DUC 547.826.1-234:616-002.5-085.

212. 藤原 洋: イソニコチン酸ヒドラジド誘導体の理化学的研究 (第 7 報)
イソニコチン酸ヒドラジド誘導体の水溶液中における化学平衡とその生体内における
遊離イソニコチン酸ヒドラジドとの相関関係について

Hiroshi Fujiwara: Physicochemical Studies on Isonicotinoylhydrazine Derivatives. VII.
Studies on the Relationship between Equilibrium of Isonicotinoylhydrazine
Derivatives in Aqueous Solution and Free Isonicotinoylhydrazine
Derivatives *in vivo*.

(Research Laboratories, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

As a measure of INAH liberation *in vivo*, convulsion dose (CD_{50}) by injection in normal mice was measured and this clarified the fact that CD_{50} is related to equilibrium constants between free radicals in aqueous solution of INAH-hydrazone. Compounds whose equilibrium is directed towards hydrazone formation are less likely to liberate INAH *in vivo*.

(Received February, 28, 1958)

著者は isonicotinoylhydrazone (以下 INAH-hydrazone と略) の生体内における isonicotinoylhydrazone (INAH) の遊離にもなる抗結核作用と水溶液中の平衡に相関々係を推定し、前報までに主として芳香族の INAH-hydrazone の水溶液中における加水分解の平衡の機構を究明した。また INAH の毒性については Benson¹⁾ らが詳細に研究しており、阿多²⁾ らはビタミン B₆ との相乗作用を検討したが、いずれもマウスについて特異な全身痙攣を起し呼吸困難で死亡することを認めた。新谷³⁾ も 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMP) のマウスに対する痙攣作用について詳細に検討し、INAH も全く同様の作用があることを認めた。著者はこのマウスに対する INAH の特異な痙攣発作の現象が INAH-hydrazone の生体内における INAH 遊離の尺度になり得ると考え、種々の INAH-hydrazone について正常マウスにおける 50% 痙攣発作量 (CD_{50}) を測定した。本報では CD_{50} と INAH-hydrazone の水溶液中における遊離の塩基の間の平衡恒数 (K_0) の相関関係について検討した。

INAH-hydrazone の平衡恒数 著者は現在抗結核剤として用いられている pyruvic acid INAH-hydrazone の他に glucose INAH-hydrazone, benzylideneacetone INAH-hydrazone について種々の pH の緩衝液中における加水分解の平衡恒数を測定し、pH と平衡恒数との関係を求めた。また次項の動物実験の結果を比較するため glucuronic acid INAH-hydrazone の K_0 のみを測定し、 4.89×10^{-2} を得た。前報で述べたように INAH の定量のみでこの平衡系の平衡恒数を算出するには INAH の呈色反応が平衡系の他の化合物に何等作用しないことおよび平衡系以外の副反応の生じないことが必要である。前者について検討したところグルクロン酸およびブドウ糖がアルカリ性で 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) によつてわずかに赤色に呈色する。しかしそれには約 30 分という長時間を要し、著者が第 5 報で述べたような 5 分以内に INAH の定量を完了する方法によれば何等障害にならない。後者については副反応としてカルボニル化合物の分解が考えられるので平衡恒数の測定と同一条件でブドウ糖、ピルビン酸、benzylideneacetone およびグルクロン酸の安定度を調べ、平衡恒数の測定においてこれらの化合物の分解反応が起らないことを確かめた。glucose INAH-hydrazone の平衡に至る速度はきわめて遅く、30°, pH 5.00 の緩衝液中で約 30 時間を要するので、反応系を密栓し 30° の孵卵器に保存した後電気恒温水槽に移して INAH を定量した。

INAH の定量によつて上記化合物の水溶液中における平衡恒数を算出し得ることが確かめられたので、Table I

- 1) W. M. Benson, P. L. Stefk, M. D. Roe: Am. Rev. Tuberc. **65**, 365 (1952).
- 2) 阿多, 田中, 磯, 白谷: 科学 **22**, 587 (1952).
- 3) 新谷: 本誌 **76**, 13 (1956).

に示す pH の平衡恒数を測定し, 前報と全く同様の方法で測定 pH の平衡恒数の計算値を算出し測定値と比較した。

Table I. Comparison between Observed and Calculated K-Value in Hydrolysis of various INAH-hydrazone at different pH of Buffer Solution at 30°

Glucose INAH-hydrazone

pH	K ($\times 10^{-2}$)	
	obsvd.	calcd.
1.42	24.42	24.65
2.05	18.81	17.77
2.60	13.68	12.66
3.70	9.83	9.79
4.40	9.42	
5.00	9.42	

$$K_s = 1.34 \times 10^{-2}$$

Pyruvic acid INAH-hydrazone

pH	K ($\times 10^{-4}$)	
	obsvd.	calcd.
1.57	28.0	27.7
2.03	16.1	18.4
2.60	11.0	11.1
3.72	8.1	7.9
4.35	7.6	
5.00	7.6	

$$K_s = 2.60 \times 10^{-2}$$

Benzylideneacetone INAH-hydrazone

pH	K ($\times 10^{-3}$)	
	obsvd.	calcd.
1.76	16.65	16.79
2.16	14.25	14.30
2.56	12.73	12.35
3.87	9.94	9.93
4.30	9.77	
5.00	9.76	

$$K_s = 0.88 \times 10^{-2}$$

benzylideneacetone INAH-hydrazone の K_0 は benzylidene-INAH 誘導体のどれよりも大である。これは azometine 基に隣接したメチル基の超共軛によつて反応部位 (azometine 基) の電子密度が高まつたためだと考え得る。また pyruvic acid INAH-hydrazone の K_0 がブドウ糖のそれにくらべて小さいのはカルボキシル基の electron attracting な効果によつて azometine 基の電子密度が減少したためであり, glucuronic acid INAH-hydrazone の K_0 がブドウ糖のそれより小さいのはグルクロン酸の末端のカルボキシル基の感応効果によるものと思われる。

K_s についてはブドウ糖およびビルビン酸の INAH-hydrazone の K_0 と電子密度の関係によく平行しており, azometine 基の電子密度の大きい glucose INAH hydrazone の方が小さい K_s を持っている。

以上のように芳香族以外の化合物では構造と平衡恒数との関係を明らかにする法則性を求めることは困難である。しかし同系統の化合物については一応定性的に azomethine 基における電子密度と平衡恒数が相関関係にあると見做し得る。異つた系統ではこのような一元的説明が出来ない。すなわち芳香族カルボニル化合物の INAH-hydrazone は第 1, 2 報で明らかにしたように分子全体にわたつて共軛が成立し安定になるが, 本報で平衡恒数を測定したような脂肪族の INAH-hydrazone はこのようなことがないのでそれらに比較して K_0 は大きく, 水溶液中でカルボニル化合物, INAH に分解し易くなることが容易に推定できる。

CD₅₀ と平衡恒数との関係 第 4, 5 及び 6 報で平衡恒数を測定した INAH-hydrazone についてマウスに対する経口及び皮下注射による CD₅₀ を測定した。測定試料のうち痙攣作用を現わさなかつたものは furfurylidene-INAH, glucose INAH-hydrazone, benzylidene-INAH, *p*-dimethylaminobenzylidene-INAH, *p*-methoxybenzylidene-INAH であり, 皮下注射ではまったく発現しなかつた。またこの作用を現わしたものは *p*-aminobenzylidene-INAH, glucuronate INAH-hydrazone および pyruvic acid INAH-hydrazone であつた。そのうち furfurylidene-INAH 及び benzylidene-INAH はそれぞれ経口投与による LD₅₀ が 700 mg/kg, 5000 mg/kg であつたが, furfural のそれは 750 mg/kg で INAH 特有の痙攣作用を示さないもので, カルボニル化合物の毒性によることが確かめられた。また痙攣作用を示した INAH-hydrazone については対応するカルボニル化合物がこ

のような現象を示さないことから生体内における INAH への分解に基因することが確かめられた。痙攣作用を示した INAH-hydrazone の CD_{50} および平衡恒数を Table II に示す。

Table II. Relationship between CD_{50} and K_0

INAH-hydrazone	CD_{50} mg/kg	K_0
<i>p</i> -Aminobenzylidene-INAH	600.2	19.0×10^{-4}
Glucuronate INAH-hydrazone	668.1	48.9×10^{-3}
Pyruvic acid INAH-hydrazone	936.6	7.6×10^{-4}
INAH	227.3	—

Table II からわかるように CD_{50} と K_0 とはほぼ平行関係にあり、 K_0 が大きいほど CD_{50} は小さい。すなわち平衡恒数の大きいほど生体内における INAH の遊離量は大きい。しかし痙攣作用の発現しなかつた中に若干の例外がある。*p*-dimethylaminobenzylidene INAH と glucose INAH-hydrazone である。*p*-dimethylaminobenzylidene-INAH の K_0 は pyruvic acid INAH-hydrazone より大きく 10.5×10^{-4} であるが酸性で K は小さくなり、pH 2.60 で 2.53×10^{-4} をしめす。このためにマウスに対する INAH の痙攣作用が現われなかつたものと考えられる。glucose INAH-hydrazone は平衡に至る速度が著るしく遅いので生体内においても痙攣作用を現わすほど INAH を遊離せず、glucose INAH-hydrazone のままで排泄されるためである。著者が平衡恒数を測定した INAH-hydrazone のうち最も平衡に至る速度の遅かつた furfurylidene-INAH に比較すると Fig. 1 のようになり、glucose INAH-hydrazone の方がはるかに遅い。即ち furfural, ブドウ糖のおおのに同量の INAH を加え pH 4.50 の furfural, INAH 混液およびブドウ糖, INAH 混液を調製し、40° における INAH の時間変化を測定した。これらの反応系は正逆反応が同時に行われるが、反応初期ではほぼ hydrazone 形成の速度で律せられるから両反応の比較は可能である。

Fig. 1. Process of Formation of Furfurylidene-INAH and Glucose INAH-hydrazone in Buffer Solution of pH 4.5 at 40°

INAH	0.000302 M
Furfural	0.000312 (Solid Line)
INAH	0.000302
Glucose	0.032 (Broken Line)

著者の実験で INAH-hydrazone が経口投与でのみ痙攣作用が発現し、皮下注射では測定範囲内で発現しなかつたのは INAH-hydrazone の生体内の INAH 解離が主として消化管におけるものであると推定し得るが、その解離の度合と平衡恒数が平行関係にあることは興味のあることである。またこれらの結果から INAH-hydrazone の経口投与における毒性が INAH に比べて低いのは主として INAH 遊離の度合に基因すると見做し得る。

INAH-hydrazone が生体内で INAH と同じ挙動を示すことは尾崎⁴⁾ によつて明らかにされた。また堂野前、伊藤⁵⁾ は INAH-hydrazone が生体内で INAH を遊離して薬効を発揮することを認めている。このことから直ちに INAH-hydrazone に INAH 以上の薬効を期待できないと即断するのは早計であり、その生体内挙動を定量的に検討することによつて特異性が期待できる。しかし少なくとも INAH-hydrazone の抗結核作用と INAH 遊離の度合とに相関関係のあることは推定でき、本報で明らかにしたように K_0 と INAH 遊離の度合の相関性は INAH-hydrazone を抗結核剤として応用するとき、任意の度合の INAH 遊離の薬剤の選択を可能にするであろう。

終りに御鞭撻を賜つた所長桑田 智博士、部長渡辺 厚博士に謹謝し、有益な御助言を賜つた山岸正治博士、神沢得之助博士に深謝する。また実験の一部を担当された新谷 茂氏、アゾトメトリーを施行された横尾 亮氏および実験に協力された岡本千鶴子嬢に感謝する。

4) 尾崎：生化学 27, 696 (1955). 5) 堂野前、伊藤：未発表。

実 験 の 部

試 料 ブドウ糖：注射用ブドウ糖をアゾトメトリーで定量した結果純度 99.8% を示した。benzylidene-acetone：和光純薬製のもの、ピルビン酸：和光純薬製品を蒸留して得た bp₁₄ 72~80° のもの。グルクロン酸：中外製薬のグロンサンをメタノールから再結晶して用いた。INAH：前報に記載したもの。pyruvic acid INAH-hydrazone：ピルビン酸 4 g 及び INAH 5 g を MeOH 50 cc に溶かすと結晶が析出。これを MeOH でよく洗浄し濾取。mp 203~208°。

glucuronate INAH-hydrazone：中外製薬のヒドロクサンを MeOH から 3 回再結晶。

カルボニル化合物の安定度 前報と同様にブドウ糖、ピルビン酸、グルクロン酸および benzylideneacetone の pH 1.50 および 5.00 の緩衝液について 30° における安定度を検討した (Table III)。

Table III. Stability of Glucose, Benzylideneacetone, Pyruvic Acid, and Glucuronic Acid in Buffer Solution of pH 1.5 and 5.0

Compound pH	Glucose		Benzylidene- acetone		Pyruvic acid		Glucuronic acid	
	1.5	5.0	1.5	5.0	1.5	5.0	1.5	5.0
time (hr)	(mg/cc)	(mg/cc)	(γ/cc)	(γ/cc)	(mg/cc)	(mg/cc)	(mg/cc)	(mg/cc)
0	130	131	991	989	2.71	2.68	32	33
5	—	—	990	990	2.68	2.71	32	32
20	130	132	—	—	—	—	—	—
30	130	130	—	—	—	—	—	—

Table IV. Convulsant Effect* of various INAH-hydrazone in Mice

Dosage (mg/kg)	2000	1000	700	500	300	200	150
INAH sc.	—	—	—	—	3/5	1/10	0/10
Oral	—	—	—	—	10/10	4/10	0/10
Furfurylidene-INAH							
Oral	—	10/10**	2/5**	—	—	—	—
Glucose INAH-hydrazone							
sc.	—	0/10	—	0/5	0/5	0/10	—
Oral	0/5	0/5	—	0/3	—	—	—
Benzylidene-INAH							
Oral	—	1/5**	—	0/5	—	—	—
p-Aminobenzylidene-INAH							
Oral	—	5/5	3/5	2/5	—	—	0/5
p-Dimethylaminobenzylidene-INAH							
Oral	—	0/4	—	0/4	—	—	—
p-Methoxybenzylidene-INAH							
Oral	—	0/5	—	0/5	—	—	—
Glucuronate INAH-hydrazone							
Oral	—	5/5	3/5	0/5	—	—	—
sc.	0/5	—	—	0/5	—	—	—
Pyruvic acid INAH-hydrazone							
Oral	5/5	6/10	—	0/5	—	—	—
sc.	0/5	—	—	0/5	—	—	—
p-Aminobenzaldehyde							
Oral	—	0/5	—	—	—	—	—
Furfural							
Oral	—	4/4**	—	0/2	0/2	—	—
Glucuronic acid							
Oral	—	0/5	—	—	—	—	—
Pyruvic acid							
Oral	—	0/5	—	—	—	—	—

* No. of convulsion/No. of test animal.

** Specific symptom except convulsion.

ブドウ糖および benzylideneacetone の定量はアゾトメトリーによつた。またビルビン酸の定量は紫外外部吸収スペクトルの吸収極大が $322\text{m}\mu$ ⁶⁾ にあるところからその波長の吸光係数を測定して定量した。グルクロン酸の定量には Fehling 氏液を用い、Bertrand 法に準じて定量し、その還元力を比較した。

平衡恒数の測定 いずれも INAH およびカルボニル化合物の混液を 30° に保ち、平衡時の INAH を定量して平衡恒数を算出した。benzylideneacetone、ブドウ糖、グルクロン酸およびビルビン酸の INAH-hydrazone はそれぞれその平衡恒数が大きいので前報の濃度では INAH の反応開始時と平衡時の濃度変化が少く、正確な平衡恒数の測定ができない。著者は INAH の濃度を前報の通りとし、ブドウ糖では 0.02 M 、ビルビン酸では 0.003 M benzylideneacetone では 0.002 M で平衡恒数を測定。

CD₅₀ の測定 実験動物として dd 系のマウスを用い、新谷が OMP の痙攣作用を検討した方法で CD₅₀ をしらべた。すなわち Table IV に示すように INAH-hydrazone 2000 mg/kg 以下について経口または皮下注射（水に易溶なもののみ）による痙攣現象を観察し、Behrens 法によつて CD₅₀ を算出した。

また痙攣作用以外の特異な症状を示した benzylidene-INAH, furfurylidene-INAH についてはその原因を追及するため furfural を、痙攣作用を示した INAH-hydrazone に対してそれが体内に遊離した INAH に基因することを確かめるためにそれに対応するカルボニル化合物について同様の実験を行った。

furfural によるマウスの死亡現象は経口投与後 1~2 分で四肢麻痺し、呼吸困難となり 5 分後心臓停止し斃死する。furfurylidene-INAH 及び benzylidene-INAH でも同様の現象が認められ、INAH による痙攣を伴う斃死と明瞭に区別し得る。

以上のことから INAH-hydrazone のマウスにおける痙攣現象は経口投与後体中で INAH が遊離するためであることを明らかにし得た。

武田薬品工業株式会社研究所

6) “実験化学講座 I 基礎技術 I (上)” 135 (丸善)。

UDC 615.785:577.158

213. 藤村 一, 大幡勝也: 薬物の中樞興奮作用とアミノオキシダーゼ活性及び脳組織呼吸に及ぼす影響について

Hajime Fujimura and Katsuya Ohata: Effect of Brain Tissue on Amine-Oxidase Activity and Respiration in Presence of Several Analeptics.

(Ogiu Laboratory, Institute for Chemical Research, and Department of Pharmacology, Medical Faculty, University of Kyoto*)

Relationship between awakening effect and inhibitory action of amine-oxidase activity of a drug, discovered by Mann, Quastel, and Ohta, was examined systematically by the use of analeptics, such as methylpropamin, dimethylpropamin, and 2-(3,4-methylenedioxyphenyl)isopropylamine, and a series of other pharmaceuticals. Further examinations were made on the possibility of the use of this point as a supplementary means in the judgement of potency of awakening effect, which is difficult to be obtained from animal tests. At the same time, effect of these pharmaceuticals on brain tissue respiration was tested with a rabbit. Majority of these pharmaceuticals indicated inhibitory action on amine-oxidase activity in greater or lesser degree and the levorotatory compound of analeptics, which does not indicate awakening effect in human body, inhibited amine-oxidase activity, same as dextrorotatory compound. It was found that the correlation between awakening effect and inhibition of amine-oxidase activity was exceptionally weak. At the same time, these pharmaceuticals indicated weak inhibitory action on tissue respiration but there seemed to be no correlation between that and awakening effect.

(Received February 28, 1958)

薬物の中樞興奮作用特に覚醒効果は動物では主としてその運動興奮、催眠薬に対する拮抗等によりその一部を窺い得るに過ぎない。著者等は人の正常な睡眠を抑制し、覚醒を招来する薬物の効果と動物におけるこの作用との関

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.