のごとき酵素類) への影響であるかについては引き続き検討中であるが, 混合期間の差でその効果に著しい相違が現われる事実は INS 分子へのキノン類の直接的な働きかけということをその一因と考えることができる。PZI の場合は QM, BQ が複雑に反応して INS 単独の場合と異なった反応を行なっているものと考えられる。

結 論

インシュリン (INS) ならびにプロタミン亜鉛インシュリン (PZI) におよぼすキノン類の影響について実験を試みつぎの結論を得た。

1. 種々のキノン類 (Table I) はその単独投与では投与法の如何にかかわらずウサギの血糖量には全く影響を与えなかった。
2. *p*-benzoquinone を INS と同時に皮下投与した場合 INS の効果にほとんど影響を与えなかった。しかし quinone monooxime methyl ether (QM) と同時に皮下投与した場合 INS の下降効果にはほとんど影響しないが作用持続時間を著しく延長した。
3. BQ と PZI と同時に皮下投与した場合, PZI の下降効果を著しく減弱させた。しかるに QM を PZI と同時に皮下投与した場合は下降効果にはほとんど影響しないが作用持続時間を著しく延長させた。
4. BQ を INS と混合した場合, 混合期間の経過と共に次第に下降効果を減弱させた。しかるに QM を INS と混合した場合は時間経過に伴なって下降効果, 作用持続時間も共に増強させた。
5. BQ あるいは QM を PZI と混合した場合, 混合期間の経過と共にその下降効果を減弱させた。

稿を終るにのぞみ御助言をいただいた本学薬学部 加瀬教授ならびに教室員の協力に深甚の謝意を表します。

熊本大学薬学部

UDC 547.567 : 616.153.45-085

113. 植木 寛, 林 清五郎: キノン誘導体のインシュリン, グルカゴン,
インシュリナーゼにおよぼす影響 (第2報^{*1}) キノン誘導
体のグルカゴン血糖上昇作用におよぼす影響

Hiroshi Ueki and Seigorō Hayashi: Influence of Quinone Derivatives on Insulin,
Glucagon, and Insulinase. II. Influence of Quinone Derivatives
on the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kumamoto^{*2})

Hyperglycemic activity of extracted crude glucagon, glucagon contained in protamin-zinc-insulin, and amorphous pure glucagon was strongly inhibited by quinone monooxime methyl ether, *p*-benzoquinone, toluquinone, xyloquinone, 2-methylnaphthoquinone, and xyloquinone-diaminoguanidone. The inhibition was stronger, the longer the period after mixing with glucagon. On the other hand, no such inhibition was effected by hydroquinone and BZ 55, the internal medicine for diabetes. These facts suggest that the quinones have a direct effect on the glucagon molecule.

(Received July 18, 1961)

グルカゴンはインシュリンが膵臓のランゲルハンス氏島の β 細胞より分泌されるのに対して同じく α 細胞より分泌され, 血糖上昇作用を有することは周知の通りである。ランゲルハンス氏島より分泌されたグルカゴンは肝臓に達して, ここでグルカゴンの作用で血中にブドウ糖が放出される。またインシュリンは末梢の筋肉まで到達してブドウ糖の利用を起こす。この場合お互いにそれぞれの作用に対して抑制的な作用はない。また最近では,

^{*1} 第1報: 本誌 82, 648(1962).

^{*2} Ōe-machi, Kuhonji, Kumamoto.

グルカゴンはフォスホリラーゼ活性の亢進を通じて肝グリコーゲンの分解を促進し, 高血糖をきたすが, 筋グリコーゲンに対しては合成的に働くといわれている.¹⁾ このようにグルカゴンは本質的にはむしろインシュリンの協調ホルモンであり, 構成アミノ酸もインシュリンと, 2~3種の相違があるにすぎない. 第1報^{*1}で quinone monoöxime methyl ether がインシュリンの血糖下降効果およびその持続時間に大きな影響を与えることが判かったので, 本報ではキノン類のグルカゴンに対する影響について検討を加えた.

実験材料および方法

動物 第1報^{*1}と同様家兎は 2.5~3 kg のものを使用した. 一群 3~5 匹とし使用前 12 hr 絶食させた.

被験薬物 *p*-benzoquinone, quinone monoöxime methyl ether (QM), toluquinone, xyloquinone, N,N'-diguaniaino -2,5-dimethyl-*p*-benzoquinone diimine 2-methyl-1,4-naphthoquinone, hydroquinone いずれも 1 mg/cc の割合で生理食塩水に溶解した.

基準薬物 i) N₁-sulfanilyl-N₂-butylcarbamide (BZ55) (Hoechst 社製品) は 5% Na₂CO₃ 溶液に 100 mg/2 cc の割合に溶解.

ii) 粗グルカゴン抽出は Kimball, Mulin の方法²⁾で行なった. まず馬の脾臓 100 g を 400 cc の 0.2N HCl で抽出し, 抽出液を NH₄OH で中和, 5 容の 95% EtOH を加えて生じる蛋白質の沈殿を除き, 15~20° で減圧濃縮, ¹/₁₀ 容とする. これを CHCl₃ で脱脂後, 再び同容の EtOH を加えて減圧濃縮, 水道水で 18 hr 透析する. これに 5 容の Me₂CO を加えて沈殿させ, 4 hr 放置後, 濾過, EtOH で充分抽出, EtOH を減圧で留去, エキスを得る. 上記の方法で抽出を行なった場合に透析前の区分で充分血糖上昇作用が認められ, 最終段階の水エキスをおよび抽出残渣には上昇作用が明確に認められなかった. 爾後は専ら透析前の EtOH 減圧濃縮液を用いて以下の実験を行なった.

iii) プロタミン亜鉛インシュリン中混在グルカゴン (PZIG) 5 U/kg 静脈投与後より 10~15 min にわたって 10~15% の血糖上昇作用を示す. (清水製薬製品)

iv) 無晶性純グルカゴン (Tornot 大学研究室製品) 1 γ/0.1 cc の割合に減菌蒸留水に溶解させた.

混合液の作成 混合放置は常に 1° で行ない, 混合比はその都度示した.

実験方法 実験はつぎの順序で実施した. まず抽出粗グルカゴンに対する種々のキノン類の影響を調べ, ついで同様に PZIG について実験を行ない, 特に QM については詳細に混合時間を変化させ, また BZ55 のグルカゴンに対する影響を比較した. 最後に純グルカゴンに対して上記と同様の実験を行なった. 投与方法は常に耳静脈内注射によった. 血糖測定法は第1報^{*1}と同様 Hagedorn-Jensen 氏法³⁾を使用した.

実験結果

結果の表わし方は第1報^{*1}と同様である.

粗グルカゴン抽出液に対するキノンの影響 QM の影響 グルカゴン粗抽出液を単独静脈注射すると 5 min で 125 mg%, 10 min で 130 mg% に上昇しピークに達し, 15 min には元に復してその後は夾雑するインシュリンの下降作用が現われた. これに QM 2 mg/kg を混合直後投与したがほとんど上述の対照曲線との間に著明な差異は認められなかった. つぎに混合したものを 1° 24 hr 放置後投与した場合, 5~10 min 後の上昇値は 110 mg% 程度に抑制されて 20 min 後には元に復し, その後はインシュリンの下降作用が現われ, 著しくグルカゴンの血糖上昇効果を抑制する作用が認められた (Fig. 1).

Fig. 1. Influence of Quinone Monoöxime Methyl Ether (QM) on the Blood Sugar Increasing Action of Crude Glucagon Extract (mean of 5 rabbits)

その他のキノンの影響 グルカゴン粗抽出液単独投与の曲線は投与後 5 min で上昇し, 130 mg% に達して 20 min 後に元の値に復した. *p*-benzoquinone: 混合して 1° に 24 hr 放置したものは対照曲線とほとんど差異なく, この化合物は何ら影響をおよぼさなかった. toluquinone: ピーク上昇値を 5 min 後 110 mg%

1) 辻, 他: 総合臨床 8, 97(1959).

2) C. P. Kimball, J. R. Mulin: J. Biol. Chem. 58, 342(1923).

3) “第6改正日本薬局方注解” 791(1952) 南江堂.

程度に抑制し、10 min 後にはすでに元の値に復し、その後は夾雑インシュリンの効果が現われた。 **p-xyloquinone** : 血糖上昇効果を全く消失させ、10 min 後までは 100 mg% に保たせ、その後はインシュリンの効果が現われた。構造的には相似ているキノン類でもその作用には上述の如く差異が認められた (Fig. 2).

Fig. 2. Influence of other Quinone Derivatives on the Blood Sugar Increasing Action of Crude Glucagon Extract (mean of 3 rabbits)

PZIG におよぼす種々のキノンおよび **BZ55** の影響 **QM** の影響 **PZIG** 単独投与の場合投与後 10 min で 120 mg% に血糖は上昇する。これに比して **QM** を混合した場合はいずれもグルカゴンの血糖上昇作用を完全に抑制している。しかもこれらは混合後の時間とは無関係である (Fig. 3).

Fig. 3. Influence of Quinone Monooxime Methyl Ether (QM) on the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon contained in Protamin-Zinc-Insulin contaminated (PZIG) (mean of 3 rabbits)

BZ55 の影響 **PZIG** 単独投与および **PZIG** に 5% Na_2CO_3 溶液を混合投与した場合、いずれも同じような曲線を得た。すなわち投与後 10 min で 120 mg% に血糖は上昇し、15 min 後には元に復し、その後はインシュリンの作用が現われた。このように 5% Na_2CO_3 溶液は全くグルカゴンの血糖上昇作用に影響をおよぼさないことが判ったので、つぎに **BZ55** をこの溶液に 50 mg/cc の割合で溶解し、**PZIG** と混合直後投与した場合、100, 300 mg/kg 共にグルカゴンの上昇作用を 105 mg% に押え、15 min 後にはすでに血糖下降作用が現われた。**BZ55** 単独投与では、投与後 5 min よりすでに下降作用が現われ、10 min 後には 85 mg% 程度になった (Fig. 4).

Fig. 4. Influence of BZ55 on the Blood Sugar Increasing Action of PZIG (mean of 5 rabbits)

無晶性純グルカゴンにおよぼす種々のキノンおよび **BZ55** の影響 グルカゴン水溶液の変化について グルカゴン 2 γ /kg 溶解直後投与した場合、15 min 後には 160 mg% に血糖は上昇し、60 min 後まで続く。こ

れが溶解後 7 日経つとピーク値が約 130 mg% になり, さらに 10 日後には 4 倍量の 8 γ /kg 投与してこれと同程度になり, 22 日後になると 8 γ /kg 投与で約 125 mg% のピーク上昇値を示すようになった. インシュリンは同様に放置しても効力に変化がないのに比較して著しく異なる点である (Fig. 5).

Fig. 5.
Decrease of Activity in Aqueous Solution of Glucagon
(mean of 5 rabbits)

----- glucagon (2 γ /kg.), immediately after preparation
— glucagon (2 γ /kg.), after storage for 7 days
..... glucagon (8 γ /kg.), after storage for 10 days
- · - · - glucagon (8 γ /kg.), after storage for 22 days

QM の影響 グルカゴン単独投与の場合, ピーク上昇値が 160 mg/kg であるのに対して, QM 混合直後では約 145 mg% にピーク値は低下するが, 30 min 後でも 130 mg% であり, これは対照曲線の 115 mg% より幾分高い. これが混合後 4 hr のものを投与すると, 10 min で約 110 mg% のピーク上昇値を示し, 20 min には 90 mg%, 30 min には 85 mg% と若干下降効果も出現し, 著しく上昇作用は抑制された. これらのことはグルカゴンと QM の直接的な反応が一因となってその効果が現われたと考える (Fig. 6).

Fig. 6.
Influence of Quinone Monooxime Methyl Ether (QM) on
the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon
(mean of 5 rabbits)

----- glucagon (2 γ /kg.), immediately after preparation
..... mixture of glucagon (2 γ /kg.) and QM (2 mg./kg.), immediately after mixing
- · - · - mixture of glucagon (2 γ /kg.) and QM (2 mg./kg.), after storage for 4 hr.

QM を皮下注射して 30 min 後にグルカゴンを静注した場合, グルカゴンの単独投与に比してピーク上昇値は 140 mg% となり, その後の血糖の降下も急激であって, 混合したものとは性質の異なった曲線と推定された (Fig. 7).

Fig. 7.
Influence of Quinone Monooxime Methyl Ether (QM) on
the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon

----- glucagon (2 γ /kg.), immediately after preparation
(mean of 5 rabbits)
— QM (0.4 mg./kg.) was injected subcutaneously,
then, glucagon (2 γ /kg.) intravenously 30 min.
after the first injection

その他のキノンの影響 *p*-benzoquinone: 混合直後および混合 4 hr 後の静注で, かなりグルカゴンの作用を抑制したが, QM よりその作用は弱かった. *toluquinone*: *p*-benzoquinone よりその作用は弱い. *N,N'*-diguandino-2,5-dimethyl-*p*-benzoquinone diimine: 混合直後でもかなり抑制作用があるが, 20 min 後に元の血糖値より上昇することがあり, 効果が不安定でさらに検討を要する. *hydroquinone*: 混合放置しても抑制作用は見られない. *xyloquinone* および 2-methyl-1,4-naphthoquinone: Fig. 8 に示す.

グルカゴン単独投与の対照曲線に比して, 2-methyl-1,4-naphthoquinone を混合して 4 hr 経たものは投与 10 min で 110 mg% に上昇するのみでほとんど正常値に近い値にまで抑制し, 20 min からは若干下降させる傾向があった. また *xyloquinone* の場合も同様にピーク上昇値は投与後 5 min で 105 mg% で強く上昇作用を抑制した (Fig. 8).

BZ55 の影響 グルカゴンは溶解後 3 日のものを使用したので溶解直後のものよりやや効力が弱い. グルカゴン単独投与曲線は, 投与後 10 min で 140 mg%, 20 min ではやや下って 130 mg%, 50 min で完全に元の

Fig. 8. Influence of *p*-Xyloquinone and 2-Methy-1,4-naphthoquinone on the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon
(mean of 5 rabbits)

値に復する。これに BZ55 を混合すると、直後投与の場合、4 hr 後投与の場合いずれも対照曲線とほとんど同様の経過をたどる。すなわち 10 min 後には 140 mg%, 20 min 後には 125 mg%, 40 min 後には血糖は下降し始める。この場合 BZ55 の溶媒として用いた 5% Na_2CO_3 溶液をグルカゴンと混合し、4 hr 後に投与しても全く血糖上昇作用には影響がなかった。このように BZ55 では混合時間の差によっての影響も全く見られないのは、QM で混合時間が長くなると強く上昇作用を抑制するのと著明に相違している。さらに 30 min 後に出現する BZ55 本来の血糖降下作用もグルカゴンにより何等障害をうけなかった (Fig. 9.)。

Fig. 9. Influence of BZ55 on the Blood Sugar Increasing Action of Glucagon
(mean of 5 rabbits)

考 察

いずれの場合にも QM は明かに血糖上昇作用を強く抑制した。それもグルカゴンと QM を接触させる時間が長い程、すなわち混合直後より 4 hr 後、24 hr 後の方がその抑制効果は大きくなり、QM のグルカゴン分子への直接的な働きかけ、すなわちそれは分子への結合であるかまたは分子の分解であるかを推定させた。インシュリンに対しては QM はその血糖下降効果を増強し、グルカゴンに対してはその血糖上昇効果を抑制するが、結果的には QM はこの両者の作用を血糖下降作用の増強の方向へと持つて行く。また種々のキノンについては、*p*-benzoquinone はインシュリンの場合と同様そのホルモンの効果を抑制する作用を持ち、他の誘導体についても作用の強弱はあるが上昇効果を抑制した。これに比してキノン類と異なり、アミン酸や蛋白質との結合力を有しない hydroquinone が全く抑制作用をもたなかったのは興味あることで、キノン類のアミノ酸や蛋白質との結合を推定させた。斯くのごときキノン類の効果に比して BZ55 はその上昇効果をほとんど抑制しない点、しかも混合放置しても効果が現われない点、および量的にキノン類に比して多量に用いねばならない点等から、キノン類はグルカゴンとの直接的な反応、この分子の分解および触媒的作用等が推定されるが、BZ55 はグルカゴンへの直接的影響でなくて、他の機構へ作用して結果的にグルカゴンの血糖上昇効果が抑制されたように見做されるのであろうから、作用機構は両者は全く根本的に差異があると考えられる。

結 論

グルカゴンにおよぼすキノン類の影響について実験し、つぎの結論を得た。

1. 粗製グルカゴン抽出液、プロタミン亜鉛インシュリン注射液中含有グルカゴンおよび無晶性純グルカゴンのいずれに対しても、quinone monoöxime methyl ether (QM) は血糖上昇作用を強く抑制し、グルカゴンと

QM を混合させた時間が長い程その抑制効果は強く現われた。

2. *p*-benzoquinone, toluquinone, xyloquinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone および N,N'-diguanidino-2,5-dimethyl-*p*-benzoquinone diimine 等も無晶性純グルカゴンの血糖上昇効果を抑制した。

3. hydroquinone は純グルカゴンに対して全く効果を現わさなかった。

4. BZ55 はプロタミン亜鉛インシュリン含有グルカゴンに対してはやや抑制効果を現わしたが、純グルカゴンに対しては全く抑制効果を現わさず、さらに混合して 24 hr 経過後も同様であった。

5. 純グルカゴン水溶液はインシュリン注射液と異なり、1° に放置した場合も時日の経過と共に効力が減退した。

稿を終るにあたり御助言をいただいた本学薬学部 加瀬教授、並びに終始御協力を得た教室員の各位に深甚の謝意を表します。

熊本大学薬学部

UDC 543.544.25 : 547.821

114. 亀谷富士夫, 久保田晴寿: ガスクロマトグラフィーによる有機薬品試験法の研究(第2報^{*1}) ピリジン塩基の分析

Fujio Kametani and Seiju Kubota: Studies on Gas Chromatographic Analysis of Organic Reagents. II. Analysis of Pyridine Bases.

(Faculty of Pharmacy, University of Tokushima^{*2})

It had been believed that C-22 refractory brick is not desirable as a carrier for the analysis of organic bases by gas chromatography due to tailing but a good result was found to be obtained by the use of a suitable stationary liquid phase. For this purpose, analysis of a hydrous mixture of pyridine, 2-, 3-, and 4-picoline, and 2,6-lutidine was carried out. A homogeneous mixture of 10% ethanolamine and 5% *o*-phenylphenol was coated on C-22 carrier to be used as a 2-m. column, and the foregoing five kinds of pyridine base were almost completely separated under the conditions of column temperature of 90° and Helium flow rate of 86 cc./min. In this case, water is eluted faster than pyridine that there is no need to dehydrate the sample or use a dehydration agent in the column.

(Received July 28, 1961)

ピリジン塩基, 特にピリジン, ピコリン類は医薬品製造原料として重要なものの1つであるので, 従来その分析法については種々の研究が行なわれてきたが, いずれも充分満足できる結果は得られなかった。

最近ガスクロマトグラフィーの発展にともなってその分離能が非常に高いために多くの化合物の分析に応用されている。しかしガスクロマトグラフィーではピリジン塩基は一般にテイリング現象を起しやすいために, 現在までの報告はきわめて少ない。そのいずれも固定液相には極性の強い液体を使ってテイリング現象を防止している。すなわち James 等¹⁾ は流動パラフィンに水酸化カリウムを少量添加して固定液相とし, Murray 等²⁾ はグリセリンを, Brooks 等³⁾ はトリエタノールアミン, グリセリンなどを, Decora 等⁴⁾ は hydroxyethyl trihydroxypropylethylene diamine をそれぞれ固定液相としている。また舟阪等⁵⁾ はセライトを担体としてグリ

*1 第1報: 本誌 81, 489(1961).

*2 Sho-machi, Tokushima.

1) A. T. James, A. J. P. Martin: Analyst 77, 915(1952); A. T. James: Biochem. J. 52, 242(1952).

2) W. J. Murray, A. F. Williams: Chem. & Ind. (London) 1956, 1020.

3) V. T. Brooks, G. A. Collins: Chem. & Ind. (London) 1956, 1021.

4) A. W. Decora, G. V. Dinneen: Anal. Chem. 32, 164(1960).

5) 舟阪, 小島: コールタール 11, 618(1959).