Chloroquine の家兎尿中排泄における塩化アンモニウムの効果

村山季美枝, 小林京子,^{1a)} 普天間 稔, 中島 章^{1b)}順天堂大学医学部中央機器分析室,^{1a)} 眼科学教室^{1b)}

Effect of Ammonium Chloride on the Excretion of Chloroquine in Rabbit Urine

KIMIE MURAYAMA, KYOKO KOBAYASHI,^{1a)} MINORU FUTEMMA,
and AKIRA NAKAJIMA^{1b)}Central Laboratory of Medical Science ^{1a)} and Department of Ophthalmology,^{1b)}
Juntendo University, School of Medicine

(Received June 17, 1976)

The effect of ammonium chloride on urinary excretion of chloroquine (CQ) was examined in the rabbit. Volume, pH and CQ content of the urine were measured every day for 2 weeks.

The animals were divided into two groups. One group of animals were given CQ diphosphate, 30 mg/kg/day (s.c.), during the 2 weeks, and one-half of these animals were given NH_4Cl (ca. 0.5 g/kg/day, oral) during the second week, when they excreted 2—4 times the amount of CQ excreted by the animals not given NH_4Cl throughout. The other group of animals were given CQ during the first week only, and one-half of these animals were given NH_4Cl during the second week. During the CQ treatment, the daily urine volume was much more variable and 2—3 times less than that excreted after cessation of CQ treatment. NH_4Cl affected neither the urine volume nor the amount of CQ excreted. pH of the urine excreted during NH_4Cl treatment (6.29—6.91) was lower than that excreted during the control period (7.25—8.57).

These results indicate that NH_4Cl facilitates urinary excretion of CQ only when given simultaneously with CQ, and may suggest a possibility that CQ caused a kidney dysfunction.

Keywords—excretion of chloroquine; effect of ammonium chloride; accumulated chloroquine; rabbit urine; urinary volume; urinary pH

一般に、体内に摂取された薬物は、代謝され排泄されるか、あるいは、そのまま排泄される。また、ある種の薬物では、臓器との親和性が強く、排泄が遅れ蓄積に至ることもある。このようにして体内に蓄積された薬物は副作用により思わぬ障害を惹き起すことがある。クロロキンは抗マラリア剤として、数十年前から用いられているが、メラニンを含む組織との親和性が強く、クロロキン網膜症がこの副作用の顕著な例として知られている。

一方、クロロキンの排泄に関する論文は、十数年前にすでに報告されているが、家兎腹腔内単一投与 (5 mg/kg) において、投与量の約 10% が 24 時間尿に排泄されている。²⁾ また、正常人経口単一投与 (250 mg/kg) において、投与量の約 10% が 12 時間内に排泄されている。³⁾ 大量投与群では、投薬中止数ヶ月から数年間にわたり排泄が認められている。⁴⁾ 以上の結果から、クロロキンは投与量の約 10% が排泄され、残る 90% は徐々に排泄され、一部が体内に残存すると考えられる。

また、クロロキンの排泄を促す薬物としては、Babel らの塩化アンモニウム、BAL 等の報告⁵⁾ があるが、実験方法、結果等は明らかにされていない。

1) Location: Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo.

2) 宮垣信海, 大阪市立大学雑誌, 9, 75 (1961).

3) 木村郁郎, リウマチ, 7, 81 (1967).

4) N.J. Zvaifler, M. Rubin, H. Bernstein, *Arthritis and Rheumatism*, 6, 799 (1963).5) P.J. Babel, E. Meyer, *Schweiz. Med. Wschr.*, 95, 1125 (1965).

著者らは、尿中へのクロロキン排泄における塩化アンモニウムの効果について、家兎を用いて実験した結果、二、三の知見を得た。

実験の部

実験材料および方法

試薬 クロロキンはドイツバイエル社のレゾヒン 5 w/v % 注射液を用い、塩酸クロルプロマジン⁶⁾はシオノギ製薬のウィンタミン 2.5 w/v % 注射液を用いた。塩化アンモニウム (NH_4Cl)、無水炭酸カリウム、ヘキサン、イソプロピルアルコールは、和光純薬の特級試薬を用いた。

動物実験 (1) NH_4Cl とクロロキンの同時投与実験——体重 2.7—3.5 kg の家兎 8 羽を用いて、 NH_4Cl とクロロキンの同時投与実験をおこなった。30 mg/kg クロロキンを連日皮下注射し、飼料および飲料水を自由に摂取させた。24 時間後に 1 羽の家兎が急性中毒により死亡した。一週間飼育後に、7 羽中 4 羽の家兎を NH_4Cl 群として、クロロキン投与と同時に NH_4Cl を経口投与した。残る 3 羽を control 群として、第一週と同様に、更に一週間飼育した。

NH_4Cl は、0.25% 水溶液として 400 ml 投与したが、この溶液は、家兎が一日に摂取する飲料水量に、利尿剤として人体に投与される NH_4Cl の一日量 (8 g) を体重 kg (60 kg) 当りに換算し、家兎体重当り等量が摂取される NH_4Cl を溶解した。家兎が実際に摂取した NH_4Cl 溶液は 150—250 ml であったが、 NH_4Cl 量としては、ほぼ摂取に必要な量であった。

(2) NH_4Cl の単独投与実験——体重 2.7—3.2 kg の家兎 8 羽を用いて、 NH_4Cl の単独投与実験をおこなった。第一週においては、8 羽の家兎に対して (1) の実験と同様にクロロキンを投与したが、第二週においてはすべてに投与を中止した。そしてこの第二週に、8 羽中 4 羽の家兎を NH_4Cl 投与群として、0.25% NH_4Cl を投与し、残る 4 羽を control 群として第一週と同様に飲料水を与えた。

採尿 14 日間、各個体について 24 時間蓄尿し、毎日一定時間に採取した。不溶物を 3000 r.p.m. で遠心除去し、上清を 24 時間尿として、尿量を測定した。

pH の測定 尿の pH は、尿量を測定した検体について、東芝ベックマン pH メーター (electromate) を用いて測定した。

クロロキンの抽出法および定量法 尿からのクロロキン抽出法および定量法は、すでに報告した著者らの方法⁶⁾を、一部改良して用いた。内部標準物質には安定性のよい塩酸クロルプロマジンを用いて、抽出溶媒には、抽出効率の良い hexane-isopropyl alcohol (3:2 v/v) を用いた。原法に準じた検量線を作成するために、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単位で希釈した 20—90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロロキン溶液各 1 ml に、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の塩酸クロルプロマジン溶液 1 ml を加え、抽出溶媒 0.5 ml、無水炭酸カリウム 2 g を加えて 1 分間混和後、クロロキンの移行した溶媒層を分取し、その 1 μl をガスクロマトグラフで分析した。尿は、検量線内濃度に分布するように調製し、分析した。

結 果

(1) クロロキンおよび NH_4Cl の同時投与実験

尿量 尿量の経日変化は、Fig. 1 に示したが、control 群、 NH_4Cl 投与群ともに著しく、数 ml から 200 ml を越えるものまで観察された。1 個体の経日変動および個体間のばらつきによるものがあり、後者に起因する差が、特に著しかった。

また、各週毎の 1 日平均尿量を算出し Table I (1) に示したが、 NH_4Cl 投与による尿量の増加傾向は示されなかった。

尿の pH Fig. 1 に示されたように、尿の pH は 5—9 の間を変動した。各週毎の pH の平均値を Table I (1) に示したが、両群における第一週および control 群における第二週の平均値は、pH 7.25—8.76 であった。一方、 NH_4Cl 投与群の第二週、 NH_4Cl 投与時の平均値は pH 6.29—6.91 を示し、わずかに酸性側にシフトした。しかしながら acidosis には至らなかった。

尿中クロロキン排泄量 尿中クロロキン排泄量の経日変化は、Fig. 1 に示した。クロロキン排泄量としては、一日の投与量に対する 24 時間尿中クロロキン量を百分率で表わした数値を用いた。

Control 群の排泄量は経日変動が著るしく、数 % から 68.3% を示した。各週毎の一日平均クロロキン排泄量を Table I (1) に示したが、個体差によるばらつきが大きく、平均値の高いものでは、28.20% を示し、低いものでは、7.45% を示した。しかしながら、第一週と第二週の間におけるクロロキン排泄量の有意差は、No. 2 の

6) 村山季美枝, 中島 章, 薬誌, 97, 445 (1977).

群の第一週および第二週における平均値の差は、4羽中2羽が $p<0.05$ で、1羽が $p<0.01$ で、1羽が $p<0.001$ で有意であった。

家兎を除いては観察されなかった。No. 2の家兎は、 $p<0.05$ において有意差がみられたが、排泄量の多い第二週の平均値が14.09%であった。

一方、 NH_4Cl 投与群の第一週におけるクロロキン排泄量は、平均値で10.02—16.93%を示し、control群に比して個体差によるばらつきが少なかった。

また、第二週 NH_4Cl 投与時におけるクロロキン排泄量は、平均値で31.70—44.50%を示した。 NH_4Cl 投与

Fig. 1. Patterns of Excreted Chloroquine (CQ), Urinary Volume and Urinary pH in Case of Simultaneous Administration of Chloroquine and NH_4Cl

No. 1—3 control group, No. 4 died, No. 5—8 NH_4Cl treated group, excreted chloroquine(—●—); urinary volume (—●—); urinary pH (---x---).

TABLE I. The Effect of Ammonium Chloride on the Volume, pH of, and CQ Content in the Rabbit Urine
(1) The Effect of Simultaneous Administration of Chloroquine and NH_4Cl

Group	No.	1 st week				2 nd week					
		Treatment CQ ^{a)}	$\text{NH}_4\text{Cl}^{b)}$	Urinary volume (ml/day)	Urinary pH	Excretion of chloroquine (% ^{c)} /day)	Treatment CQ	NH_4Cl	Urinary volume (ml/day)	Urinary pH	Excretion of chloroquine (%/day)
Control group	1	+	—	68±33	7.37±0.38	23.32±7.28	+	—	42±16	7.53±0.51	28.20±17.89
	2	+	—	168±102	8.57±0.16	7.83±1.52	+	—	104±22	8.76±0.35	14.09±6.27 ^{e)}
	3	+	—	63±39	7.47±1.00	10.84±6.16	+	—	85±40	7.58±0.91	7.45±3.86
	4 ^{e)}	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NH_4Cl treated group	5	+	—	102±45	7.81±0.59	11.91±7.61	+	+	122±26	6.29±0.53	39.61±5.59 ^{d)}
	6	+	—	210±35	7.41±0.50	14.38±2.85	+	+	147±40	6.30±0.84	31.70±11.53 ^{e)}
	7	+	—	126±46	8.08±0.45	10.02±4.65	+	+	114±33	6.91±0.69	44.15±16.92 ^{f)}
	8	+	—	55±19	7.25±1.03	16.93±14.05	+	+	63±12	6.70±0.75	34.42±11.72 ^{e)}

(2) The Effect of NH_4Cl after the Administration of Chloroquine

Group	No.	1 st week				2 nd week					
		Treatment CQ	NH_4Cl	Urinary volume (ml/day)	Urinary pH	Excretion of chloroquine (%/day)	Treatment CQ	NH_4Cl	Urinary volume (ml/day)	Urinary pH	Excretion of chloroquine (%/day)
Control group	1	+	—	58±31	7.28±1.22	15.44±21.72	—	—	101±11	8.56±0.14	1.22±1.01
	2	+	—	25±18	5.75±0.78	26.09±18.59	—	—	103±50	8.49±0.18	2.31±2.58
	3	+	—	44±45	6.97±0.93	15.22±12.71	—	—	145±33	8.30±0.14	2.69±1.83
	4	+	—	128±20	7.75±0.32	15.46±5.63	—	—	151±20	8.37±0.28	1.74±1.32
NH_4Cl treated group	5	+	—	104±50	7.99±0.70	10.81±3.77	—	+	178±39	8.09±0.23	2.93±3.13
	6	+	—	39±40	5.61±0.66	27.92±26.37	—	+	18±11	5.32±0.08	7.00±4.56
	7	+	—	84±48	7.75±1.32	15.51±23.23	—	+	145±38	8.14±0.27	1.25±0.89
	8	+	—	188±53	8.21±0.19	9.07±3.56	—	+	198±59	8.03±0.29	1.63±1.31

Each value calculated from 7 days and represented the mean±S.D.

a) Chloroquine diphosphate 30 mg/kg/day, s.c.

b) 0.25% NH_4Cl 150–250 ml/day, p.o.

c) Died.

d) Recovery percent of chloroquine in the urine $\left(\frac{\text{excretion of chloroquine}}{\text{administration of chloroquine}} \times 100 \right)$.

e) Significantly different ($p < 0.05$) from 1 st week.

f) Significantly different ($p < 0.01$) from 1 st week.

g) Significantly different ($p < 0.001$) from 1 st week.

Fig. 2. Patterns of Excreted Chloroquine, Urinary Volume and Urinary pH in Case of Single Administration of NH_4Cl

No. 1—4 control group, No. 5—8 NH_4Cl treated group, excreted chloroquine (—●—); urinary volume (—●—); urinary pH (---x---).

以上の結果から、 NH_4Cl およびクロロキンの同時投与において、 NH_4Cl は、クロロキンの排泄を促進する効果を有することが明らかになった。

(2) NH_4Cl の単独投与実験

尿量 両群における第一週（クロロキン投与）の尿量は、Fig. 2 に示される如く、著しい経日変動と全体的な減少の傾向を示した。

No. 2 および No. 6 の家兎においては、無尿の日も観察された。しかしながら、クロロキン投与を中止した第二週においては、Table I (2) に示したように、両群共に、尿量は 2—3 倍の増加を示した。

また, control 群と NH_4Cl 投与群間の尿量には有意の差は観察されず, NH_4Cl 投与による尿量の増加は, (1) の実験と同様に認められなかった.

尿の pH 両群における第一週の尿量の変動は, pH においても大きな変動をもたらした. 尿量の減少した個体の pH は低く, No. 2 においては, 平均値で pH 5.75 を示した. 一方, クロロキンの投与を中止した第二週においては, No. 6 の家兎を除いて, 尿量の増加と共に安定した弱アルカリ性の pH を示した (Table I (2)). また, NH_4Cl 投与による pH の酸性側へのシフトは観察されなかった.

尿中クロロキン排泄量 両群の各週におけるクロロキン排泄量は, Table I (2) に示したが, 第一週におけるクロロキン排泄量は経日変動が著しく, 平均値では 9.07—27.92% を示した.

No. 2 および No. 6 の家兎においては, 第一週のクロロキン排泄量が多く, 最大では, 77.9% を示すものもあった. これらの家兎は尿量が少なく, pH も極度に酸性を示し, かつクロロキン排泄量が大であった. 他の家兎においても, 排泄量の多い尿は, 酸性を示すことが多く, 排泄量と尿 pH に何らかの相関があることが考えられた. しかしながら, No. 6 の第二週にみられる如く, クロロキン量は第一週のそれらに比してはるかに少量であったが, 酸性を呈する尿もあった.

一方, 両群の第二週におけるクロロキン排泄量は, 経日的に減少し, 14 日目には 1 mg 以下の値を示した. すなわち, クロロキン排泄量は No. 6 の 7.00% を除いては, 1.2—2.93% の平均値を示し, その値は第一週の 1/10 量であった. また, control 群と NH_4Cl 投与群との間に有意の差は認められなかった.

以上の結果から, 蓄積したクロロキンに対して NH_4Cl は, 排泄促進効果を示さなかった.

考 察

NH_4Cl とクロロキンの同時投与実験および NH_4Cl の単独投与実験において, クロロキン投与下の尿量にかなりのばらつきがあった. 前者の実験では, 第一週および第二週の間に尿量の著しい差はなく, control 群および, NH_4Cl 投与群間にもその差はなかった. 後者の実験において, クロロキンの投与を中止した第二週で, 尿量が著しく増加し, 第一週の 2—3 倍の値を示した. そのうえ, 第二週の尿量の経日変動は小さく安定した値を示した. これらの事実から, クロロキンの投与が尿量の減少をもたらした, かつ, 経日的に著しい変化をもたらしたことから, クロロキンの腎機能におよぼす影響が大であることが明らかとなった.

同時投与実験において, 尿の pH は, NH_4Cl 投与時に酸性に移行し, 単独実験では, 同条件下 pH の酸性移行が観察されなかった. しかしながら, control 群においてクロロキン排泄量の多い尿の pH は, 殆んどの場合で酸性を示した. 以上の結果から, NH_4Cl 投与のために尿の pH が酸性を示すのではなく, クロロキン投与により腎機能に変化をおよぼし, 酸性尿を呈し易くなり, そのような状況のもとでは, クロロキンの排泄が促進されるのではないかと考えられた.

両実験において, control 群の尿中クロロキン排泄量は, 投与量の約 7—28% であり, すでに報告されている値の 10% より, やや高値を示した. しかしながら, クロロキン投与中止後, その排泄は経日的に減少し, 一週間後では, 1 mg 以下の値を示した. その結果, 著しい量のクロロキンが体内に著蓄されたであろうと考えられた.

一方, クロロキンの排泄を問題とする場合に, 糞便中への排泄を考慮しなければならないが, すでに報告^{4,7)}された例によれば, 尿中の約 1/6 であった. 著者らは, 家兎の糞便を粉碎し, アルカリ性でクロロホルム抽出を試み, クロロキン分析をおこなったところ, 抽出方法が適していなかったのか, 微量であるのかは明らかでないが, クロロキンの検出限界の 10 ng において, 検出することができなかった.

蓄積したクロロキンの排泄に関しては, NH_4Cl の排泄促進効果は認められなかったが, クロロキンと NH_4Cl を同時に投与した際には, control 群の約 2—4 倍のクロロキン排泄量を観察し, NH_4Cl の排泄促進効果が明らかにされた.

NH_4Cl のクロロキン排泄促進の作用機序は明らかではない.

謝辞 本研究の研究費の一部は, 厚生省特別研究費によった. ここに感謝の意を表する.