チオールおよびジスルフィド化合物の研究 (第 2 報¹⁾) 分子中にアミノ基を
もたないチオール化合物の血中レベルの定量法とその種物質
の一つとしての 2-メルカプトプロピオニルグ
リシンの吸収, 排泄研究への応用

堀内正人, 千葉剛久, 利岡誠夫, 奥村重雄

参天製薬株式会社研究部²⁾

Studies on Thiol and Disulfide Compounds. II.¹⁾ Determination of Amino Group-free Thiol Compounds in Blood and It's Application to the Studies of the Absorption and Excretion of 2-Mercaptopropionylglycine, one of Amino Group-free Compounds

MASATO HORIUCHI, TAKEHISA CHIBA, NOBUO TOSHIOKA,
and SHIGEO OKUMURA

Research Laboratory, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received December 6, 1972)

A simple method was established for the determination of some amino group-free thiol and disulfide (AGF-SH, S-S) compounds in blood. Absorption and excretion were studied by giving 2-mercaptopropionylglycine (MPG), one of AGF-SH compounds, to rats. In addition, absorption was compared among some thiol compounds.

1. All the non-protein thiols and disulfides (NPSH, S-S) in blood could be removed by passing the deproteinized solution through a column of sulfonated ion-exchange resin as they possess amino groups in their molecule. This made it possible to determine AGF-SH, S-S compound that appeared in blood.

2. Blood AGF-SH level reached its maximum 1 hr after oral administration of 100 mg/kg MPG. AGF-S-S compound also appeared in blood, and 23% of a given MPG was excreted in urine by 5 hr and urinary mercaptopropionic acid, metabolite of MPG, was less than 2% of a given dose.

3. Absorption was compared among some thiol compounds by estimation of NPSH, S-S in plasma after their administration. Intraperitoneal administration of MPG and glutathion (GSH) led to a remarkable increase of NPSH and NPS-S in plasma after 15 min, but administration of 2-(S-benzoyl)mercaptopropionylglycine (S-benzoyl MPG) resulted in a slight increase of them. Oral administration of MPG, S-benzoyl MPG and cysteine led to an increase of NPSH in plasma after 1 hr, but administration of GSH did not.

SH 基をもつ化合物のうち, 薬剤として用いられるものには, ジメルカプトプロパノール (BAL), ペニシラミン, 2-メルカプトプロピオニルグリシン (MPG), グルタチオン (GSH), システイン (CySH), N-アセチルシステインなどが知られている. これらの SH 化合物の吸収, 排泄は ³⁵S 標識法が非たんぱく性 SH 基 (NPSH) 量の測定で研究されてきた.³⁾ しかし, NPSH 量の測定では特異性がなく, また, ³⁵S 標識法では代謝産物との区別ができない. そこで, 血中の NPSH, S-S 化合物がすべてアミノ基をもつことを利用し, 分子中にアミノ基をもたない SH 化合物 (amino group-free SH, AGF-SH と略す) の血中定量法を検討した. ついで AGF-SH である MPG

1) 第 1 報: 千葉剛久, 鬼頭寛和, 薬誌, 93, 112 (1973).

2) Location: Shimoshinjo-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

3) A.L. Sheffner, E.M. Medler, K.R. Bailey, D.F. Gallo, A.J. Muller, H.P. Sarett, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1523 (1966); C.R. Ball, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 809 (1966); 寺田英夫, 内科の領域, **9**, 1 (1961); A. Lorber, C.C. Chang, D. Masuoka, I. Meachem, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 155 (1969); E.P. Cronkite, W.H. Chapman, G. Brecher, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **76**, 456 (1950).

を経口投与し、この定量法による血中移行と尿中排泄を測定した。この結果、 ^{35}S -MPG 投与実験⁴⁾と良い相関が得られた。また、GSH, CySH などの SH 化合物を投与して、血漿移行を調べた結果吸収に差がみられた。これらの結果について報告する。

実験の部

実験方法

使用化合物 MPG, 酸化型 MPG および 2-(S-ベンゾイル)メルカプトプロピオニルグリシン (S-benzoyl MPG) は参天製薬製品 (純度 98% 以上); GSH は興人製品; 酸化型グルタチオン (GS-SG) は Sigma 製品; CySH, シスチン (CyS-SCy), 2-メルカプトエタノール, 2-メルカプトプロピオン酸 (MP) およびチオグリコール酸は和光純薬製試薬特級品; 5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB), KBH_4 , チオリンゴ酸, ジチオスライトールおよび BAL は半井化学製試薬特級品を用いた。

実験条件 実験に使用した動物は体重 180—200 g の雄性ドンリュウラットで実験前 12 時間絶食した。薬物は生理食塩水に溶かし、 NaHCO_3 で中和後腹腔または経口投与した。

採血, 採尿法 血液は頸動脈を切断して採取し、尿は各時間毎に水で希釈し 10 ml として得た。

血液 AGF-SH 化合物の定量 血液 2 ml に水 3 ml と 30% トリクロル酢酸 (TCA) 1 ml を加えて遠心し上澄を得た。この 3 ml を Dowex 50 W (100—200 mesh, H型) カラム (1.0×2.5 cm) に通し、樹脂を少量の水で数回洗う。流出液のうち最初の 0.5 ml を捨てつぎの 5 ml を AGF-SH, S-S 分画とする。以下、この分画に対して Ellman 法⁴⁾を用いて SH 基量を測定する。すなわち、分画 2 ml に 0.01M DTNB エタノール溶液 (DTNB 試薬) 0.1 ml と 1.5M トリエタノールアミン (TEA) 緩衝液 (pH 8.80) 1 ml を加えて 412 m μ で比色した。

血液 AGF S-S 化合物の定量 AGF S-S 化合物を Ellman の方法⁵⁾にしたがって AGF-SH に還元し、還元前の AGF-SH 含量の差より求めた。7.3% エチレンジアミンテトラアセテート溶液 (pH 9.00) 10 ml と 1.3M NaOH 10 ml および 15% KBH_4 溶液 10 ml を混合し還元液とする。AGF-SH, S-S 分画 2 ml に還元液 2 ml を加え室温で 50 分放置する。ついで、氷冷しながら 4N HCl 1 ml を加える。20 分後 0.1 ml の DTNB 試薬と TEA 緩衝液 2 ml を加え 412 m μ で比色した。含量は次式にしたがう。AGF S-S = 1/2 (還元後の AGF-SH - 還元前の AGF-SH)。

血漿 NPSH, S-S の定量 血液を 5 分間氷冷後遠心して血漿を得る。この 1 ml に 6% TCA 5 ml を加えてろ過し、ろ液について血液 AGFSH, AGF S-S と同様に比色した。

尿 AGF-SH の定量 希釈尿 3 ml に 10% TCA 3 ml を加えて除たんぱくする。ろ過し、ろ液 1—2 ml を用いて血液 AGF-SH と同様に測定した。

尿 MPG の定量 (ニッケル法⁶⁾) AGF-SH, S-S 分画 1 ml に 5% TCA 1 ml と 10% ホウ酸溶液 (pH 9.5 に調整後, 2.4% の NaOH を加えて得る) 1 ml および 0.02M NiNO_3 溶液 0.1 ml を加えて 375 m μ で比色した。

結果

定量法の検討

1) スルホン酸型イオン交換樹脂によるアミノ基含有 SH, S-S 化合物の除去 血中の NPSH, S-S 成分は GSH, CySH, GS-SG, CyS-SCy, エルゴチオネインなどすべてアミノ基を有する。一方, SH, S-S 化合物は中性またはアルカリ性液中で容易にチオール-ジスルフィド交換反応ならびに SH 基の酸化反応をおこなう。⁷⁾ しかし、酸性液中では安定である。5% TCA 液中に AGF-SH 化合物である MPG (0.1 μM) と GSH (1.0 μM) を含む試料 3 ml を血液 AGF-SH 定量用カラムに通し、ついで、樹脂を 5% TCA 液で洗浄をくり返した結果を図 1 に示す。検出は DTNB 試薬でおこなった。MPG の流出は早く GSH は遅れて出現する。樹脂を 5% TCA のかわりに水を用いると GSH は全く出現しない。同様にして、この方法により流出液は AGF-SH, AGF S-S のみを含み、GS-SG, CySH, Cystine ならびに血液中の NPSH, S-S 化合物を含まないことが知られた。この場合、吸着したこれらの SH, S-S 化合物は 1N HCl の洗浄で直ちに溶出した。

以上の結果は、血液を TCA で除たんぱく後液性が酸性のまま、上澄中の AGF-SH, AGF S-S と生体内 SH, S-S 化合物を容易に分離できることを示す。

2) AGF-SH, S-S 化合物の定量的分離 カラムからの AGF-SH, S-S 化合物の回収率を求めた。すなわち、

4) G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).

5) G.L. Ellman, H. Cysko, *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 518 (1967).

6) 千葉剛久, 下川 健, 日本薬学会, 第 90 年会, 講演要旨集 第 IV 分冊 1970, p. 95.

7) P.C. Jocelyn, *Europ. J. Biochem.*, **2**, 327 (1967); I.M. Kolthoff, W. Stricks, R.C. Kappoor, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4733 (1955).

5% TCA 液中に各種 AGF-SH, S-S 化合物を含む試料 3 ml をカラムに通し、ついで樹脂を水洗した。流出液のうち、最初の 0.5 ml を捨て次の流出液 5 ml を分画し、Ellman 法により AGF-SH, S-S 化合物の回収率を求めた。

表 1 に示したように、MPG, 酸化型 MPG, メルカプトエタノール, チオリンゴ酸, N-アセチルシステインおよびチオグリコール酸が良い回収率を示し, BAL, ジチオスレオトルおよび 2-メルカプトプロピオン酸 (MP) は分画部の 5 ml 以後にも溶出がみられ回収率が低下した。しかし, MP の場合, 試料液 2 ml をカラムに通して 5% TCA で樹脂を洗うと良い回収率が得られた。

3) 血液からの回収 血液一定量に各濃度の MPG, 酸化型 MPG を添加し、ついで直ちに除たんぱくを行ない、血液 MPG 定量法に従い回収率を求めた。表 2 のごとく添加量に関係なく MPG では 65—70%, 酸化型 MPG ではほぼ定量的に回収された。この場合, MPG の回収率の低下は酸化型 MPG の生成によるものではなかった。

Fig. 1. Separation of 2-Mercaptopropionylglycine (MPG) and Glutathione (GSH) on a Cation-exchange Resin, Dowex 50W (H form), eluted 5% (w/v) Trichloroacetic Acid (TCA)

column: 1.0×2.5 cm

3 ml of 5% TCA solution, containing MPG and GSH, is poured in the column and Thiol compounds were eluted by 5% TCA. Initial eluate (0.5 ml) is discarded and next fractions (2 ml) are collected successively. Thiol content in each fractions is determined by Ellman's method.

TABLE I. Recovery of Thiol and Disulfide Compounds from the Column

SH, S-S compound	Added μM	Found μM	% recovery
2-Mercaptopropionylglycine (MPG)	0.310	0.311	100
1-Mercaptopropionylglycine	0.310	0.298	96
Oxidized MPG	0.157	0.150	96
Mercaptoethanol	0.384	0.371	97
Thiomalic acid	0.272	0.270	99
N-Acetylcysteine	0.317	0.317	100
Thioglycolic acid	0.419	0.412	98
Dithiopropanol (BAL)	0.195	0.117	60
Dithiothreitol	0.150	0.103	69
2-Mercaptopropionic acid (MP)	0.332	0.266	80 (98) ^{a)}

Three ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid solution, containing each compound, is poured in the column and the resin is washed by water. Initial eluate (0.5 ml) is discarded and next fraction (5 ml) is collected. Thiol and disulfide content are determined by Ellman's method.

^{a)} Two ml is poured in the column.

TABLE II. Recovery of MPG and Oxidized MPG from Blood

MPG			Oxidized MPG		
Added μM	Found μM	% recovery	Added μM	Found μM	% recovery
0.540	0.353	65	0.150	0.150	100
0.270	0.178	68	0.077	0.074	96
0.172	0.120	70	0.049	0.051	104
0.091	0.066	66	0.022	0.021	95
0	0	—	0	0	—

Fig. 2. 2-Mercaptopropionylglycine (MPG) and Oxidized MPG Levels of Rat Blood after Oral Administration of MPG

The dose is 100 mg/kg body weight. Each symbol represents the mean $\pm$ S.D. from five animals.
○—○: MPG, ×—×: oxidized MPG

Fig. 3. Urinary Excretion of 2-Mercaptopropionylglycine (MPG) and Amino Group-Free (AGF) SH, S-S Compounds after Oral Administration of MPG

The dose is 100 mg/kg body weight. Each symbol represents the mean $\pm$ S.E. from four animals.
○—○: MPG, ●—●: AGF SH, ×—×: AGF S-S

Fig. 4. Non-Protein Thiol (NPSH) and Disulfide (NPS-S) Levels in Rat Plasma after Intraperitoneal Administration of Thiol Compounds

Plasma is obtained 15 min after administration. The figures in parentheses indicate the number of animals in each group. The results are given as the mean $\pm$ S.D. □: NPSH, ▨: NPS-S

GSH: glutathione

MPG: 2-mercaptpropionylglycine

B-MPG: 2-(S-benzoyl)mercaptpropionylglycine

Fig. 5. Non-Protein Thiol (NPSH) and Disulfide (NPS-S) Levels in Rat Plasma after Oral Administration of Thiol Compounds

Plasma is obtained one hour after administration. The figures in parentheses indicate the number of animals in each group. The results are given as the mean $\pm$ S.D. □: NPSH, ▨: NPS-S.

GSH: glutathione

MPG: 2-mercaptpropionylglycine

B-MPG: 2-(S-benzoyl)mercaptpropionylglycine

CyCH: cysteine

MPG 投与による血中濃度および尿中排泄

図 2,3 は MPG 100 mg/kg を経口投与した場合の血中濃度および尿中排泄の結果を示した。血中濃度は投与後 1 時間で AGF-SH は最大値を示した。わずかの AGF S-S が投与後 1/2—1 時間に出現した。尿中へは投与後 2 時間までが最大の排泄速度を示した。投与後 5 時間で投与量の 25% が AGF-SH として排泄され、このうち、92% を MPG が占めていた。また、half SH として換算した場合、AGF S-S は投与量の 6% が 5 時間で排泄された。

各種 SH 化合物投与による血漿濃度

MPG と GSH, S-benzoyl MPG, CySH の吸収を比較した. 無投与の血液 NPSH, S-S はそれぞれ 1.207 ± 0.053 と $0.153 \pm 0.013 \mu\text{M/ml}$ である. しかし, 血漿中の NPSH, S-S はそれぞれ 0.007 ± 0.003 と $0.040 \pm 0.007 \mu\text{M/ml}$ を示し, きわめて低い. そこで, 各種 SH 化合物を投与後妨害の小さい血漿中の NPSH, S-S を測定して吸収を比較した. 測定に用いた血漿は腹腔投与群では 15 分後, 経口投与群では 1 時間後に採取した. 図 4 のごとく GSH, MPG の腹腔投与では血漿 NPSH と血漿 NPS-S の総和はほとんど変わらない. しかし, 還元型と酸化型の構成比は異なり, NPSH/NPS-S 比で示すと MPG が 2.89 に対し GSH は 0.64 となり MPG では還元型が多い. S-benzoyl MPG の投与では NPSH にわずかの上昇があった.

図 5 に経口投与による比較を示す. すなわち NPSH は MPG, GSH, S-benzoyl MPG 投与群で上昇を示した. 1.2 mm/kg の投与で比較すると MPG 投与群の NPSH を 100% とした時, 他の化合物の投与群の NPSH はそれぞれ CySH 55%, S-benzoyl MPG 123% であった. GSH 投与群では投与量を 2.4 mm/kg に増しても NPSH は上昇しない.

一方, NPS-S は GSH, MPG, CySH, S-benzoyl MPG のすべてに上昇をみるが, NPSH に比べ上昇は小さく化合物間の差も小さい.

考 察

生体中の外因性チオール化合物の定量法については, 尿中の MPG, ペニシラミンなどを自動アミノ酸分析計で分離定量した報告⁸⁾がある. しかし, ニンヒドリン試薬で定量するため, アミノ基を含まないチオール化合物に対して感度が悪く, 血中定量に用いることができない. 本法の血中 AGF-SH 定量法は血中 NPSH, S-S 化合物がすべてアミノ基を含むことを利用し, 血液を除たんぱく後, 上澄をスルホン化イオン交換樹脂に通してこれらを除去することに基づく. この方法の利点は 1. 迅速であり, また, Ellman 法により SH 基量を測定するため感度が高く, 血中定量法に用いることができる. 2. AGF-SH を分離する場合, 樹脂中のスルホン酸基と除たんぱく剤の TCA により試料の酸性を保持するため, 樹脂上で SH 基の酸化反応やチオール-ジスルフィド交換反応を抑えることができる. 3. 還元により AGF S-S が同時に定量できる点である.

AGF-SH 化合物のうち, MPG を 100 mg/kg の割合でラットに経口投与した結果は, ³⁵S-MPG 投与実験⁹⁾における ³⁵S の挙動とよい相関を示した. 投与された MPG は主に SH 型として血中に移行し, 投与後 1 時間で最大値を示した. また, 少量の AGF S-S の出現がみられた (図 2). 投与量の 23% が MPG として 5 時間以内に排泄され, MP としての排泄は 2% 以下であった. 遊離 MPG の早い排泄原因は MPG が acylglycine amido 型化合物のため, 腎での糸球体ろ過以外に尿細質からも効果的に排泄されるためと思われる.⁹⁾ (図 3).

各種 SH 化合物の投与によるこれらの血漿移行の比較では, 腹腔投与で MPG, GSH はよく移行し, 血漿 NPSH, S-S を増加させた (図 4). しかし, NPSH/NP S-S 比に差がみられた. この傾向は *in vitro* でアルブミンに MPG, GSH をそれぞれ反応させた場合にもみられた.¹⁰⁾ 経口投与では MPG が投与量に比例して NPSH を増加させた. しかし, GSH は投与量を増すと NPS-S が増加の傾向を示し, NPSH の変動はみられなかった (図 5). これは, GSH の腸管吸収が非常に遅いためと思われる.¹¹⁾ S-benzoyl MPG の投与では MPG に比べ腹腔投与より経口投与の方が大きい NPSH の上昇がみられた (図 4,5). 一般に S-アシル化合物は生体内で加水分解して SH 化合物となる. この場合, NPSH の上昇は MPG によるものであった.

謝辞 本研究にあたり発表の機会を与えられた三田彰久社長, ご指導とご協力をいただいた三田充康副社長に謝意を表します.

8) J.R. King, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **129**, 972 (1968).

9) 藤本 守, 檜垣 鴻, “薬物の生体内移行” 第 1 版, 中垣正幸編, 南江堂, 東京, 1968, p. 297; D. Schachter, J.G. Manis, J.U. Taggart, *Am. J. Phys.*, **182**, 537 (1955).

10) 堀内正人, 薬誌, 投稿予定.

11) D.F. Evered, M. Wass, *J. Physiol* (London), **209**, 4 (1970).