

杉浦 衛, 山本和生, 倉野紗知子: トリプトファン代謝に及ぼすPASの影響 (第1報)
PAS連続投与時におけるキサントレン酸の排泄について

Mamoru Sugiura, Kazuo Yamamoto, and (Miss) Sachiko Kurano:
Studies on the Effect of PAS on the Tryptophan Metabolism, I
On the Excretion of Xanthurenic Acid by Continuous Administration of PAS.

Fluorescent substances produced in rabbit urine by continuous administration of PAS are found to be xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid. The former acid is assumed to be the cause of PAS diabetes. The latter acid has been found out unusually in the urine.

結核に対する化学療法剤としてストレプトマイシン, イソニアジド, チオアセタゾーン, パス等が広く用いられており, なかでもパスは比較的耐性ができ難く, かつ副作用も少いので単独あるいは他の抗結核剤と併用し広く使用されている. しかしパスを連続投与すれば次第に糖尿がおき, いわゆるパス糖尿の発現することが知られており, これについて各種の説がたてられている. 即ちグルクロン酸説¹⁾, 腎性糖尿説²⁾, 腎の糖排泄出域低下による説³⁾等があるが未だその本体の究明はなされていない. そこで著者らはパス糖尿の本体を明かにするための一助としてパス連続投与時の尿中に排泄される蛍光物質の検討を行った. 即ちパスを家兎に連続投与し, その尿中に排泄される蛍光物質の変動を Crammer 法, P.P.C. 等により検索した. その結果連続投与10日頃より異常な青紫色の蛍光物質の排泄を認め, 後次第に蛍光量の増大することを観察したのでその本体を究明したところ, この物質はさきに古武⁴⁾の証明したキサントレン酸に全く一致することが判明したので次に報告する.

実験条件および実験方法

実験動物としては2 kg 前後の雄性家兎を使用, 野菜と豆腐粕で2週間飼育し, 2群に分けて実験に供した. 1群にはパスナトリウム (日新化学) を用い, 0.2 g/kg 当りカテーテルを使用して経口的に投与し, 他の1群は対照として用いた. 採尿には遮光下に褐色瓶を用い, これに安定剤として氷醋酸2.0cc, トリオール5.0cc を加え, 24時間採尿し, Crammer 濃縮法⁵⁾ 次いで P.P.C. を施行した. 即ち尿100cc を80°C 5分間温浸し, 冷後硫酸アンモンを加えて飽和し, 濾過し, 濾液に水飽和フェノール5.0cc を加えて抽出し, フェノール層を取分け, 水0.5cc を加え, 充分混和後10倍量のエーテルを加え, 1時間放置すると黄褐色の濃厚水溶液がえられる. この濃縮液を東洋濾紙 No.51 40×2cm に塗附し, *n*-Butanol, HAc, H₂O (4:1:5) を展開溶媒として展開し, 蛍光物質の分離を行った.

対照に比べて特異な蛍光を認めた Rf0.5 の物質, Rf0.82 の物質は前記濃縮液を40×40cm の東洋濾紙 No.51 の一辺より7cm の部位に一直線に塗附し, さきと同様に展開した後蛍光物質の分別帯をそれぞれ帯状に切りとり, 一端を水に浸して蛍光物質を溶出した. かくして得られた蛍光物質の溶液を減圧濃縮し, 再び40×40

- 1) 楠: 臨床と研究, **33**, 10, 1072-1077 (1957).
- 2) 館石, 上西: 治療, **35**, 532 (1953).
- 3) 笹井: 東京女子医科大学雑誌, **24**, 6 (1954).
- 4) 古武: 生化学, **28**, 1 (1956); 生化学, **29**, 795 (1957).
- 5) J. L. Crammer: Nature, **191**, 349 (1948).

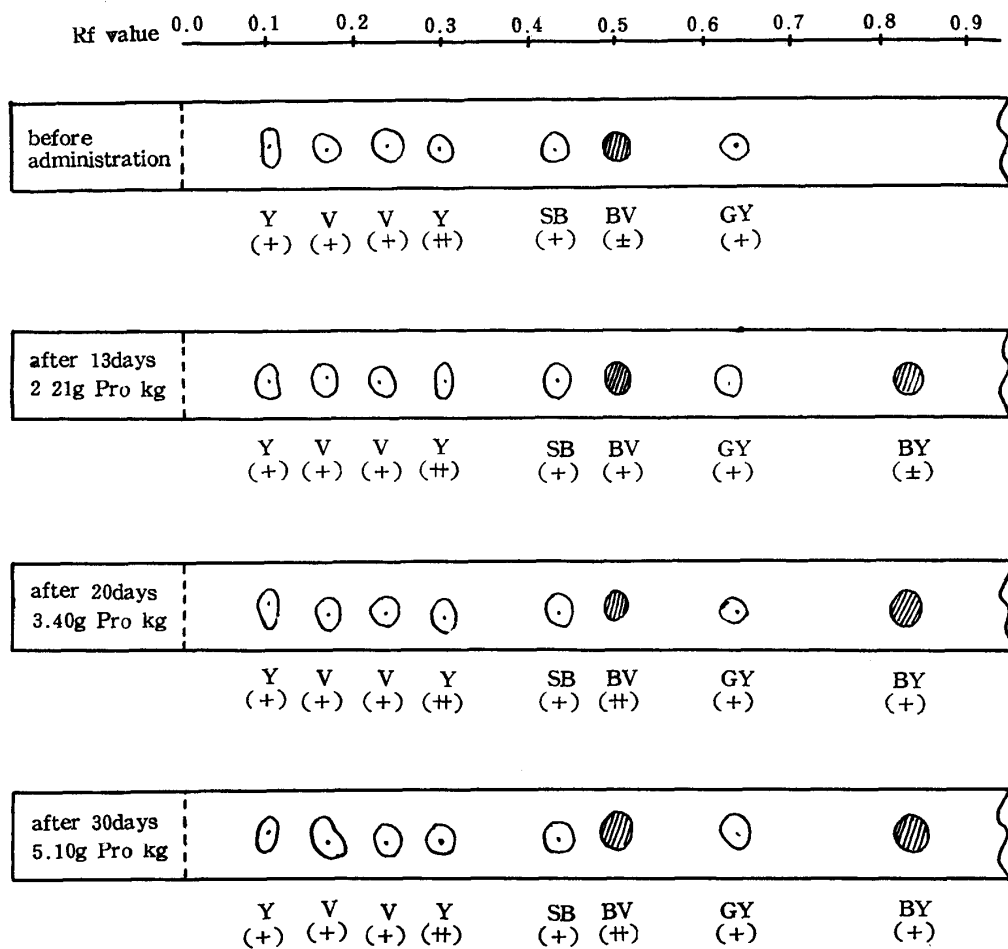
cm 東洋濾紙の No. 51 に塗附して 5% Sod Cit : Isoamyl alcohol (1 : 1) の混合二層溶媒を用いて分離を行った。展開後同様にして各種の蛍光物質を切りとって抽出し、以下の実験に供した。

実 験 成 績

I パス投与時尿中蛍光物質の検出

パス投与時尿中蛍光物質について *n*-Butanol, HAc, H₂O (4 : 1 : 5) の展開溶媒のとき検出された蛍光を有するスポットは Table I に示すように 8 個である。これを対照と比較すると特異な蛍光スポットは Rf0.5

Table 1 Fluorescent substances in urine
Solvent: *n*-Butanol, HAc, H₂O (4 : 1 : 5)



Fluorescent colors Y: Yellow V: Violet
 BY: Blue, yellow SB: Sky blue
 YG: Yellow green BV: Blue-Violet

の青紫色蛍光物質と Rf 0.82 の青黄色蛍光物質の 2 個である。スポットの蛍光の強さは Rf 0.5 物質の方が Rf 0.82 物質よりも強い蛍光を認めた。又 Table II に示すように各種蛍光物質に Dalglish⁶⁾ 等がトリプトファン代謝物の検出に用いた呈色反応を応用してみた。その結果 F₁, F₂, F₃, F₄, F₆, はそれぞれ 3-Hydroxykynurenine sulfate, 3-Hydroxykynurenine, Kynurenine, Xanthurenic acid, 3-Hydroxyanthranilic

6) C. E. Dalglish: Biochem. J. 53, 3 (1952).

Table 2 Qualitative reactions of fluorescent substances on filter paper

	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
		○	○	○	○	○	○			○
		Y (+)	V (+)	V (+)	Y (#)	SB (+)	BV (+)	GY (+)		BY (±)
		F ₁	F ₂			F ₃	F ₄	F ₅		F ₆
Rf		0.16	0.27			0.45	0.50	0.65		0.82
Fluorescence		V	V			SB	BY	GY		BY
Diazo		+	+			-	+	-		+
Bratton-Marshall		-	-			+	-	-		-
Millon		-	-			-	+	-		-
Ninhydrin		+	+			+	-	-		-
NH ₃ 性 AgNO ₃		+	+			-	+	-		+
FeCl ₃		-	-			-	+	-		-
Ehrlich's Aldehyde		+	+			-	+	-		+
Substance assumed		3-OHKSuff	3-OHK			Kyn	XA	不明		3-OHAnA

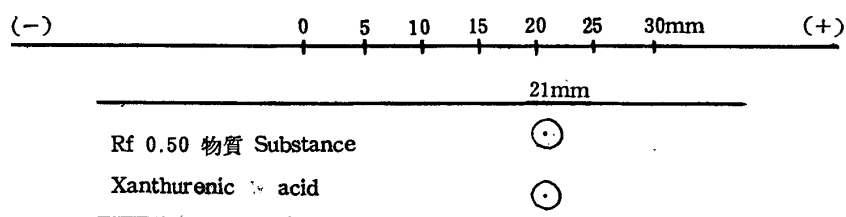
Fig. 1 Comparison of Rf values by electrophoresis

(1) pH5.0 M/5Acetate buffer

600V/38cm (15.7V/cm)

3 hrs 泳動

15mA/12.5cm (1.2mA/cm)

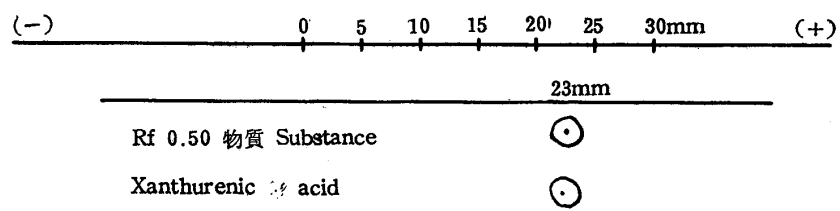


(2) pH7.4 M/15Phosphate buffer

600V/38cm (15.7V/cm)

3 hrs 泳動

13.5mA/12.5cm (1.07mA/cm)



acid で F₄ は不明, 2 個の黄色蛍光物質はフラビン類と推定された.

II Rf 0.5 の青紫色蛍光物質

前述のようにして得られた 0.5 物質の溶液について以下の検討を行った.

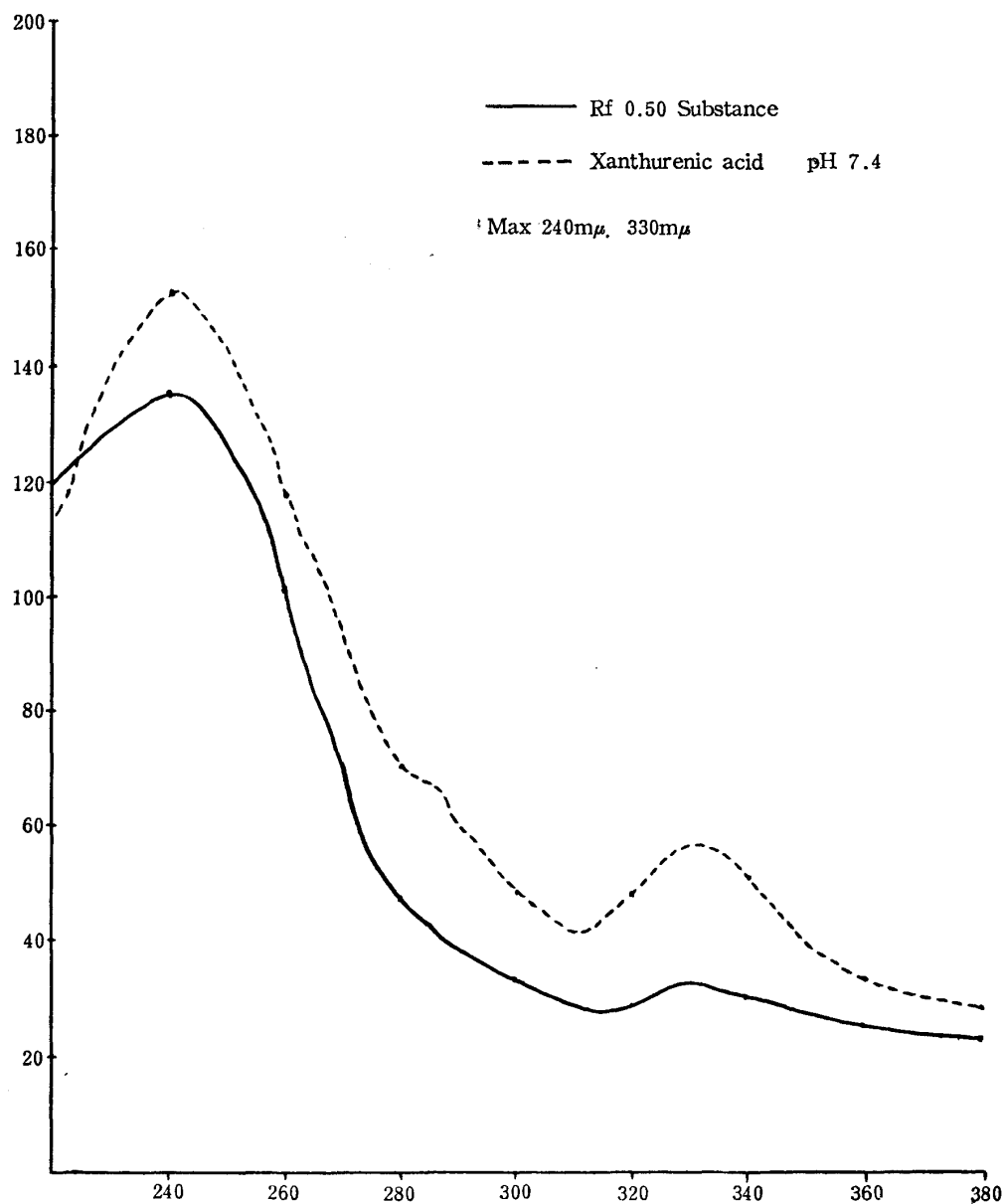
1) 濾紙上の定色反応

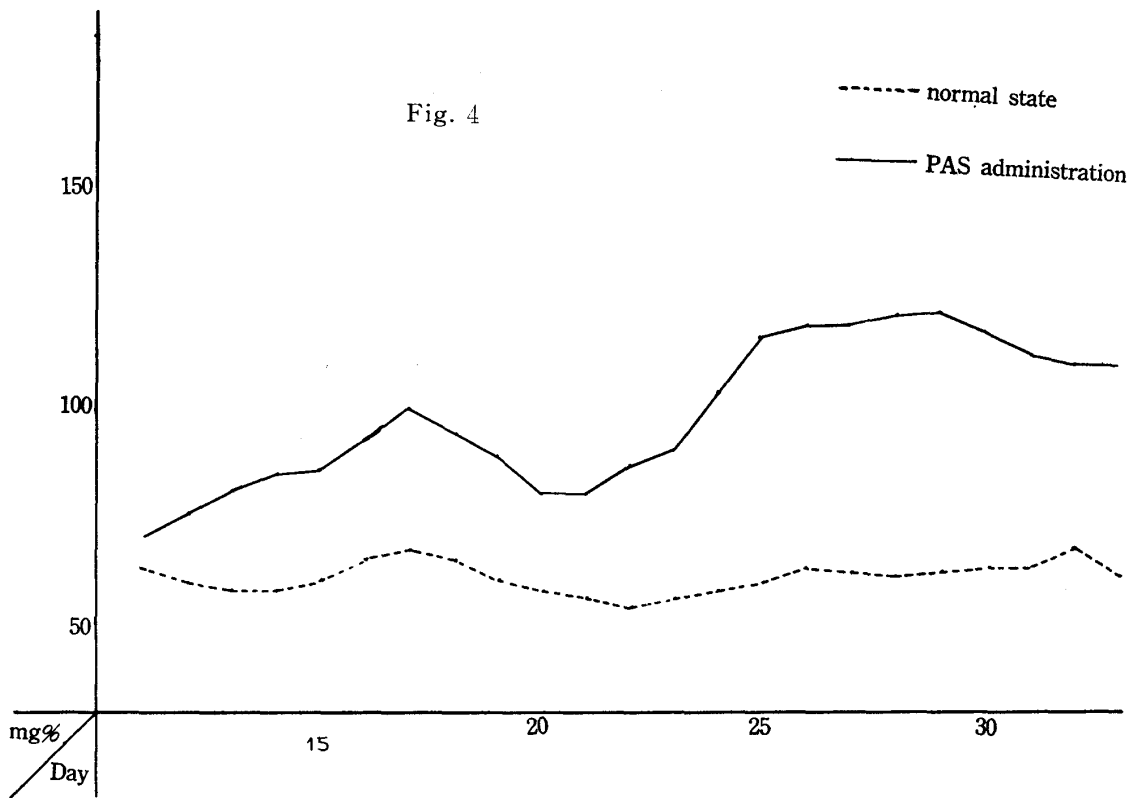
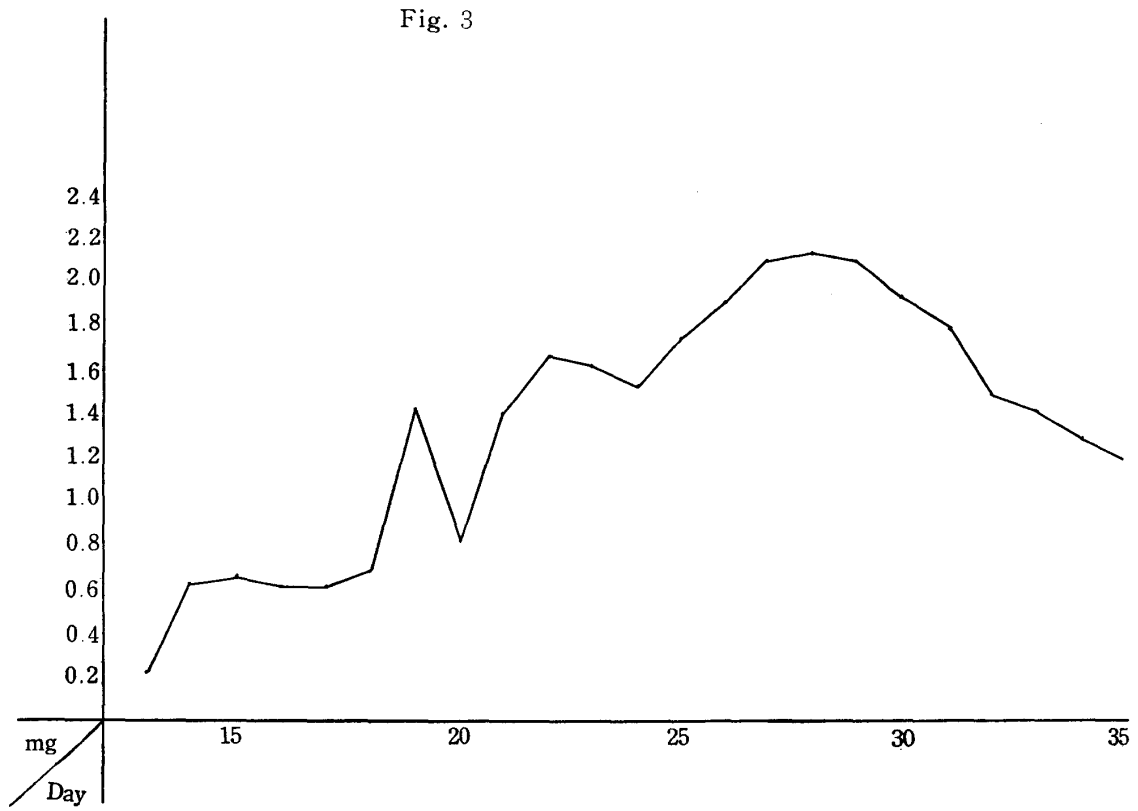
前記の呈色反応を応用し, 同時に近似の Rf 値を有する既知のキサントレン酸と比較した. その結果 Rf 0.5 物質はジアゾ反応, アンモニア性 AgNO_3 反応, FeCl_3 反応, Millon 反応, 何れも陽性で, 逆ジアゾ反応, ニンヒドリン反応, KMnO_4 反応, Ehrlich's Aldehyde 反応は何れも陰性であってキサントレン酸とは呈色反応において一致し蛍光の色調も同様であった.

2) 各種の展開剤における Rf 値

Rf 0.5 物質, キサントレン酸について各種の溶媒に対する Rf 値を比較した. 即ち東洋濾紙 No. 51 を用い次の6種の溶媒, 5% Na_2HPO_4 solution, Isoamyl alcohol · 5% Sod Cit solution (1 : 1), *n*-Butanol · HAc · H_2O (4 : 1 : 5), 5% Na_2HPO_4 · *n*-Butanol solution (1 : 1), Methanol · *n*-Butanol ·

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum





Benzene · H₂O (2 : 1 : 1 : 1), *n*-Butanol · *n*-Propanol · H₂O (2 : 2 : 1), で展開し, 風乾後紫外線下で蛍光スポットを検し, Rf 値を測定した. その結果 Rf 0.5 物質の測定値は同時に対照として用いたキサントレン酸の示す Rf 値と全く一致することを認めた.

3) Rf 0.5 物質とキサントレン酸の濾紙電気泳動法による泳動値の比較.

前述のようにこの蛍光物質は呈色反応およびRf値においてキサントレン酸と一致したが, さらに濾紙電気泳動法における泳動値を比較した. 装置は夏目式を用い, 常法により試験した. 緩衝液として M/5 醋酸緩衝液 (pH5.0) および M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) を使用した. その結果 Fig. 1 に示すように pH 5.0 では陽極側に 21mm, pH 7.4 では陽極側に 23mm 移動し, 同時に対照として用いたキサントレン酸と全く一致する結果を得た.

4) 紫外外部吸収スペクトル

Rf 0.5 物質とキサントレン酸との比較をさらに Beckman's Spectrophotometer による紫外外部吸収スペクトルについて行った. その結果 Fig. 2 に示すように両物質とも 240m μ , および 330m μ に極大値を示し, その吸収スペクトルは互に一致した.

以上の試験結果から Rf 0.5 青紫色蛍光物質をキサントレン酸と同定した.

III Rf 0.82 の青黄色蛍光物質

Rf 0.5 物質がキサントレン酸であることが確定したので, 0.82 物質もあるいはトリプトファン代謝中間産物ではないかと考えて Rf 値から 3-Hydroxyanthranilic acid を予想し試験した.

1) 濾紙上の呈色反応

Rf 0.82 物質と近似の Rf 値を有する既知の 3-Hydroxyanthranilic acid を濾紙上呈色反応で比較した. その結果ともにジアゾ反応, 逆ジアゾ反応, アンモニア性 AgNO₃ 反応, KMnO₄ 反応, Ehrlich's Aldehyde 反応, いずれも陽性であり, ニンヒドリン反応, FeCl₃ 反応は陰性であって両者は呈色反応において一致し, また蛍光色調も同様であった.

2) 各種の展開剤における Rf 値

0.82 物質は呈色反応において 3-Hydroxyanthranilic acid と一致する成績をえたので次は各種の溶媒に対する Rf 値の比較を行った. 展開溶媒として 5% Na₂HPO₄ solution, Isoamyl-alcohol · 5% Sod · Cit solution (1 : 1), *n*-Butanol · HAc · H₂O (4 : 1 : 5), 80% Alcohol solution, Methanol · *n*-Butanol · Benzene · H₂O (2 : 1 : 1 : 1), Isopropanol · *n*-Butanol · H₂O (2 : 2 : 1), を用いた. その結果両者はいづれの溶媒についても Rf 値は一致した. Rf 0.82 物質は濾紙上の呈色反応, 各種の展開溶媒において全く 3-Hydroxyanthranilic acid と一致する結果をえた. よって本物質を 3-Hydroxyanthranilic acid と同定した.

IV キサントレン酸の変動

パス連続投与時の尿中に排泄されるキサントレン酸の変動を観察した. 定量法は Glazer-Mueller⁷⁾法を用いた. その結果 Fig. 3 に示すように対照と比較すれば 1 日尿中のキサントレン酸量はパス投与 10 日頃より次第に排泄されてくるようで, 漸時上昇し, 2.0mg/day 前後の排泄を認めた.

7) Glazer, Mueller, Thompson: Arch. Biochem. **33**, 243 (1951).

V 血糖値の変動

血糖の定量は Somogyi⁸⁾ 法により施行した。Fig. 4に示すようにパス連続投与した家兎においては明らかに高血糖値を示し、次第に持続性高血糖に移行していくようである。またキサンツレン酸の排泄と血糖値の変動がほぼ平衡状態にあるように考えられる。

考 察

従来尿中に発現する蛍光物質については多くの研究^{9)~12)}があるが著者等はパス投与時、尿中に特異な蛍光物質の存在を知り、その本体を追跡してこれがキサンツレン酸、3-Hydroxyanthranilic acid であると同定することができた。キサンツレン酸は伊の Musajo¹³⁾によりトリプトファンの代謝産物として発見され、次いでトリプトファンの代謝過程において VB₆ 欠乏時に異常代謝がおこり、3-Hydroxykynurenine よりキサンツレン酸が生成されることを北米の Lepkovsky¹⁴⁾等により発見された。最近古武は脂肪の多量摂取によりトリプトファンより多量のキサンツレン酸の生成されることを見出し、これが Diabetogenic な性質を有することを発見し、原因不明といえる糖尿病に対して新しい研究分野を開拓した。幸い著者等もこの研究によりパス投与時の副作用としての糖尿病の発現にこのキサンツレン酸が関与するのではないかと推察することができた。また 3-Hydroxyanthranilic acid は未だ尿中より見出されていないが、パス投与尿中よりこれを証明することができた。

結 論

パス投与時の尿中に発現する特異な蛍光物質の本体を追求し、次の結果を得た。

1) パス投与時の尿中に発現する特異な蛍光物質値は Rf 0.5 の青紫色蛍光物質と Rf 0.82 の青黄色蛍光物質の2個である。

2) Rf 0.5 青紫色蛍光物質は P.P.C., 呈色反応, 濾紙電気泳動値, 吸収スペクトル等よりキサンツレン酸と同定した。

3) Rf 0.82 の青黄色蛍光物質は P.P.C., 呈色反応より 3-Hydroxyanthranilic acid と同定した。

4) パス投与時の尿中より見出したキサンツレン酸はパス糖尿の一原因になるのではないかと考える。

終りに臨み本研究に対し終始御激励を賜った宮道学長並びに御便宜を与えられた加藤教授にお礼申し上げる。またトリプトファン代謝産物の標品を恵与された名大古武教授, 和歌山医大堀田教授に深謝する。

8) M. Somogyi: J. Biol. Chem., **160**, 69 (1945).

9) C. E. Dalglish W. E. Knox A. Neuherger: Nature, **166**, 20 (1951).

10) 古武: 総合臨床, **4**, 1962 (1955).

11) M. Mason: J. Biol. Chem., **201**, 513 (1953).

12) C. C. Porter I. Clark R. H. Silber: Arch. Biochem., **18**, 339 (1948).

13) L. Musajo: Atti accad. Linsei, **21**, 368 (1935).

14) S. Lepkovsky E. Roboz, and A. J. Haagen-Smit: J. Biol. Chem., **149**, 195 (1943).