液中で加えて処理したものは 90%以上の効力が吸着され、これをエタノール、酢酸、フェノールで溶出を試みたが精製効果、回収率共に不良であつた。また安息香酸では吸着されず、酸性白土、活性アルミナ、イオン交換樹脂には吸着されるが未だ精製には成功していない。またペーパークロマトグラフィーおよびセルローズを用いたカラムクロマトグラフィーを酢酸・ブタノール・水系の溶媒で行つたが、回収し得たものは何れも原料より純度が悪く収量も著しく低かつた。次に澱粉を担体とする zone-electrophoresis を試み各泳動部を抽出、生物試験を行つて 60 U/mg の原料から 90~150 U/mg のものを得たが収量は 1%以下であつた。更にセロファン膜を用いて透析を行つたが、55 U/mg のものを 50 倍量の蒸留水に 1 日、更に膜外液をとりかえて 1 日透析、翌日この膜外液を合し濃縮したものから 45~60 U/mg のものを回収、膜内液からは 75 U/mg のものを少量ながら回収した。また 4 U/mg のもの 0.5 g を 4 日間流水に透析したものの膜内液からは無効物質 60 mg を回収したにすぎず、200 U/mg のものを 17 時間 50 倍量の蒸留水に透析した膜内液からは原料と同じ純度のものを 21%回収、同じものを 5 時間 50 倍量の外液に透析したものでは純度同じく、収量 32%であつた。以上の知見から有効物質は

セロファン膜を徐々に通過する比較的分子量の小さい物質と考えられた。

蛋白質、アミノ酸の一部呈色反応では、それぞれ 1~4, 50, 70~100, 200, 350, 500 U/mg の純度のものについて観察し、buiuret 反応は 100 U/mg 以上のものは (-), ninhydrin 反応は 100 U/mg 迄のものが (+), それ以上は (±~+) となり、xanthoprotein 反応、硫化鉛反応は (-), Molish 反応は (±~+) であつた。次に 0.2~0.3% 濃度に於ける紫外吸収を測定し、45, 100, 400 U/mg のもので何ら吸収の極大をみとめることは出来なかつた。また粗製粉末中には犬の血圧降下作用がかなり存在するが、精製によつて蛙の心臓に対する収縮促進作用の純度が高くなるに従つてこの降圧性は減少し、粗製物質中にかなり著明に認められる降圧性物質と一致しないことを認めた。このことはまたライネッケ試薬で処理すると降圧性物質がライネッケ塩として濃縮されるがこれは蛙の心臓に対する作用が微弱である点からも云える。

ここに著者の得たものは未だかなりの混在物を含有し、灰分含量も 10% 前後である。更に有効フラクションの化学的な態度などから必ずしも単一物質の作用ではなくて総合的な作用であるかもしれないと思われるふしもある。しかし著者が濃縮した有効部分は循環系に対してかなり著明な効力を示し、動物実験、臨床試験による循環動態からの分析に於いても、血管拡張、心搏出量増加、心効率の向上によつて狭心症、心筋梗塞症に著明な効果があることが認められた⁹⁾。前述の基礎的性質を基にして精製法のあらゆる条件を更に検討し引続き追求する所存である。

本研究に当り終始御指導を賜つた東大薬学部伊藤教授、当研究部新延部長、松島主任研究員に謹謝し、動物試験を一部担当された当研究部平松義郎氏に深謝する。

実 験 の 部

生物学的試験方法 体重 25~35 g のトノサマ蛙の雄を注意して断頭、脊髄を破壊して心臓を露出、動脈と静脈各 1 本宛を残して結紮し摘出、静脈より栄養液を一定圧下 (20~30 mmHg) に常に新しい液が心臓を灌流するよう動脈より排出させ心搏動の状態をキモグラフ上に描記せしめた。検体及び比較用の標準品は心臓直前のカニューレの灌流液中に注入、検体と標準品と交互に行つて心臓収縮の振幅増大を測定、その高さの比較及び精度を必要とする時は増加面積を測定して統計的に比較した。

原料の採取 牛の心臓筋肉は屠殺場より入手した可及的新鮮なものを凍結して実験室へ持帰り、鯨は北洋のマッコウ鯨の心臓 (半~1 年間凍結したもの) を使用。

標準品 (S-1) の製法 新鮮な牛の心筋をミンチしたもの 100 g に対し蒸留水 500 cc で 40 分間加熱抽出し、濾過、残渣を更に 200 cc の蒸留水で抽出し濾過、濾液を合して減圧濃縮、析出物を除去後、EtOH を氷冷撹拌しながら徐々に加えて 60 v% とし、一夜冷蔵庫中に放置、翌朝遠心分離して上澄液をあつめ減圧濃縮、80° でエキスをとる。100 g よりエキスを 2.5 g を得。

粗粉末 A, WA の製法 牛及び鯨の心筋 1 kg をミンチし、アセトンを第 1 回目は 3 L, 第 2, 3 回目はそれぞれ 2 L 宛加えて室温で各半日撹拌抽出し濾過、残渣を MeOH を用いて同様 3 回抽出、残渣を空气中に放置して乾燥。この粉末 100 g に対し 40 v% の EtOH 1 L にて 4° で 1 日抽出し濾過、残渣を更に 1 回同様抽出、2 回の濾液を合して 70° で減圧濃縮、この際の析出物を除去、1 cc 当り含有物質が 20~40 mg 迄濃縮後水冷下に EtOH を徐々に加え、その濃度を 80 v% とし生ずる沈澱を直ちに遠心分離して集め、EtOH, Et₂O で順次洗浄乾燥、粗粉末 A (牛) 及び WA (鯨) を製した。

濃縮粉末 AcR の製法 粗粉末 A 1 g を 30 cc の蒸留水に溶かし AcOH を加えて濃度を 80~95% としたもの又は A 1 g を水・フェノール・AcOH (1:3:16) の溶液で 5 時間 10° で抽出したものを遠心分離して不溶物を除去したものに水冷下 Et₂O を同量加えて有効物質を沈澱させ、2 時間後に遠心分離して沈澱をとり、Et₂O で 1 回洗浄後再び 1~2% の濃度に蒸留水に溶かし AcOH を滴加して 80% 濃度とし不溶物を遠心除去、再び水冷下に Et₂O を 2/5 量加えて沈澱を集め、AcOH で 1 回、Et₂O 4 回洗浄、乾燥。これを 50 倍量の蒸留水に溶かして不溶物を除き EtOH を水冷下に滴加して 80 v% 濃度として有効物質を沈澱させ更に 1 回繰返し EtOH 60 v% 濃度の沈澱を集め EtOH, Et₂O で洗浄、乾燥。

帝国臓器製薬株式会社研究部

⁹⁾ 千葉大学第二内科、未発表。