

生体内 Cyanide および Thiocyanate の
分析法に関する基礎的研究

戸井田 敏彦

1983年 2月

目次

i

		頁
	序論	1
第1章	新しい蛍光定量法の確立	4
1.1	蛍光物質の構造	6
1.2	定量条件の検討	10
1.2.1	緩衝液のpH	12
1.2.2	クロラミンTの濃度	12
1.2.3	ピリジン-バルビツール酸の濃度	14
1.2.4	反応時間	16
1.2.5	反応温度	16
1.2.6	確立された定量操作	18
1.3	考察	18
第2章	高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるCN ⁻ およびSCN ⁻ の分離定量法の確立	22
2.1	HPLCのフローダイアグラム	22

2.2	CN ⁻ およびSCN ⁻ の分離	24
2.2.1	イオン交換樹脂の選択	24
2.2.2	溶離剤の選択	25
2.3	検出条件	30
2.4	妨害物質	34
2.5	分離カラムの再生	37
2.6	考察	38
第3章	生体内CN ⁻ およびSCN ⁻ の測定	39
3.1	尿の分析法	41
3.2	血漿の分析法	44
3.2.1	血漿中CN ⁻ の分析	46
	i) 拡散法を用いた前処理法の検討	46
	ii) 血漿中CN ⁻ の消失	49
3.2.2	血漿中SCN ⁻ の分析	51
3.3	赤血球の分析法	53
3.3.1	赤血球中CN ⁻ の分析	53
3.3.2	赤血球中SCN ⁻ の分析	56

		iii
3.4	健常人血液中 CN^- および SCN^- の分析	58
3.5	考察	60
第4章	血液中 CN^- および SCN^- の動態と代謝	64
4.1	血液中 CN^- の動態	65
4.2	血液中 SCN^- の動態	67
4.3	赤血球における CN^- の代謝	67
4.4	ヘモグロビンの Thiocyanate oxidase 活性	69
4.5	考察	71
第5章	血圧降下薬 Sodium Nitroprusside の代謝研究への応用	75
5.1	ジアゾカップリング反応を用いた SNP の新しい定量法	77
5.1.1	定量条件の検討	80
	i) アルカリ濃度	80
	ii) 反応時間	80
	iii) 反応温度	82

		iv
5.1.2	検量線および共存物質の影響	82
5.2	SNPの安定性	87
5.2.1	光の影響	87
5.2.2	酸, アルカリの影響	88
5.2.3	血漿, 赤血球中でのSNPの安定性	91
5.3	ウサギへのSNPの投与	93
5.4	術中, 術後SNP投与患者の血液中CN ⁻ およびSCN ⁻ の測定	96
5.5	考察	96
オ6章	総括	103
	実験の部	105
	謝辞	110
	参考文献	111

序 論

生体内において、シアンイオン(以下 CN^- と略記)がチオシアン酸イオン(以下 SCN^- と略記)に変換されることが Langら¹⁾によりはじめて報告された。又、この反応が酵素反応であることが推測されたのはその40年後である²⁾。ここに、Rhodanese (thiosulfate sulfur transferase, E.C. 2.8.1.1.) と命名された酵素は、有機化合物としてのシアノ基には作用せず、無機陰イオンとしての CN^- へのみ作用することを見出された²⁾。 CN^- の解毒代謝の主経路は、Rhodanese による SCN^- への変換であることは疑い余地はないが、³⁾ 一方では $Na^{14}CN$ を用いた代謝研究の結果、 CN^- の炭素がアラントインのウレイド炭素として取り込まれたり、コリン、メチオニンのメチル基として存在することが明らかとなった⁴⁾。又、シスチンと結合して、2-imino-thiazolidine-4-carboxylic acid を生成し、解毒代謝される事も報告されている⁵⁾。一方、 SCN^- の投与により生体内で

CN⁻が生成することか Goldsteinら⁶⁾により示された。この反応も酵素反応であると推察され、thio-cyanate oxidase と命名されているが⁷⁾、現在、確認されていない。Fig. 1 に、これまでに報告されている CN⁻ および SCN⁻ の代謝経路を示す。

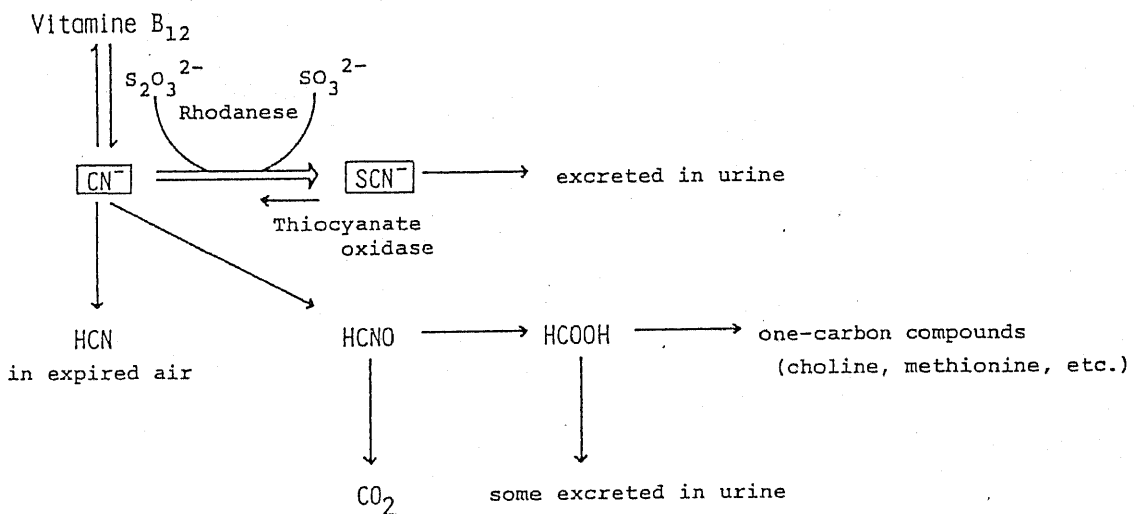
近年、多発性硬化症⁸⁾、視神経萎縮症⁹⁾ など中枢性疾患と CN⁻、又は SCN⁻ の存在量との間に因果関係を認めたとする報告¹⁰⁾ がなされている。しかし、既存の方法を用いて追試も行われたが¹¹⁾ 明確な解答は得られていない。よって、生体内の CN⁻ および SCN⁻ の存在量を正確に測定することは、未知の代謝酵素、疾病との関連を明らかにする上で必要かつ不可欠であると云える。

生体内の CN⁻ を正確に測定しようとする場合、CN⁻ とその化学的、物理的性質の著しく類似している SCN⁻ が、CN⁻ の 50 倍から 500 倍量存在するため、試料の前処理、定量法において相互に影響し、困難を極めている。そこで、

多量の SCN^- の共存を考慮した CN^- の定量法、試料の前処理法について検討し、 CN^- 、 SCN^- の生理的意義を解明するための基礎研究を行った。更に、最近、外科、麻酔科領域で血圧降下薬として頻繁に用いられている CN^- 含有の無機製剤、*Sodium nitroprusside* の代謝研究に応用した。

本論文は、以上の研究についてまとめたものである。

Fig.1 Metabolic Map of Cyanide and Thiocyanate



オノ章 新しい蛍光定量法の確立

CN^- および SCN^- の定量法は、多数報告されている。 CN^- に関しては、ピリジン-ピラゾロン法¹¹⁾ に代表される König 反応¹²⁾ を用いた比色法、イオン選択性電極を用いた方法¹³⁾、蛍光法、ガスクロマトグラフ法などが知られている。蛍光法として、ニコチンアミドを用いた方法¹⁴⁾、p-ベンゾキノンを用いた方法¹⁶⁾、ピリドキサルを用いた方法¹⁷⁾ などが報告されているが、高感度であるにもかかわらず測定条件が煩雑で実用性に欠ける。ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器¹⁸⁾、電子捕獲検出器¹⁹⁾、マススペクトロメトリー²⁰⁾ などの高感度検出器を組み合わせて CN^- 、又は SCN^- を測定する方法も知られているが、ガスクロマトグラフ-誘導体の調製が非常に煩雑で熟練を要し、 CN^- 、 SCN^- の測定法として一般的な方法となり得ていない。

一方, SCN^- の定量法としては, 鉄錯体法²⁰⁾が広く用いられているが, 特異性, 感度の点で König 法²²⁾には及ばない。

一般に, CN^- , SCN^- の分析法として知られる König 法とは, これらのイオンを酸化的にハロゲン化し, 生成するハロゲン化シアンとピリジンを反応させるとグルタコンアルデヒドを生成する von Braun 反応²³⁾と, このジアルデヒドが活性メチレン基, あるいはアミノ基と縮合して色素を生ずる反応を含めた方法を云う。

ハロゲン化試薬にはブロム水²⁴⁾, 次亜塩素酸ナトリウム²⁵⁾, クロラミンTなどが用いられているが, ブロム水, 次亜塩素酸ナトリウムを用いると, その強い酸化力により生成する色素を分解するため, 毒性の強い亜ヒ酸などの分解剤を加える必要があり²⁴⁾, 又, 試薬自身も不安定である。クロラミンTは, 酸化力, 安定性も至適であり, 現在ではこの試薬を用いる場合が多い。一方, 縮合試薬には, 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾ

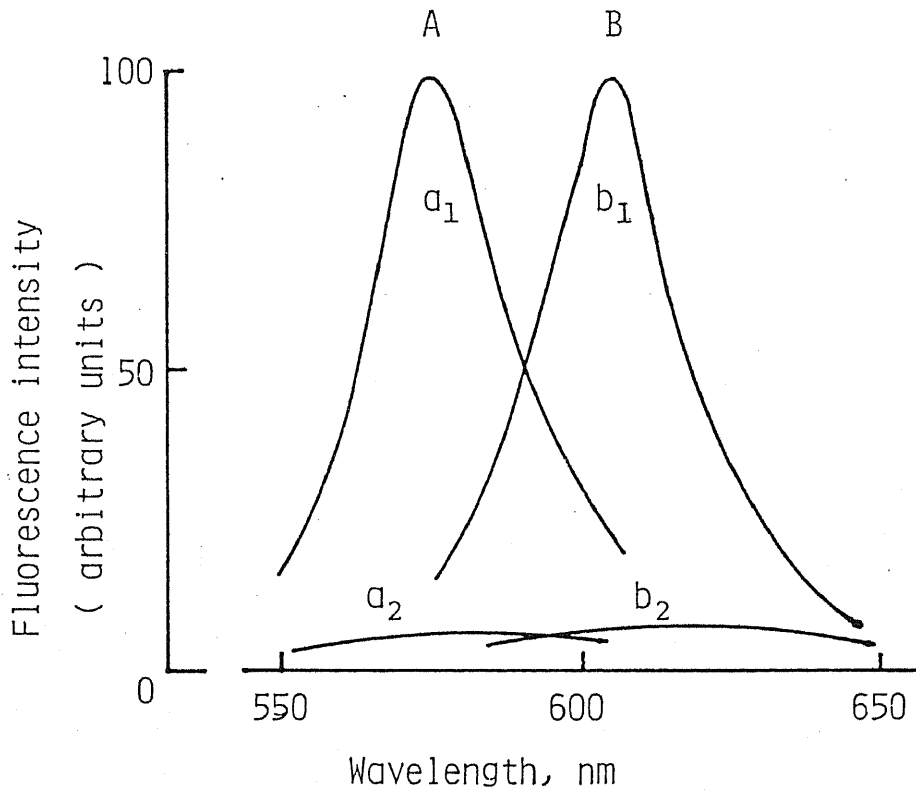
ロン¹²⁾, ベンジジン²⁶⁾, p-フェニレンジアミン²⁷⁾, バルビツール酸などが知られている。

著者は、これらの試薬について比較検討した結果、バルビツール酸を用いたとき生成する色素が、Fig. 1-1 に示すように励起波長 583nm 、蛍光波長 607nm に最大波長を有する蛍光物質であることを見出した。²⁹⁾ これまで Kömig 法を用いて CN^- および SCN^- を蛍光定量した例は報告されておらず、特異性の高い Kömig 法で蛍光定量が可能になれば、これまでにない特異的かつ高感度な CN^- および SCN^- の定量法の確立が期待される。そこで、上記の蛍光物質の構造、発蛍光反応における試薬の最適濃度、反応条件について詳細なる検討を行った。

1-1 蛍光物質の構造

蛍光定量法を確立することを目的として蛍光物質の単離を試みた。比色法を参考にして、²⁸⁾ ナオシアン酸カリウム 0.97g を $\text{pH} 5$ の 0.1M 酢酸緩衝液に溶かし、クロラミンT 3g を加えてハロゲン化

Fig.1-1 Excitation and Emission Spectra of the Final Reaction Mixture of Cyanide



A: excitation spectra. B: emission spectra.

a₁ and b₁: sample (cyanide). a₂ and b₂: blank.

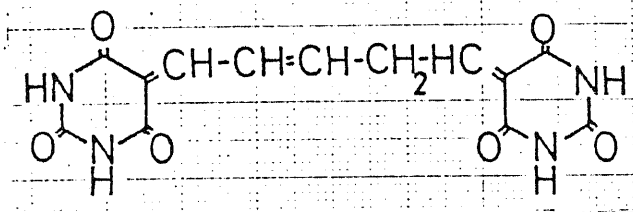
ある。約3分後、ヒリジン 8 ml, バルビツール酸 2.5 g, 濃塩酸 1.6 ml, 水 20 ml の混合溶液を加える。約15分後、生成する紫色の沈殿をろ取し、水でよく洗淨する。これを水で再結晶し、鱗片状紫色結晶を得る。収量約 200 mg, m.p. 300°C 以上(分解)

この物質を 10% ヒリジン水に溶かし、蛍光スペクトルを測定すると、励起波長 583 nm, 蛍光波長 607 nm にピークを有するスペクトルが得られ、その可視部吸収スペクトルは比色法で得られた発色物質と同じ λ_{max} を与えた。又、KBr 打錠で IR スペクトルを測定した結果、Jensen³⁰⁾ によりゲルタコンアルデヒドとバルビツール酸から合成された Mg^{2+} の定量試薬として知られる, 5,5'-(1,3-pentadien-1-yl-5-ylidene)-dibarbituric acid hydrate (M.W. 318.25) とスペクトルが一致した。構造式および IR スペクトルを Fig. 1-2 に示す。

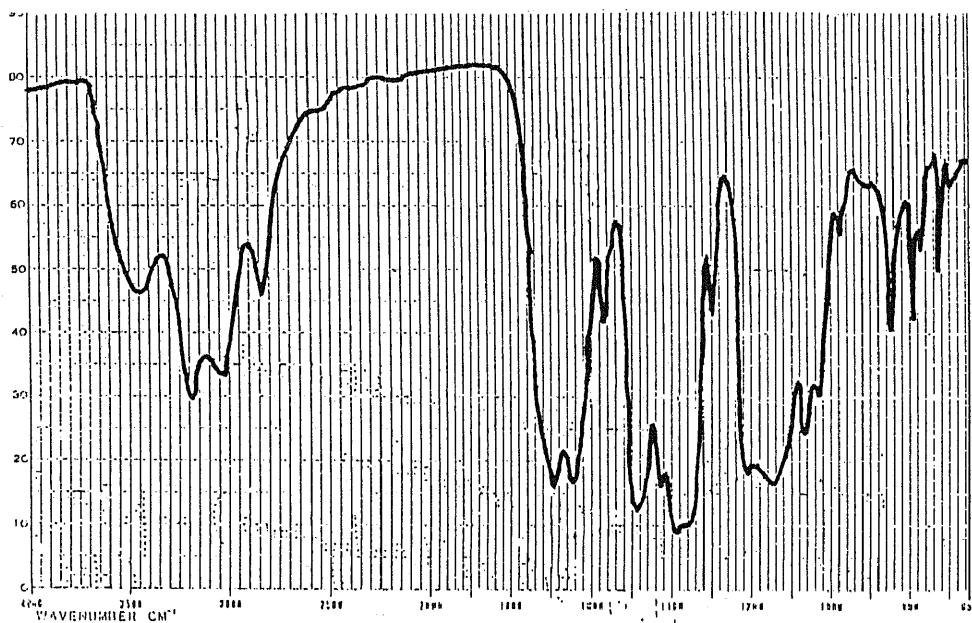
しかし、この物質の水溶液中での蛍光は、まっ

Fig.1-2 Structure and IR Spectrum of Fluorescence

Compound



5,5'-(1,3-pentadien-1-yl-5-ylidene)-
dibarbituric acid hydrate



たぐく観察されず、これにポリジン、ジメチルホルムアミドなどの塩基性溶媒を加えると強い蛍光を示す。

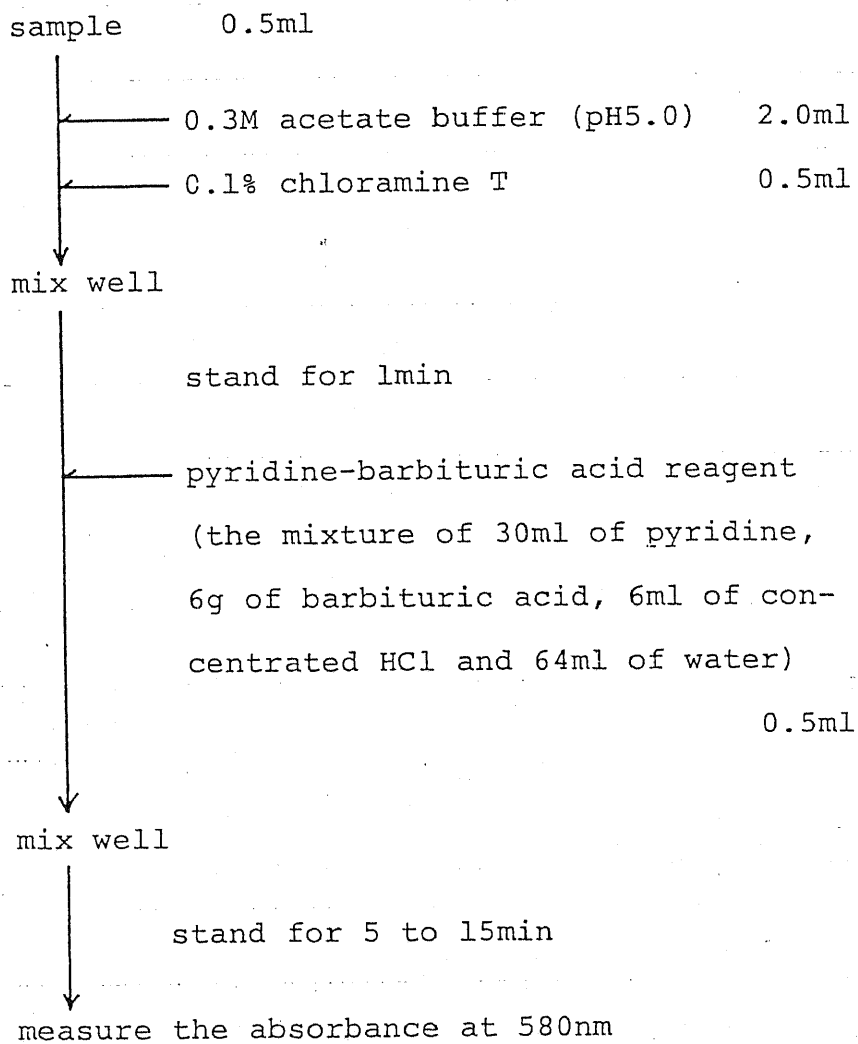
Fig. 1-2 に示した物質は溶液中でいくつかの分子種、イオン種間の平衡を有するものと考えられ、上記の蛍光強度の差は発蛍光する分子型の存在比によるものと推察される。

以上のより、蛍光物質が比色法で測定されている色素と同一物質であることは確認されたが、この物質の発蛍光する至適条件が比色法の条件 (Fig. 1-3) と必ずしも同じとは云えない。そこで、次節において、反応溶液の pH、各試薬の至適濃度、反応時間などについて新たに検討を行った。

1.2 定量条件の検討

本節における実験は、Fig. 1-3 に示した比色法の操作に準じて行った。又、検討に用いた CN^- SCN^- の標準溶液は $1.0 \mu\text{M}$ である。

Fig.1-3 Procedure for the Determination of CN^- and SCN^- by Colorimetry



1.2.1 緩衝液のPH

CN^- あるいは SCN^- を用いて生ずる蛍光強度は、Fig. 1-4に示すように緩衝液のPHにより変化する。PH 5.0以上では、ハロゲン化反応が²⁵⁾遅いと云われている。又、低いPH領域で SCN^- から生じる蛍光がほぼ一定であるのに対し、 CN^- より得られる蛍光が低下する。これは CN^- がシアニ化水素として反応系から揮散したためと考えられる。 CN^- を取り扱う場合には、常にシアニ化水素として系より揮散することを考慮しなければならない。よって、緩衝液は、できるだけ CN^- の揮散を少なくするためPH 5.0の酢酸緩衝液を用いることにした。

1.2.2 クロラミンTの濃度

クロラミンTの濃度について調べた結果をFig. 1-5に示す。0.08%から0.2%の範囲で一定の蛍光強度が得られた。又、 SCN^- のハロゲン化には、触媒として3価の鉄の存在が必要とされる報告もあるが、³¹⁾著者の検討では CN^- 、 SCN^- の反応の差はほとんど観察されず、鉄の必要性を認めなかった。

Fig.1-4 Effect of pH on Fluorescence Intensity

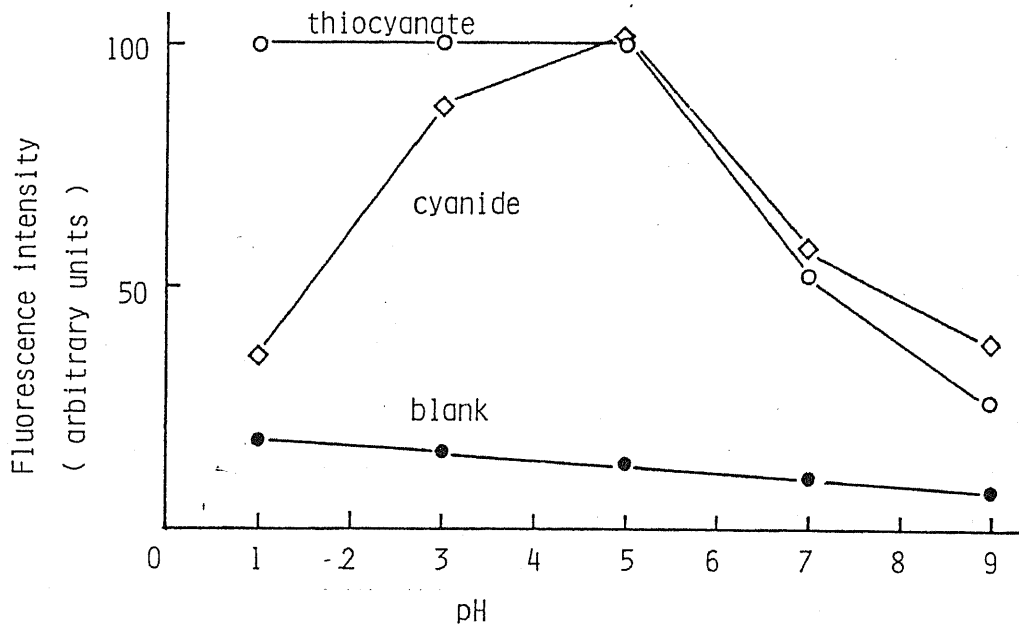
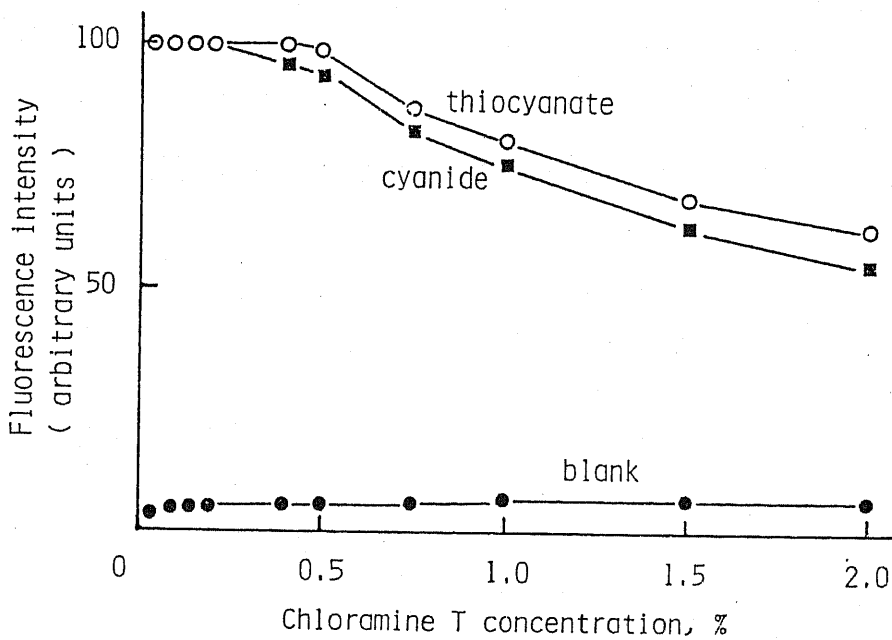


Fig.1-5 Effect of Chloramine T Concentration on Fluorescence Intensity



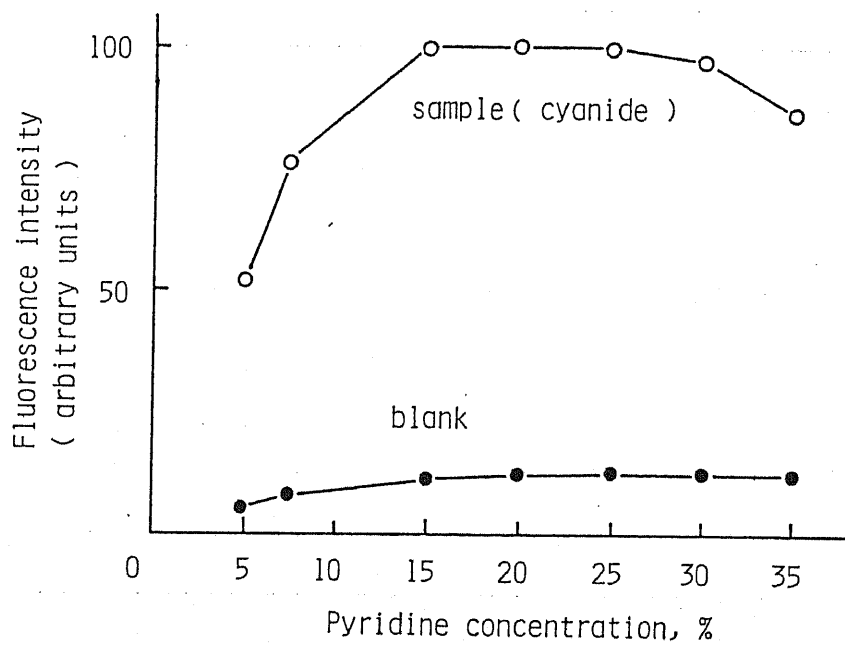
一方、クロルヒに要する時間について調べたが、15秒から180秒でその蛍光強度に差はみられなかった。

1・2・3　ピリジン-バルビツール酸試薬の濃度
比色法で用いられているピリジン-バルビツール酸試薬は、6%バルビツール酸、30%ピリジン、0.72M塩酸の混合溶液である。²⁵⁾ 発蛍光反応におけるピリジン-バルビツール酸試薬の至適条件を求めするために比色法で用いられている濃度を参考に検討した。

はじめに、ピリジン濃度について調べた結果をFig. 1-6に示す。15%から25%の範囲でほぼ一定の蛍光強度が得られた。しかし、ピリジン濃度の上昇とともに空試験値も上昇する傾向がみられたので、ピリジンは15%を用いることにした。この際、塩酸の濃度は、ピリジンの添加量により反応液中のpHが上昇し反応速度が遅れるため、ピリジン濃度按比例に変化させ調べた。

又、バルビツール酸の濃度についても同様に検討

Fig.1-6 Effect of Pyridine Concentration on Fluorescence Intensity



した。結果を Fig. 1-7 に示す。1.0% 以上で一定の蛍光強度が得られ、濃度を高くしても空試験値への影響は観察されなかった。よて、バルビツール酸は 1.5% を用いた。

1.2.4 反応時間

バルビツール酸を用いた比色法は、生成する色素が不安定で、ピラゾロン、*p*-フェニレンジアミンなどに比べ汎用性に欠けると云われている。そこで、ヒリジン-バルビツール酸試薬を加えてから、経時的に蛍光強度の変化を調べた。その結果、Fig. 1-8 に示すように試薬添加後、約 5 分で最大蛍光強度に達し、その後 15 分まで一定であった。ピラゾロン、*p*-フェニレンジアミンを用いた場合、最大発色まで 20 分から 60 分を要するのに比べ、短時間で反応が進行することになる。迅速な測定法が要求される臨床分析法としての適用を考えると、バルビツール酸を用いることの意味は大きいと云える。

1.2.5 反応温度

発蛍光反応に及ぼす温度の影響について調べ

Fig.1-7 Effect of Barbituric Acid Concentration on Fluorescence Intensity

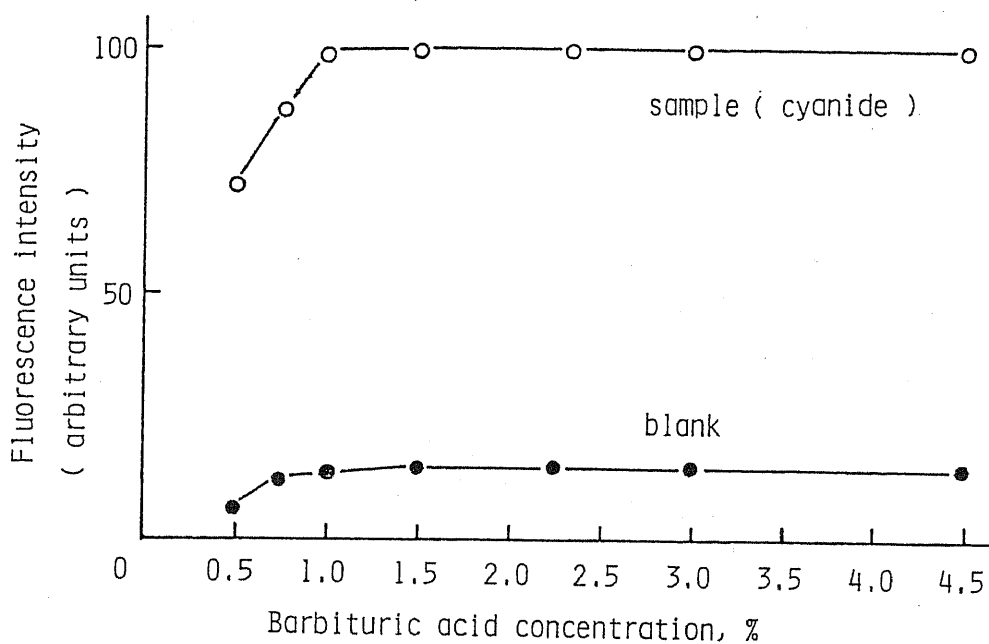
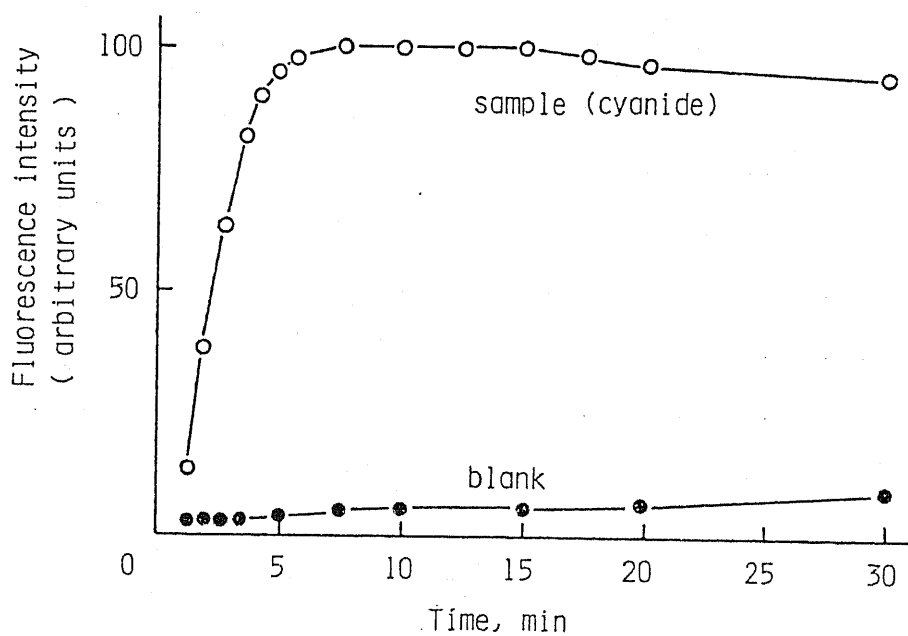


Fig.1-8 Effect of Reaction Time on Fluorescence Intensity



た。ピリジン-バルビツール酸を加えて、温度を調節した水浴中に3分間放置する。冷後、蛍光強度を測定した。結果を Fig. 1-9 に示す。温度の上昇によるハロゲン化シアンの揮散の影響も考慮しなければならないが、温度の上昇に従い、蛍光強度が著しく低下し、又、空試験値が上昇した。加温による蛍光物質の分解、あるいは副反応が進行したとも考えられる。従って、定量操作はすべて室温で行うことにした。

1.2.6 確立された定量操作

以上の検討により、確立した CN^- および SCN^- の蛍光定量法を Fig. 1-10 に示す。本法により CN^- , SCN^- は $0.05 \mu M$ から $2.5 \mu M$ の範囲で定量可能であることがわかった。

1.3 考察

蛍光物質の構造は、TBA(チオバルビツール酸)を用いた過酸化脂質の蛍光定量法として知られる八木法³²⁾の最終生成物、5,5'-(propanil-1-yl-3-

Fig.1-9 Effect of Temperature on Fluorescence Intensity

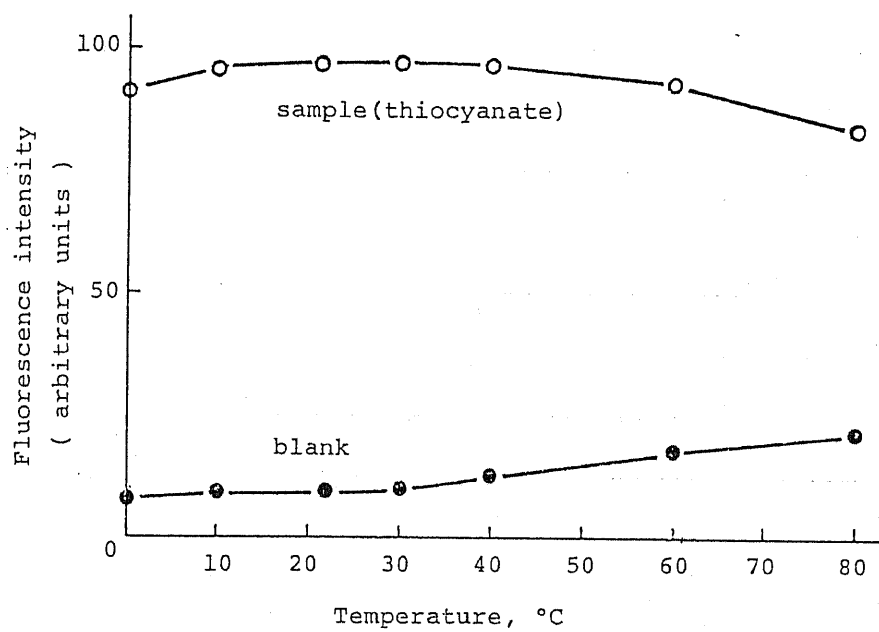
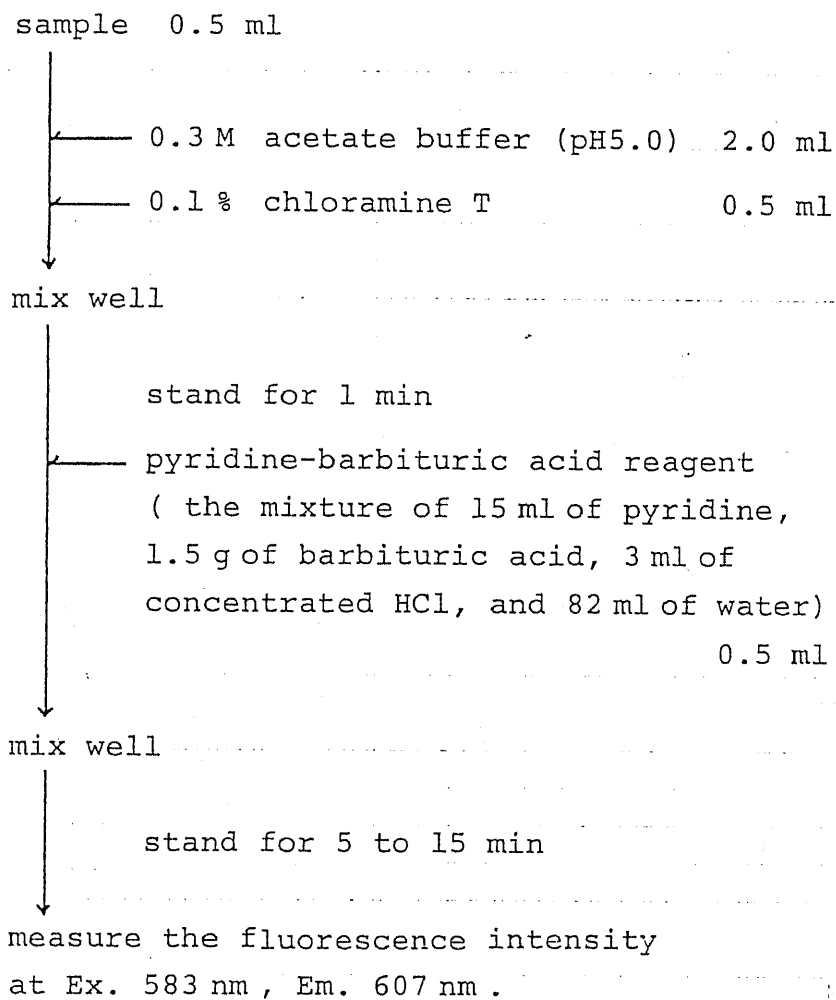


Fig.1-10 Procedure for the Determination of CN^- and SCN^- by Fluorometry



ylidene)-3-dithiobarbituric acid と類似している。

本法は、感度の点であぐれ、共存物質の影響も少なく、生化学、臨床化学の分野において、八木法と同様、汎用されることが期待される。

ポリジン-バルビツール酸を用いた K&mg 法による CN^- 、 SCN^- の新しい蛍光定量法は、同じ原理に基づく比色法に比べ、10倍から20倍の感度が得られ、蛍光法であるため、さらに選択性が向上した。

しかし、定量条件の検討において指摘したように、 CN^- を測定する場合、反応溶液の pH を常に考慮しなければならず、精度の点で問題を残している。又、 CN^- と SCN^- が共存する試料は、試料の前処理を特に慎重に行わなければならない。

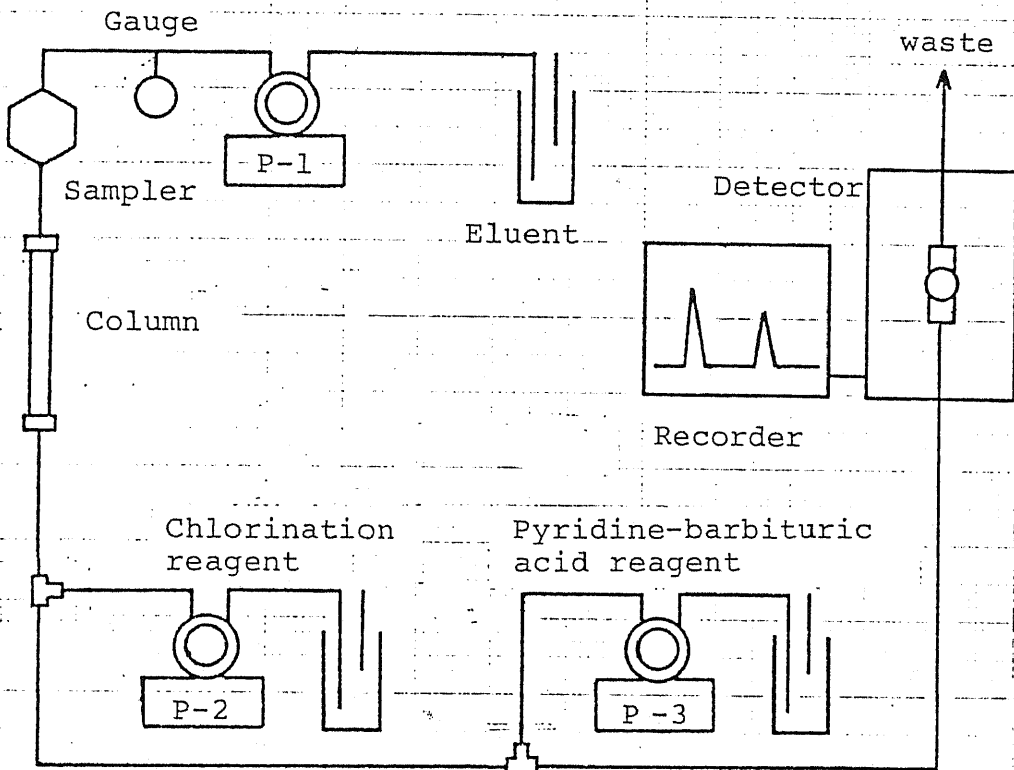
第2章 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による CN^- および SCN^- の分離定量 法の確立

前章で確立した CN^- および SCN^- の蛍光定量法は、その適用範囲が限定され、用手法であるが故に、精度の点で限界があることを指摘した。そこで、著者は、以上の欠点を補い、更に簡便、迅速で再現性の優れた CN^- および SCN^- の同時分離定量法を確立することを目的として、最近、急速な発展を遂げた HPLC による定量法を検討した。

2.1 HPLC のフローダイアグラム

Fig. 2-1 に、用いた HPLC のフローダイアグラムを示す。本法は、分離カラムで CN^- , SCN^- を分離後、Kömig 法による発蛍光反応を用いて検出するポストカラム法を採用し、HPLC は市販の部品を組み合わせて用いた。

Fig.2-1 Schematic diagram of liquid chromatography



2.2 CN^- および SCN^- の分離³³⁾

CN^- および SCN^- を効率良く分離するためには、陰イオン交換樹脂を用いた方法が最適と考えられる。そこで、2種のタイプの異ったイオン交換樹脂を選び、溶離液を検討しながら CN^- 、 SCN^- の分離条件を調べた。

2.2.1 イオン交換樹脂の選択

イオン交換樹脂は、その種類において急速な進展を遂げ、HPLC用の樹脂として耐圧性の高いポリスチレン-ジビニルベンゼン系樹脂が最も広く用いられている。この種のイオン交換体はその構造に比較的小さな開孔部を持つことと、比較的高い交換容量を持つことが特徴である。これに対し、ペリキュラー型や表面多孔性のものは新しい形のイオン交換充填剤である。ペリキュラー型イオン交換樹脂は不活性な孔のないシリカなどの核の表面をイオン交換物質の薄膜でおおったものである。ペリキュラー型樹脂は表面に少量のイオン交換基を持っているだけなので、その交換容量は小さい。本実験

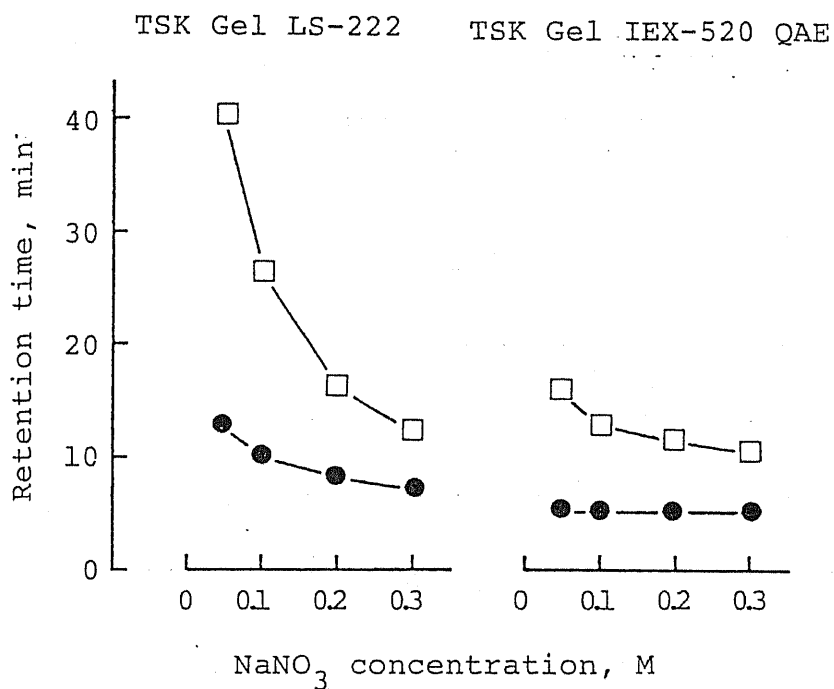
では前者に属するイオン交換樹脂として市販の TSK Gel LS-222, 後者に属するものとして TSK Gel IEX 520 QAE を用いた。

CN^- は弱酸, SCN^- は強酸として取り扱うことができ, CN^- をカラムに保持するためには pH を上昇させるか, 強塩基性のイオン交換基を多くする, 即ち高い交換容量を持つ TSK Gel LS-222 が適している。逆に, SCN^- をはやく溶出させるためには pH を低くするか, イオン交換基を少なくする, 即ち低い交換容量の TSK Gel IEX 520 QAE が適している。

2.2.2 溶離剤の選択

SCN^- は, *chaotropic anion* として知られ³⁴⁾ アルブミンなどのたん白質, イオン交換樹脂の担体に用いられるポリスチレンなどに強い親和性を示す。³⁵⁾ この親和力を *chaotropic effect* と呼称し, 他に強い *chaotropic effect* を有する無機陰イオンとして過塩素酸, 硝酸イオンが知られている。³⁶⁾ Fig. 2-2 に分離カラムとして TSK Gel LS-222 と, TSK Gel IEX

Fig.2-2 Effect of NaNO_3 Concentration on Retention Time of CN^- and SCN^-



● ; CN^- , □ ; SCN^- , flow rate

flow rate, 0.5ml/min

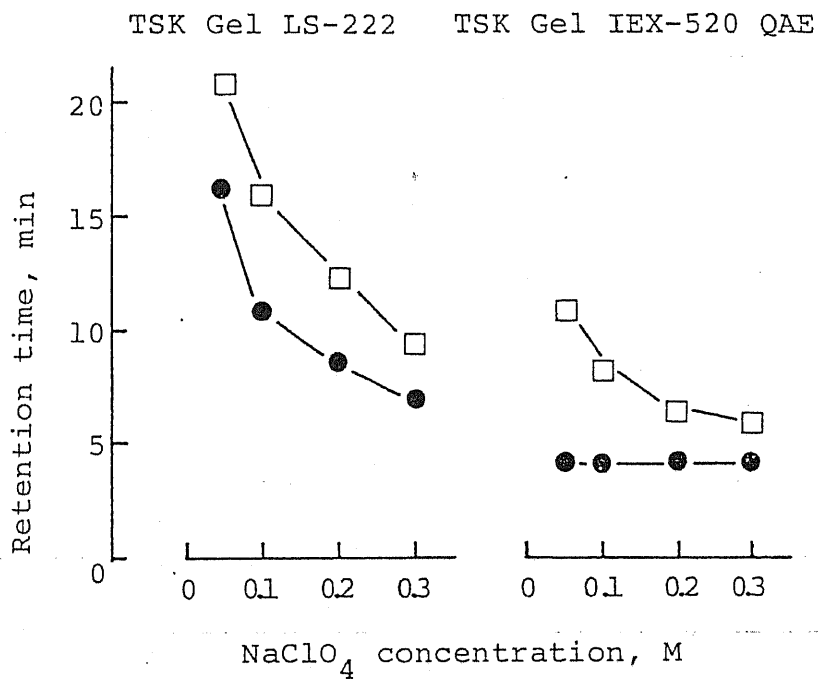
column, 3mm i.d. x 100mm

520QAEを充填して用い、 NaNO_3 を溶離剤としたときの CN^- 、 SCN^- の溶離挙動を示した。又、Fig. 2-3には、 NaClO_4 を溶離剤として用いたときの CN^- 、 SCN^- の溶離挙動を示す。どちらの組み合わせにおいても溶離液の各塩濃度が上昇するに従い、 SCN^- の保持時間が短縮されることがわかった。

一方、Fig. 2-2, 2-3に示したようにTSK Gel IEX 520QAEに対して本実験条件で全く保持されなかった。溶媒先端に溶離されるという事は、生体試料を注入した場合、同時に種々の物質が溶出されることが予想され、特異性の点で適当でない。そこで、多孔性ポリスチレン型のイオン交換樹脂、TSK Gel LS-222を用いることにし、Fig. 2-3の結果をもとに、溶離液を検討した。

Fig. 2-4に示すように、0.2M過塩素酸ナトリウムを含む酢酸緩衝液のpHを変えて、 CN^- 、 SCN^- の溶離挙動を調べたところ、pH 5.0に調整することで良好な分離結果が得られた。そこで、 CN^- 、 SCN^- の分

Fig.2-3 Effect of NaClO_4 Concentration on Retention Time of CN^- and SCN^-

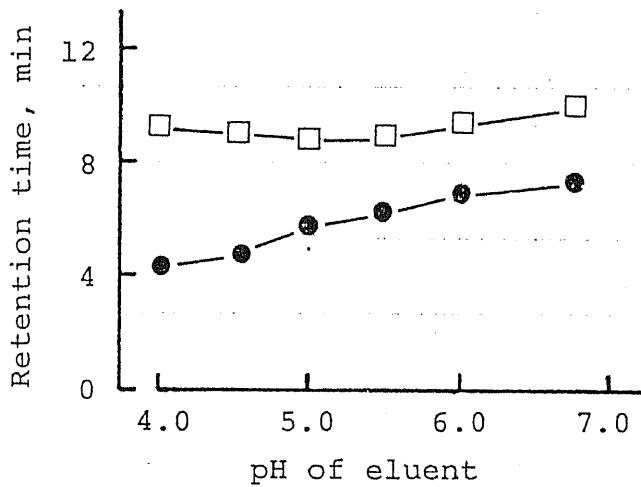


● ; CN^- , □ ; SCN^-

flow rate, 0.5ml/min

column, 3mm i.d. x 100mm

Fig.2-4 Effect of pH on Retention Time
of CN^- and SCN^-



●; CN^- , □; SCN^-

column: TSK Gel LS-222 (3mm i.d.
x 100mm)

eluent: 0.1M acetate buffer (pH
4-6) or phosphate buffer
(pH7) containing 0.2M NaClO_4

flow rate: 0.5ml/min

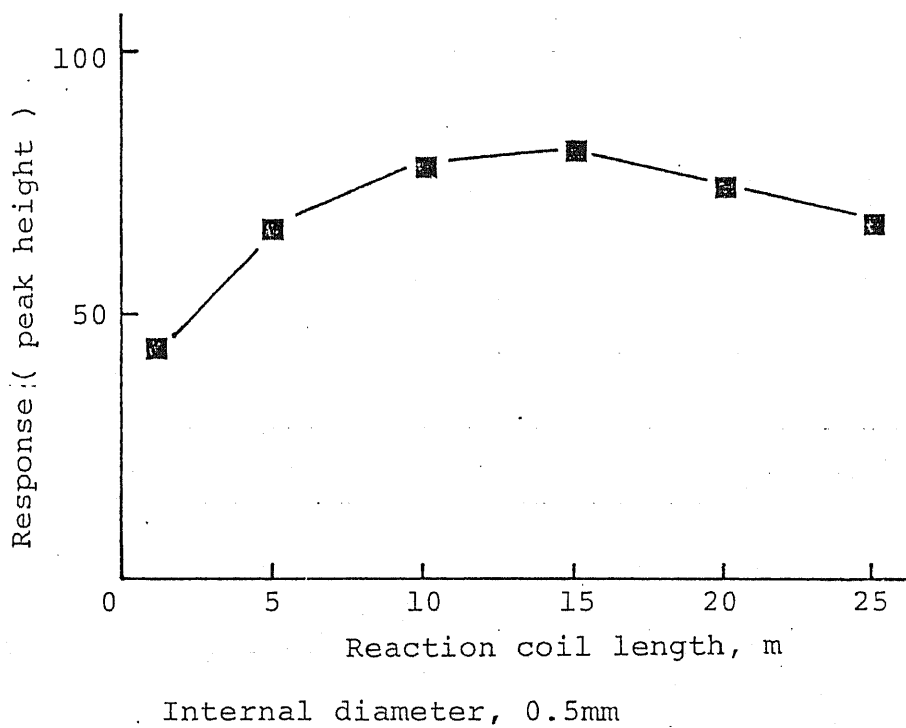
分離条件は次のように決定した: 分離カラム; TSK Gel LS-222 を内径 3 mm, 長さ 100 mm のガラスカラムに充填. 溶離液; 0.2 M 過塩素酸ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液. 流速; ガラスカラムの保護およびイオン交換樹脂の耐圧性を考慮し 0.5 ml/min.

2.3 検出条件

用手法で求めた CN^- および SCN^- の発蛍光反応の至適条件を HPLC の検出系に適用するための検討を行った.

溶離液の pH は 5.0 を用いたため, 検出系における発蛍光反応に際し, 特に pH を調整する必要はない. (Fig. 1-2) 又, 各試薬の濃度も, 溶離液の流速 (0.5 ml/min) と, クロロミン T, ヒンジン-バルビツール酸試薬を送液するポンプの流

Fig.2-5 Effect of Reaction Coil Length on Response



速比を用手法における容量比に調整することで容易に求めることができる。しかし、発蛍光に要する反応時間をコイルの長さで調節する場合、コイルを通過することによるゾーンの拡散を考慮しなければならない。そこで、ポリジーン-バルビツール酸試薬を添加後検出器に接続するまでのコイル長さについて調べた。即ち、内径 0.5 mm のテフロンチューブを長さ 2.5 m (反応時間 RT ; 0.7 min) から 25 m (RT ; 7.0 min) の範囲で変えて、ピーク高さに及ぼす影響を調べた。

Fig. 2-5 に示すように、 15 m を用いたときピーク高さが最大となった。 20 m , 25 m を用いたときピーク高さが小さくなるのは、ピークの広がりによるもので、ピーク面積は 15 m のときと変化はなかった。よって、反応コイルは内径 0.5 mm , 長さ 15 m のテフロンチューブを用いることにした。

以上の検討により確立された HPLC の諸条件を Table 2-1 に示す。又、本条件で $1.0\text{ }\mu\text{M}$ の CV^- , SCN^- の標準混合液を HPLC に注入して得

Table2-1
Chromatographic Conditions for Determination of CN^- and SCN^- by
Fluorometry

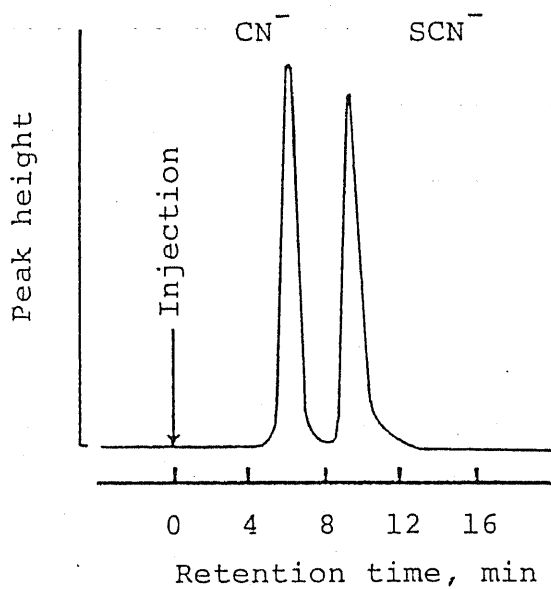
column..	glass tube, (3mm i.d. x 100mm)
resin	TSK Gel LS-222 (6 μm)
mobile phase	0.1M acetate buffer(pH 5.0) containing 0.2M sodium perchlorate (flow rate;0.5ml/min)
chlorination reagent	0.1% chloramine T aqueous solution (flow rate; 0.1ml/min)
P-B reagent*	mixture of 1.5g barbituric acid, 15ml pyridine, 3ml concentrated hydrochloric acid and 82ml water (flow rate;0.1ml/min)
temperature	room temperature
detector	Shimadzu fluorescence spectrometer, RF-530 Ex.583nm, Em.607nm
sampl size	20 μl

*; pyridine-barbituric acid reagent

られたクロマトグラムを Fig. 2-6 に示す。 CN^- は 6 分、 SCN^- は 9 分に分離検出される。 ピーク高さ法で CN^- 、 SCN^- の定量範囲を求めたところ、 注入量 $20 \mu l$ で CN^- は $0.05 - 10.0 \mu M$ 、 SCN^- は $0.1 - 15.0 \mu M$ で定量可能であった。 試料量が微量であることも含め、 他の蛍光法に比べて 5 倍から 10 倍の感度が得られ、 超微量の CN^- 、 SCN^- が測定可能となった。 又、 注入量を $40 \mu l$ から $100 \mu l$ と変えて検量線を作成したところ、 SCN^- については $100 \mu l$ まで良好な直線性を示した。 CN^- は試料調製に要する水酸化ナトリウムの影響でクロマトグラムが再現性に欠け、 $40 \mu l$ 以上の注入は適当でない。 以上の結果、 $0.02 \mu M$ の CN^- 、 $0.01 M$ の SCN^- が検出可能であることがわかった。

2.4 妨害物質

無機陰イオン、 陽イオンを中心に妨害物質について調べた。 結果を Table 2-2、 および 2-3 に示す。 操作は、 各物質と CN^- 、 SCN^- の混合溶

Fig.2-6 Typical Chromatogram of CN^- and SCN^- 

sample; mixture of $1.0\mu\text{M}$ KCN and KSCN
injection volume, $20\mu\text{l}$

Table2-2

Effect of foreign anions on determination of CN^- , SCN^-

Ion	Added as	Recovery %	
		CN^-	SCN^-
NO_2^-	NaNO_2	80.9	101.7
NO_3^-	NaNO_3	100.0	100.9
SO_3^{2-}	Na_2SO_3	95.2	100.0
SO_4^{2-}	Na_2SO_4	100.0	100.0
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	76.2	110.2
Cl^-	NaCl	100.0	100.0
PO_4^{3-}	Na_2HPO_4	100.0	101.7
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	100.0	100.0
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	95.2	101.7
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	103.2	100.9

sample: CN^- ; 25 μM , SCN^- ; 25 μM , anion; 10 mM

Table2-3

Effect of metals on determination of CN^- , SCN^-

Metal	Added as	Recovery, %			
		0.1N NaOH		1% EDTA	
		CN^-	SCN^-	CN^-	SCN^-
Cu^{2+}	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	15.8	80.5	92.1	100.0
Co^{2+}	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	5.2	100.0	79.2	100.0
Ca^{2+}	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	92.5	100.0	100.0	100.0
Ag^+	AgNO_3	0	0	0	0
Hg^{2+}	HgCl_2	-	-	-	-
Ni^{2+}	NiSO_4	14.0	100.0	34.2	100.0
Fe^{3+}	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	74.0	92.5	100.0	100.0
Zn^{2+}	ZnSO_4	26.3	100.0	100.0	100.0

sample: CN^- ; 25 μM , SCN^- ; 25 μM , metal; 10 mM

液を 0.01M の水酸化ナトリウムで調製し、室温で一定時間放置後、HPLC に注入した。多くの無機陰イオンは全く影響しないことが明らかとなったが、チオ硫酸イオン ($S_2O_3^{2-}$) については CN^- の回収率が減少し、 SCN^- が増加する。アルカリ性で $S_2O_3^{2-}$ と CN^- から容易に SCN^- が生じることがわかった。一方、アルカリ性で水酸化物として沈殿する数種の金属陽イオンは、これをろ過し、ろ液を HPLC に注入したが、 CN^- 、 SCN^- は全く回収されないか、又は回収率が減少する。よって、銀、水銀、コバルト、銅、ニッケルなどの重金属を含む試料は直接 HPLC に注入できない。

2.5 分離カラムの再生

HPLC に用いた分離カラムは標準試料を注入するのみであれば、1日約10時間の使用で3ヶ月以上全く劣化することなく使用できる。しかし、重金属類を含む試料を注入すると CN^- 、 SCN^- のクロマトグラムが再現性を失い、標準試料を注入

しても良好な分離, 溶出は期待できない。これは, 分離カラムに重金属が吸着し, 影響しているものと考えられる。この場合, 1%のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を約 40 ml ポンプで送液し, カラムを洗浄する。その後, 約 40 ml の溶離液で平衡化すれば, CN^- , SCN^- は再現性良く分離, 溶出される。

2.6 考察

HPLC を用いて CN^- あるいは SCN^- を定量する方法はこれまでも報告されている。^{37) 38)} しかし, その検出には, 電導度, 紫外部吸収を測定する方法がとられ, 選択性に欠け, その適用範囲は限定されている。本法は特異性が高く, かつ高感度であるため広い範囲において CN^- および SCN^- の分析法として応用が期待される。又, 用手法に比べ精度が高く, 迅速, 簡便な方法と云える。

次章以下の検討は, CN^- , SCN^- の測定をすべて本法により行った。

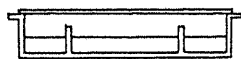
第3章 生体内 CN^- および SCN^- の測定

生体試料中の CN^- , SCN^- の分析を目的とした場合, 除たん白などの前処理操作が必須となる。しかし, 前処理法として標準化された方法はなく, 生体試料の種類, CN^- , SCN^- の存在量などによって最適な方法を確立する必要がある。著者は, 生体試料として血液, および尿を対象に, この前処理法について検討を行った。

生体試料に限らず, 環境水中の CN^- を測定するとき, 一般に行われている前処理法は大別すると拡散法³⁹⁾⁴⁰⁾, 通気法⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾ の2種である。その装置の概略を Fig. 3-1 に示す。特に, 生体試料を分析する場合には試料の採取量に限界があるため, 比較的微量の試料で適用可能な拡散法⁴⁴⁾⁴⁵⁾ が広く用いられている。この拡散法には Fig. 3-1 の (A) に示した Conway Cell, (B) に示した Cavett Flask の2種が用いられているが, 著者は, 操作が簡単な Conway Cell を用いた前処理法を詳細に検討した。

Fig.3-1 Pretreatment for the Determination of CN^- in Biological Samples

1. microdiffusion method

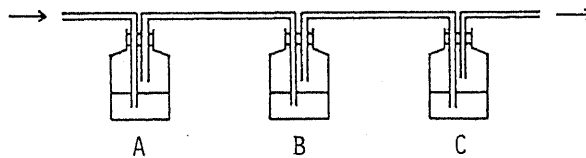


(A) Conway cell



(B) Cavett flask

2. aeration method



A: 0.1N NaOH, B: sample in acidic soln., C: 0.1N NaOH.

一方、 SCN^- の測定における除たん白法についても、酸を用いた方法や限外ろ過法について調べた。血液試料はウサギから随時採血して用い、尿は健常人の尿を用いた。以上検討の結果、生体試料中の CN^- 、 SCN^- を測定するための、確立した前処理法をそれぞれ Fig. 3-2, Fig. 3-3 に示す。

以下、3.1 に尿の分析法、3.2 に血漿の分析法、3.3 に赤血球の分析法について詳しく述べる。

3.1 尿の分析法

CN^- は Table 3-1 に示すようにその溶液の pH により解離度が大きく異なり、⁸⁹⁾ pH の低下とともにシアン化水素として揮散するため、対象とする試料の pH は厳密に調整しなければならない。一方、 SCN^- は強酸であるため、チオシアン化水素の揮散は通常の方法において考慮する必要はない。そこで、尿の pH を種々変化させて CN^- 、 SCN^- の標準液を添加した尿について回収実験を行った。同時に室温で放置した場合の経時的な変化も調べた。結果を Fig. 3-4

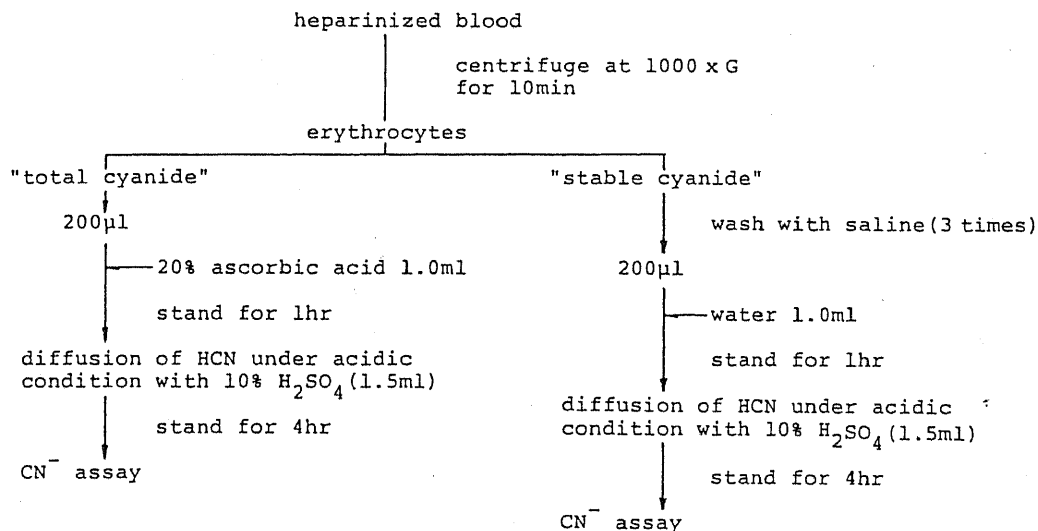
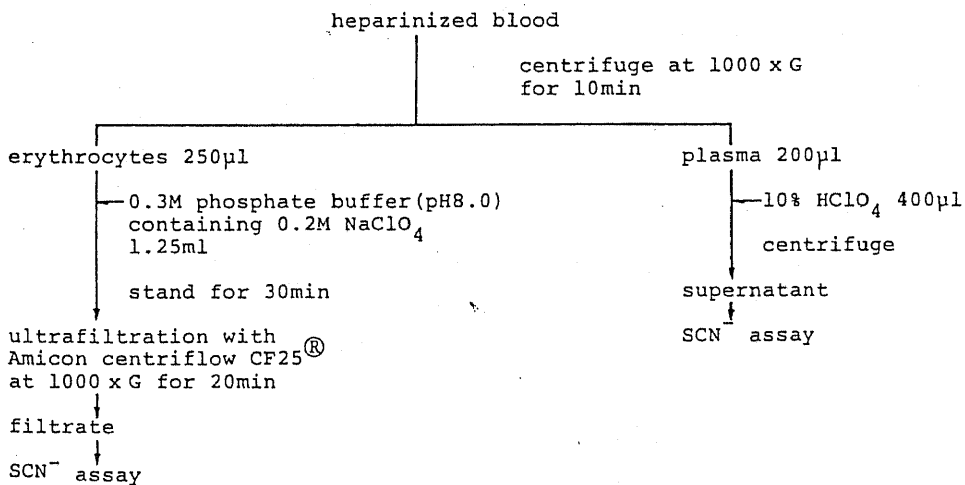
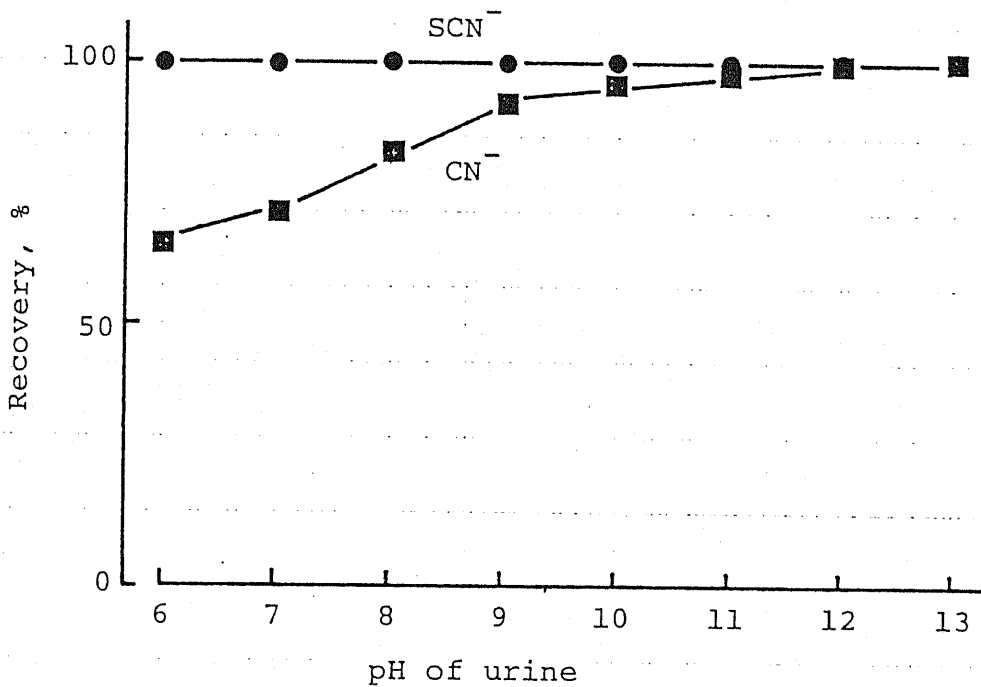
Fig.3-2 Assay procedure for CN^- in ErythrocytesFig.3-3 Assay Procedure for SCN^- in Blood

Table3-1
Effect of pH for dissociation of HCN ⁸⁹⁾

pH	6	7	8	9	10	11	12	13
$\frac{\text{HCN}^-}{\text{HCN} + \text{CN}^-} \times 100$	99.9	99.3	93.3	58.1	12.2	1.37	0.14	0.01

dissociation constant of HCN (K_a) = 7.2×10^{-10} (25°C)

Fig.3-4 Effect of pH of Urine on Recovery of CN^- and SCN^-



urine sample; $1\mu\text{M}$ of CN^- , and $10\mu\text{M}$ of SCN^-

were added

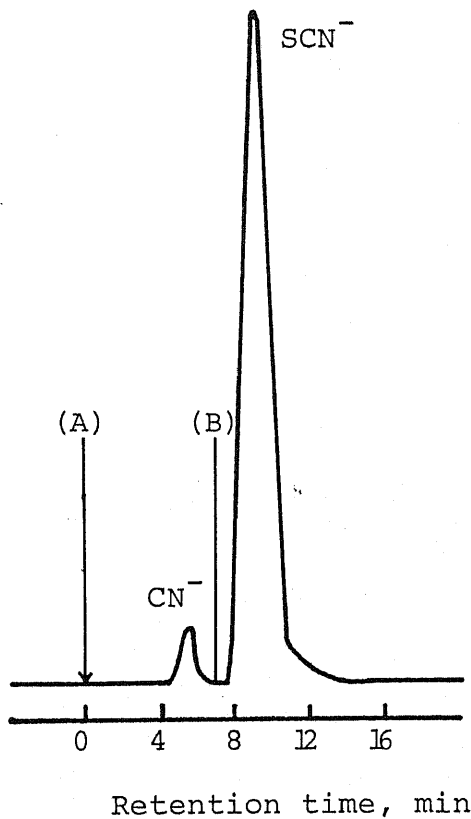
standing time; 30min at room temperature

に示す。SCN⁻の回収率は調べたpHの範囲で全く影響を受けず良好であった。又、CN⁻はpH12以上で放置時間に関係なく安定に存在することわかった。しかし、pH5から7の範囲では放置するに依りCN⁻の回収率は低下した。HPLCに尿を注入するために浮遊物を除去しなければならないが、その操作に要する時間を考慮し、採尿後、直ちに水酸化ナトリウムを添加してpHを12以上に調整することにした。この結果、尿は直接HPLCに注入することでCN⁻、SCN⁻が同時に測定できる。Fig. 3-5に尿のクロマトグラムを示す。

3.2 血漿の分析法

血漿中には高濃度のたん白質が存在し、血漿を直接HPLCに注入することはできない。そこで、血漿中CN⁻、SCN⁻を測定するための除たん白法を中心とした前処理法について検討した。

Fig.3-5 Chromatogram of Urine of a Smoker



(A); 20 μ l of urine was injected.

(B); change the detector sensitivity
x2 to x64.

3.2.1 血漿中 CN^- の分析

i) 拡散法を用いた前処理法の検討

著者は、加える酸として硫酸を、又、PHの調整には0.5Mの酢酸緩衝液を用いて、拡散時間、酸性条件について至適な条件を調べた。操作は次のとおりである: KCN標準液(0.01M水酸化ナトリウム溶液) 1.0 ml, 硫酸又は酢酸緩衝液 1.5 ml を Conway Cell の外皿に、0.2M水酸化ナトリウム溶液 1.0 ml を内皿に加え、室温で一定時間放置後、HPLCで0.2M水酸化ナトリウム溶液に捕集された CN^- を測定する。結果を Fig. 3-6 に示す。

PH 5 以下になるように酸を加えれば、 CN^- は 3 時間から 4 時間でほぼ完全に拡散捕集することができると。しかし、生体試料中には種々のたん白質、その他様々な化合物が存在し、 CN^- の拡散が水溶液におけるそれと同一条件で行われるとは考えにくい。

そこで、4%の牛血清アルブミンを含む生理食塩水を試料とし、 CN^- の添加回収実験を行った。

結果を Fig. 3-7 に示す。その結果、硫酸の最

Fig.3-6

Rate of Transfer of HCN by Diffusion with Various Acidities

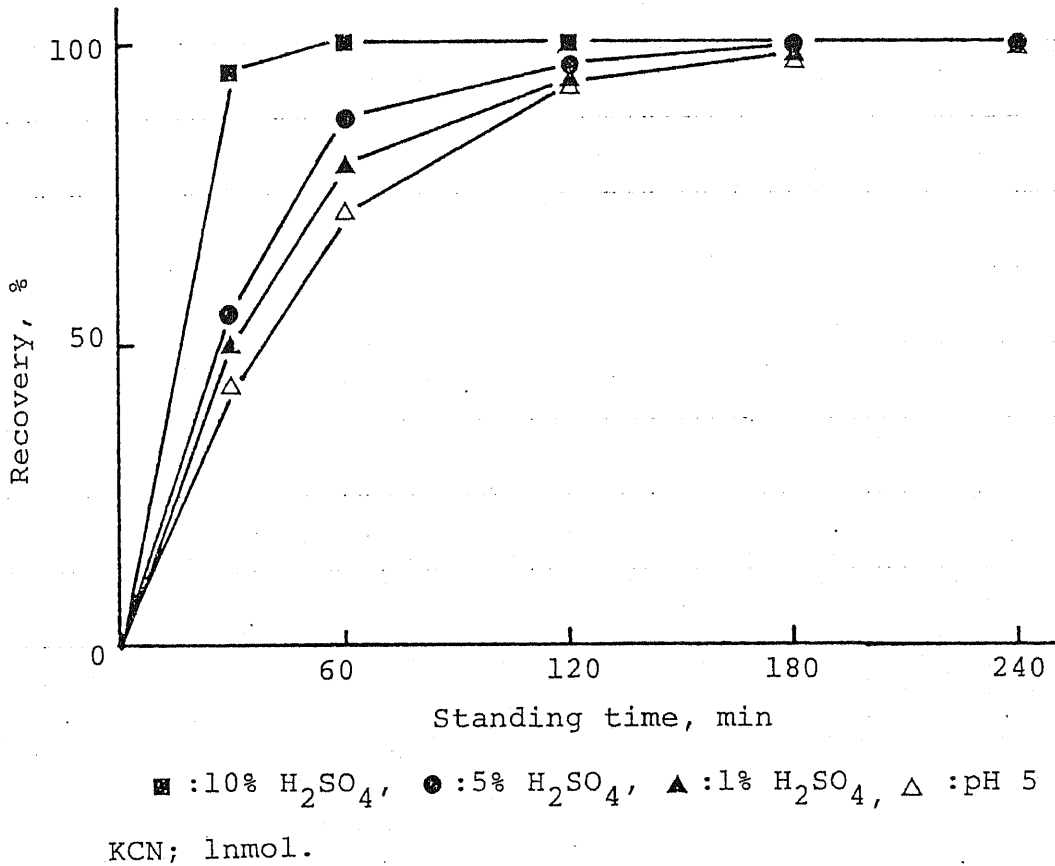
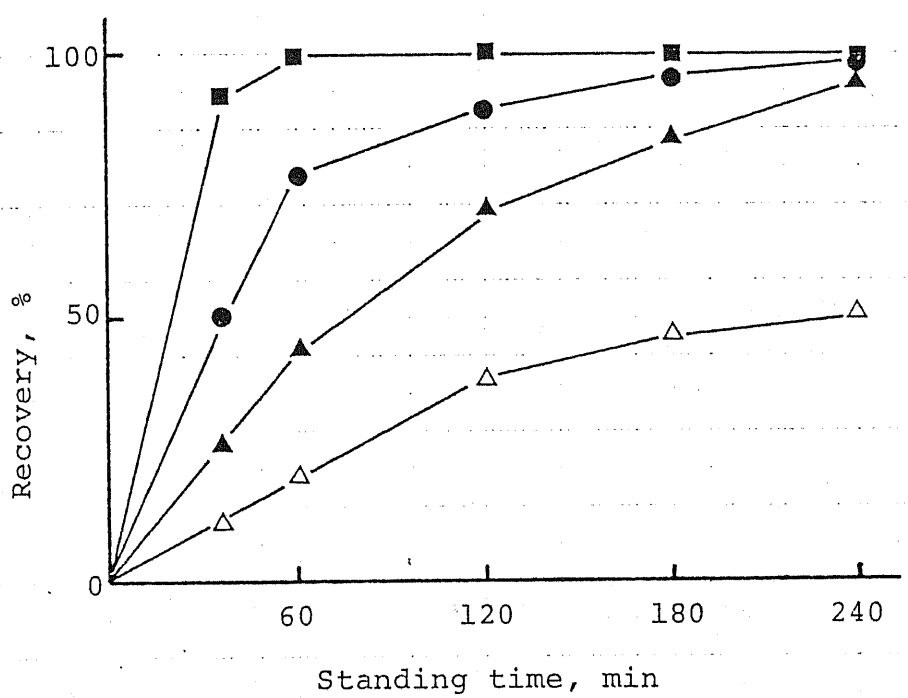


Fig.3-7 Rate of Transfer of HCN from Albumin Solution
by Diffusion with Various Acidities



■ : 10% H₂SO₄, ● : 5% H₂SO₄, ▲ : 1% H₂SO₄,
△ : pH 5.

KCN, 1.0nmol.

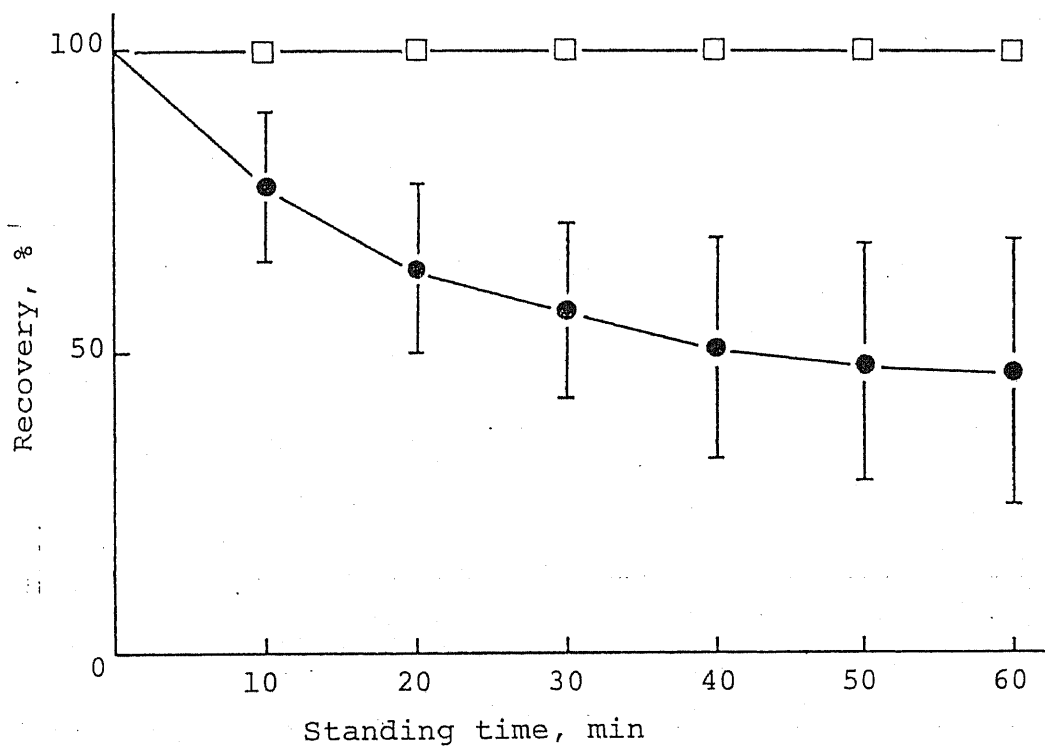
終濃度が3%以上のとき、即ち前述の操作において5%以上の硫酸を用いた場合にのみ、良好な回収率が得られた。以下の検討では、完全を期するため10%硫酸を用いた。

ii) 血漿中 CN^- の消失⁴⁶⁾

ウサギ血漿に生理食塩水で調製した KCN の標準液を加え、Conway Cell の外皿に入れて酸を添加せず室温で一定時間放置する。この放置時間を0分から60分に変化させ、10%硫酸を加える。4時間後、アルカリ捕集された CN^- を測定した。

Fig. 3-8 に示すように、放置時間が長くなるにつれ、 CN^- の回収率が低下するこゝがわかる。すべての操作を Conway Cell で行ったので、 CN^- が揮散消失したとは考えられず、血漿中に強く保持されたか、あるいはシアン酸、アモニア、炭酸へと分解されたものと考えられる。牛血清アルブミンの4%生理食塩水溶液を用いた場合も同様の結果が得られた。

以上の結果より、血漿中の CN^- を測定するためには採血後、直ちに酸性にして前処理せねばならない

Fig.3-8 Disappearance of CN^- Added to Plasma

□ ; saline, ● ; plasma,
1.0 μM of CN^- was added to plasma and saline,
and the mixtures were stood at room temperature.

が、赤血球との分離、並びに操作に要する時間を考慮すると、測定値に対する信頼性が問題となり、この点を明確にしなければ血漿中 CN^- の測定は何ら意味を持たない結果をもたらすと云える。

血漿中での CN^- の代謝、分解などについては、次章でも述べる。

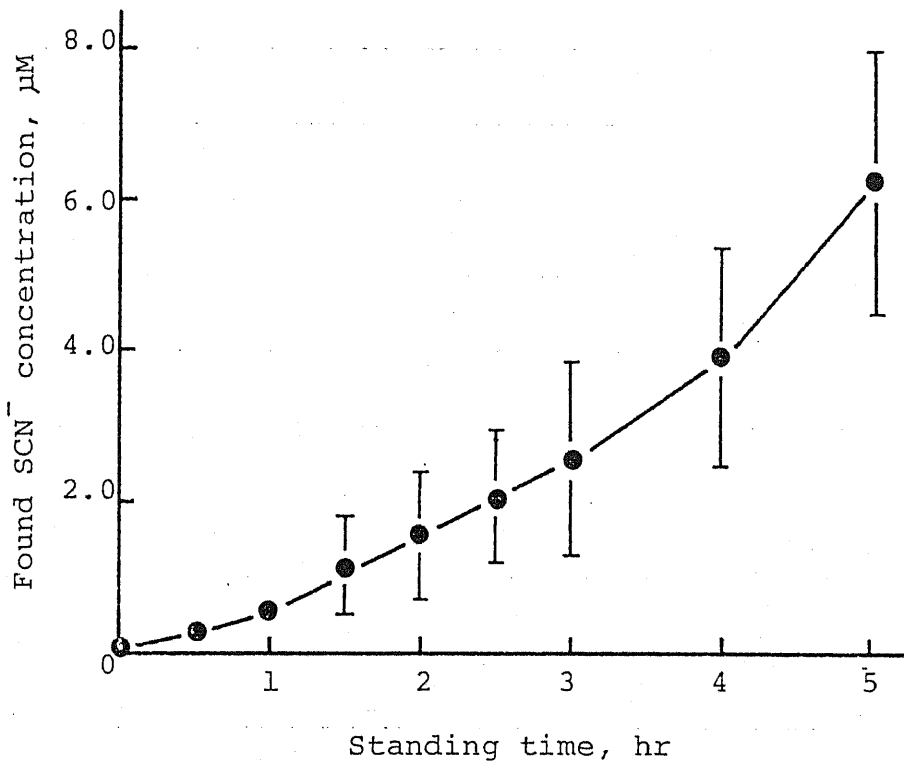
3.2.2 血漿中 SCN^- の分析

血漿中には喫煙者で $50-300 \mu M$ 、非喫煙者で $10-50 \mu M$ の SCN^- が存在すると云われている。⁴⁷⁾⁴⁸⁾ Conway

Cell を用い、硫酸酸性下、 $200 \mu M$ の $KSCN$ を室温で放置すると Fig. 3-9 に示すように放置時間が長くなるに従い、 SCN^- がアルカリ捕集されること HPLC による分離定量の結果、明らかとなった。 SCN^- の拡散には、温度、溶液中の塩濃度が影響すると思われるが温度については $50^\circ C$ 、塩濃度については 40% トリクロ酢酸を用いて調べたところ、 SCN^- の回収率は 10% 前後であり、 SCN^- を測定するための前処理法として拡散法を用いることができなかった。

血漿中の SCN^- を測定するための前処理法として、

Fig.3-9 Rate of Transfer of HSCN by Diffusion at Acidic Condition



Conway Cell: outer chamber, 100μM KSCN(1.0ml),
10% H₂SO₄(1.5ml); inner chamber, 0.2M NaOH(1.0ml),
temperature; room temperature.

過マンガン酸カリウムで酸化分解して CN^- とし、通気捕集する方法,⁴⁹⁾ カラムクロマトグラフィーを用いる方法,²⁵⁾ トリクロロ酢酸で除たん白する方法,⁵⁰⁾ 過塩素酸ナトリウムを加えて、トリクロロ酢酸で除たん白する方法が報告されている。⁵¹⁾ 著者は、これらの方法を検討した上で、過塩素酸で除たん白する方法により良好な結果が得られることを見出した。5 μM , 50 μM の SCN^- を血漿に添加したときの回収率は、それぞれ $98.3 \pm 2.1\%$, $97.6 \pm 3.3\%$ であった。よって血漿中の SCN^- を測定するための前処理法として、Fig. 3-3 に示したように過塩素酸除たん白法を用いることにした。

3.3 赤血球の分析法

3.3.1 赤血球中 CN^- の分析

血漿と同様、Conway Cell を用いる拡散法で前処理法を検討した。まずはじめに、高濃度のたん白質、ヘモグロビンはシアン化水素の揮散に影響すると考えられるので、拡散におよぼす赤血球の溶

血条件について調べた。Table 3-2 に、水 1.0 ml に
 対して血球 0.2 ml から 1.0 ml を加えて溶血し、 CN^- の
 回収率を調べた結果を示す。0.2 ml, 0.4 ml を用い
 たとき良好な結果が得られた。

又、赤血球中の CN^- の測定に際して、Versey⁵²⁾
 らは、赤血球中のヘモグロビンと SCN^- が酸性条件
 下、反応して CN^- が生成することを報告し、赤血球
 中の CN^- を測定する際には SCN^- の除去を目的として
 生理食塩水でよく洗浄してから拡散、あるいは通気
 捕集で CN^- を単離し測定している。著者の検討か
 らも、Table 3-3 に示すように、 SCN^- と赤血球から CN^-
 の生成が明らかである。しかし、塩素イオン、炭
 酸イオンなどの無機陰イオンは赤血球膜を自由に透
 過すると去われており、⁵³⁾ 無機陰イオンである CN^- が洗
 浄により消失することが考えられ、赤血球中の全 CN^-
 量を測定するためには赤血球の洗浄は適当でない。

そこで、赤血球中の全 CN^- 量、即ち "total cyanide" を測
 定するための前処理法について検討した。

ヘモグロビンと SCN^- から CN^- を生成する反応は、3価

Table3-2 Effect of Haemolysate Concentration on CN^- Recovery

Erythrocyte ml	Water ml	CN^- added μM	Recovery* %
0.2	1.0	1.0	101.0
		2.5	100.4
0.4	1.0	1.0	100.0
		2.5	100.0
0.6	1.0	1.0	94.6
		2.5	95.4
0.8	1.0	1.0	89.2
		2.5	85.4
1.0	1.0	1.0	81.8
		2.5	83.8

*Mean of three individual determinations.

Table3-3 CN^- Formation after Addition of Sulfuric Acid to Erythrocytes Containing SCN^-

SCN^- added μM	erythrocyte % as hemoglobin	CN^- found μM
50	1.0	0.31±0.04
	5.0	0.49±0.07
	10.0	0.75±0.06
200	1.0	1.25±0.15
	5.0	1.91±0.30
	10.0	2.98±0.24

Stand for 4hr under acidic condition with 5% H_2SO_4

の鉄と SCN^- を酸性条件下放置すると CN^- を生成することから (Table 3-4), 酸化分解反応⁵⁴⁾ であることが推定された。2価の鉄を共存させても SCN^- から CN^- は生成しない。そこで, 鉄の還元⁵⁴⁾ に通常用いられているアスコルビン酸, ヒドロキシルアミン⁵⁴⁾ を共存させて, 赤血球と SCN^- からの CN^- の生成を調べた。結果を Table 3-5 に示す。高濃度の SCN^- が共存しても CN^- は生成せず, 添加した CN^- は良好に回収できることが明らかとなった。

一方, 生理食塩水で洗浄した赤血球中にも CN^- が存在⁵⁵⁾ することを確認した。この CN^- は赤血球中のメトヘモグロビンの3価の鉄に強く配位しメトヘモグロビンとして存在するものと考えられる。⁵⁵⁾ この CN^- を, "stable cyanide" とし, "total cyanide" と分けて測定することにした (Fig. 3-2)。

3.3.2 赤血球中 SCN^- の分析

赤血球中の SCN^- を測定するための前処理法はこれまで多くの研究者によって試みられ, 共存する多量のヘモグロビンの影響で, 酸による除たん白法,⁴⁹⁾ 水

Table3-4 Effect of Reducing Agent on CN^- Formation with Fe(III) and SCN^-

agent	SCN^- added μM	CN^- added μM	CN^- recovery %
—	0	1.0	100.0
	200	1.0	233.8
ascorbic acid	0	1.0	100.0
	200	1.0	100.2
hydroxyl-amine	0	1.0	100.0
	200	1.0	102.2

ascorbic acid: 20%. hydroxylamine: 10%.

Table3-5 Effect of Reducing Agents on CN^- Formation with Erythrocytes and SCN^-

agent	SCN^- added μM	CN^- added μM	CN^- recovery %
—	0	1.0	98.9
	200	1.0	398.0
ascorbic acid	0	1.0	100.6
	200	1.0	102.8
hydroxyl-amine	0	1.0	99.6
	200	1.0	104.4

酸化亜鉛を用いた除たん白法⁴⁹⁾などでは測定値の変動が大きく使用できないことが明らかにされた。

そこで、著者は、赤血球中より SCN^- が生理食塩水で洗浄可能であることに着目し、赤血球より SCN^- を抽出し、限外ろ過法で高分子成分を除去する方法について検討した。その結果、0.2M 過塩素酸ナトリウムを含む 0.3M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で SCN^- を抽出し、アミコンセントリフロ[®] CF25 (分子量 25,000 カット) コーンメンブレンを用いて 1000 × G, 20 分限外ろ過する方法を確立した (Fig. 3-3)。本法による添加回収実験は、2.5 μM SCN^- で 101.5 ± 1.4%, 10 μM SCN^- で 100.2 ± 0.7% と良好な結果が得られ、赤血球中 SCN^- の分析に十分応用できる。

3.4 健常人血液中 CN^- および SCN^- の分析

健常人男子 7 名より、上腕静脈からヘパリン採血し、赤血球、血漿に分けて CN^- , SCN^- を測定した。結果を Table 3-6 に示す。血漿中の SCN^- 濃度と喫煙との因果関係は、多数報告されている。⁵⁶⁾⁻⁵⁸⁾ 今回、

Table3-6

Determination of CN^- and SCN^- in Human Blood Samples

subject	erythrocyte.			plasma
	total CN^- μM	stable CN^- μM	SCN^- μM	SCN^- μM
I.T.	0.15	0.15	10.6	13.3
*S.T.	0.42	0.40	80.8	82.8
*K.O.	0.44	0.42	84.7	90.0
*T.T.	0.27	0.27	8.0	12.0
K.K.	0.15	0.15	12.4	17.5
I.K.	0.13	0.13	19.3	28.6
*T.T.	0.27	0.25	34.7	44.4

*; smoker

喫煙者4名, 非喫煙者3名について測定を行ったが, 喫煙者, 非喫煙者ともに赤血球中 "total cyanide" と "stable cyanide" との間に大きな差はなく, 赤血球中の CN^- は大部分が "stable cyanide" であることが明らかとなった。しかし, その存在量は喫煙者と非喫煙者との間に明確な違いがあり, 喫煙と赤血球中 CN^- の量にも因果関係があることがわかった。また, SCN^- についてみるならば, 喫煙者の血漿, 赤血球中濃度が非喫煙者に比べ5倍から10倍であり, CN^- の存在量が2倍から3倍であるのに比べ, その差は大きい。

3.5 考察

生体試料, 特に血漿, 赤血球中の CN^- , SCN^- を分析するための前処理法について検討し, これを確立した。ここで, 赤血球中の SCN^- については, Lang¹⁾, Crandall⁵⁹⁾ らがトリクロロ酢酸による除たん白法を用いて, 全血, 血漿中の濃度を測定し, 赤血球には SCN^- が存在しないと結論しているが, その方法

に誤りがあることも指摘した。即ち、酸性条件下では SCN^- が赤血球中ヘモグロビンの鉄と錯体を形成し、遊離型では存在できないことを示した。又、著者が、限外ろ過法による赤血球中 SCN^- 測定のための前処理法 (Fig. 3-3) を確立したことは意義あるものと考えられる。一方、赤血球中の CN^- については、“stable cyanide” と “total cyanide” に分けて測定する方法を確立した (Fig. 3-2)。これらに分けて測定することは、 CN^- の存在様態、代謝過程を研究する上で重要であると云える。

血漿中の CN^- については、経時的に拡散捕集されなくなることを示したが (Fig. 3-8)、酸による前処理法にその問題が含まれるのか、あるいは血漿中に CN^- が吸着されるのか、又は分解する物質が存在しているのかについての疑問には明確な解答を得るにはいたらなかった。次章においてもこの問題につき述べる。

健常人の血漿中 CN^- および SCN^- の測定を行ったが (Table 3-6)、喫煙者と非喫煙者において、

SCN⁻濃度に顕著な差がみられ、CN⁻については2倍から3倍程度であった。この結果から、生体内でCN⁻がSCN⁻に解毒代謝される速度が大いものと考えられる。

一方、喫煙者の中に、血漿、赤血球中のSCN⁻濃度が非喫煙者のそれとほとんどかわらない者がある。Table 3-6 に示された T. T. なる被験者は、採血約2週間前より一日につき10本程度の喫煙を試み、分析した結果である。赤血球中のCN⁻は非喫煙者より高値を示し、喫煙の影響が現われているが、SCN⁻濃度が変化しないといふことから、喫煙量との関係があることも考えられる。

又、赤血球に存在するCN⁻が“stable cyanide”であることは、シアン中毒時の亜硝酸ナトリウムを用いた治療法の効果を説明できる。⁶⁰⁾ 即ち、シアン中毒時、CN⁻の、呼吸鎖チトクロムCオキシダーゼ活性阻害作用を抑制する目的で、赤血球中ヘモグロビンをメトヘモグロビンに変え2安定なシアノメトヘモグロビンを生成させるため、亜硝酸ナトリウムを静注し、

人為的にメトヘモグロビン血症を起こさせる。次いでチオ硫酸ナトリウムの静注により、肝臓、腎臓における CN^- の SCN^- への解毒を促進する方法がとられている。

従って、一般に赤血球中 CN^- が "stable cyanide" として存在するという結果は、生体の自己防衛であると推察される。

第4章 血液中 CN^- および SCN^- の動態と代謝

緒言において述べたように、生体内で CN^- はミトコンドリア酵素である *Rhodanese* によつてチオ硫酸イオンを基質として SCN^- と亜硫酸イオンに、又、*3-mercaptopyruvate sulfurtransferase* によつて 3-メルカプトピルビン酸存在下、 SCN^- とピルビン酸になり解毒される経路が知られている。⁶¹⁾ 生体内 SCN^- の由来については、シアノ配糖体であるアミグダリンなどから生ずる CN^- 、⁶²⁾ 喫煙により取り込まれた CN^- の代謝産物、又、食物から直接摂取された SCN^- であると云われている。

SCN^- の動態についても、その半減期が約14日間であること、⁵⁶⁾ 血清中の SCN^- の約40%がアルブミンと結合していること、⁶³⁾ など徐々にではあるがその研究は進んでいる。

最近、注目すべき報告として SCN^- から CN^- を産生する酵素、*Thiocyanate oxidase* の存在が報告

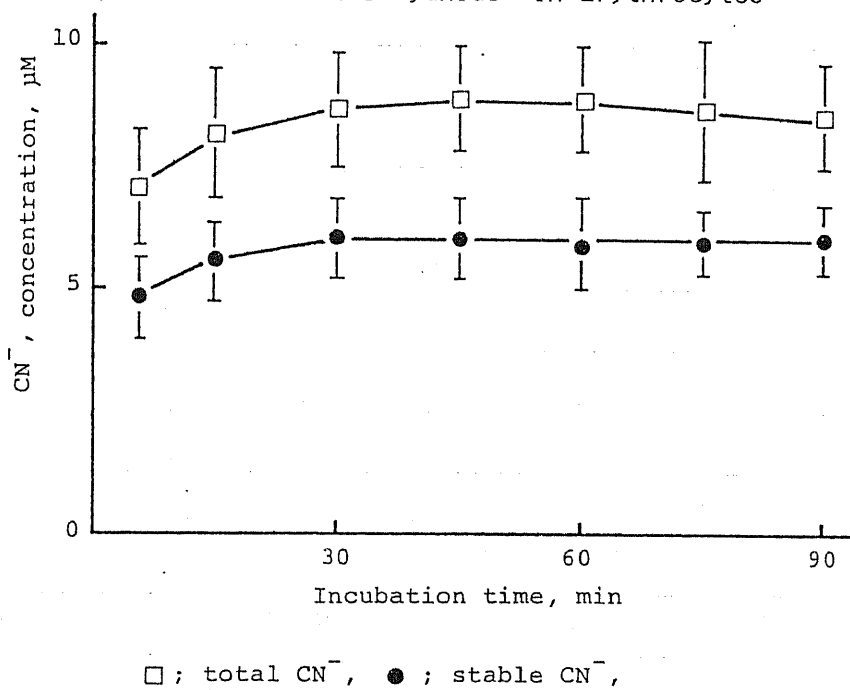
され、⁶⁴⁾⁻⁶⁷⁾ 疾病との関連から盛んに研究されている。CN⁻と因果関係が示唆されている疾病には視神経萎縮症、多発性硬化症がある。視神経萎縮症、多発性硬化症ともに神経組織の脱髓が誘因となって発症すると云われ、⁶⁸⁾ CN⁻の脂溶性により、脂質の比較的豊富な神経組織へCN⁻が蓄積し、障害発症の原因になるものと考えられている。事実、Leber's hereditary optic atrophyとして知られる遺伝的視神経萎縮症の発症が、喫煙を始める20才前後に集中していることも知られている。

そこで、本章においては血液中におけるCN⁻、SCN⁻の動態、および代謝の一部を明らかにすることを目的として検討を行った。

4.1 血液中CN⁻の動態

ウサギの血液をヘパリン採血し、生理食塩水で調製したCN⁻を加え、37°Cでインキュベートする。経時的なCN⁻の動態を赤血球中のCN⁻を測定することによって調べた。結果をFig. 4-1に示す。添加され

Fig.4-1 Effect of Incubation Time on Concentration of "Stable Cyanide" and "Total Cyanide" in Erythrocytes



た CN^- の 90% 以上が血球に局在し、その 70% から 80% が "stable cyanide" として存在することが明らかとなった。

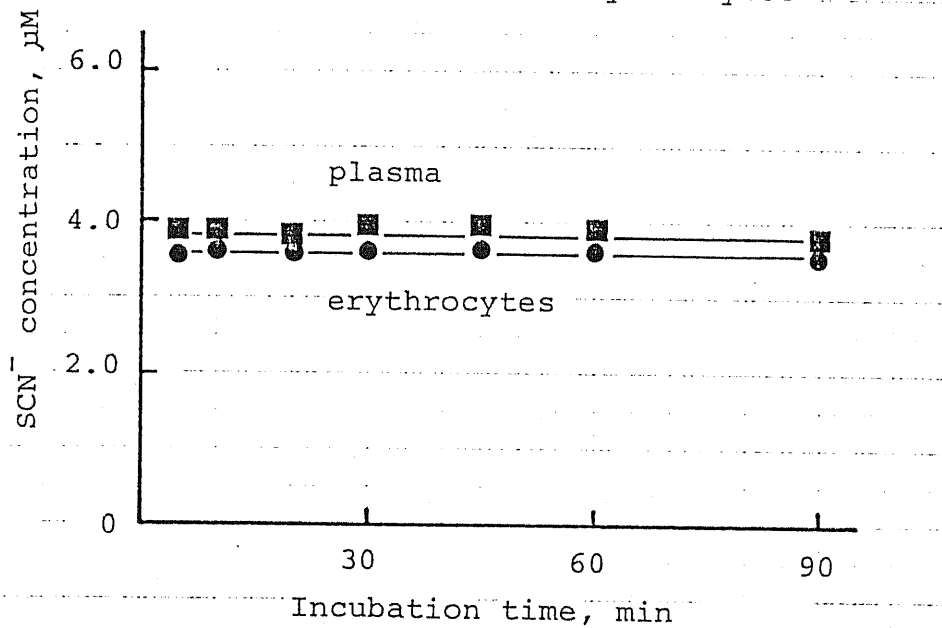
4.2 血液中 SCN^- の動態

CN^- と同様にして、 SCN^- の経時的な動きを調べた。結果を Fig. 4-2 に示す。血漿、赤血球中の存在量にほとんど差がなく、 SCN^- は血液中において単純拡散していることが示唆された。

4.3 赤血球における CN^- の代謝

赤血球中には 3-メルカプト-ピルビン酸を基質として CN^- を SCN^- に代謝する酵素、3-mercapto-pyruvate sulfurtransferase が存在する。⁶¹⁾ 血液に KCN を添加し、37°C でインキュベートすると、血漿中の SCN^- 濃度が上昇することがわかった。そこで赤血球を常法に従って分離し、チオ硫酸ナトリウム、システイン、システインを含む生理食塩水に懸濁した試料に、KCN を加え、37°C でインキュベートしたところ、Fig. 4-

Fig.4-2 Effect of Incubation Time on Concentration of SCN^- in Plasma and Erythrocytes



Heparinized blood containing $2.5\mu\text{M}$ of SCN^- was incubated at 37°C .

3に示すように経時的な SCN^- の増加が観察された。対照としてチオ硫酸ナトリウム、システイン、シスチンを含む生理食塩水に KCN を加えて SCN^- の増加を調べた。

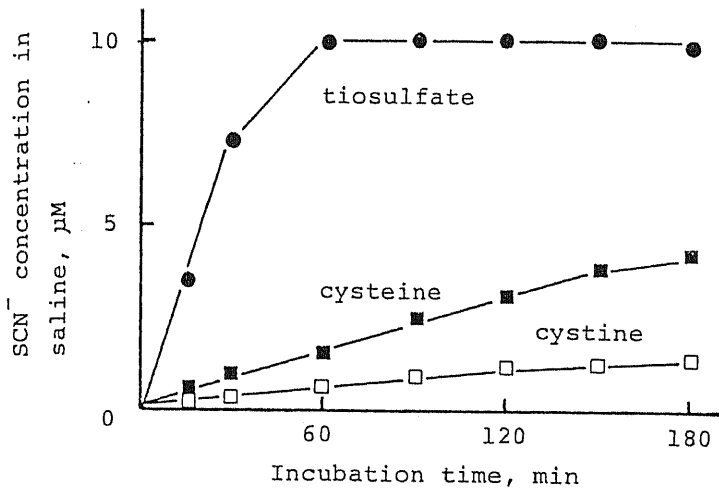
この結果、赤血球にはチオ硫酸ナトリウムと CN^- から SCN^- を生成する系が存在していることが明らかになった。硫黄供与体としてシステイン、シスチンについて調べたが、 SCN^- の生成速度は小さかった。

4.4 ヘモグロビンの Thiocyanate oxidase 活性

ウサギの赤血球を水で溶血し、10%ヘモグロビンを含む溶血液を調製する。ヘモグロビンの濃度は常法に従い、⁷⁰⁾メトヘモグロビンの吸収から求めた。この試料0.2 mlとpH 2.3から7.4までの範囲に調製したリン酸-フエン酸緩衝液9.5 mlに溶解する。これに0.3 M $KSCN$ 0.3 mlを加えて密栓し、37°Cで60分インキュベート後、酸を加えないで N_2 ガスで通気し、 CN^- をアルカリ捕集する。以上の操作により CN^- の生成について調べた結果をFig. 4-4に示す。なお、

Fig.4-3 Effect of Some Sulfur Compounds on SCN^-

Formation in Erythrocytes

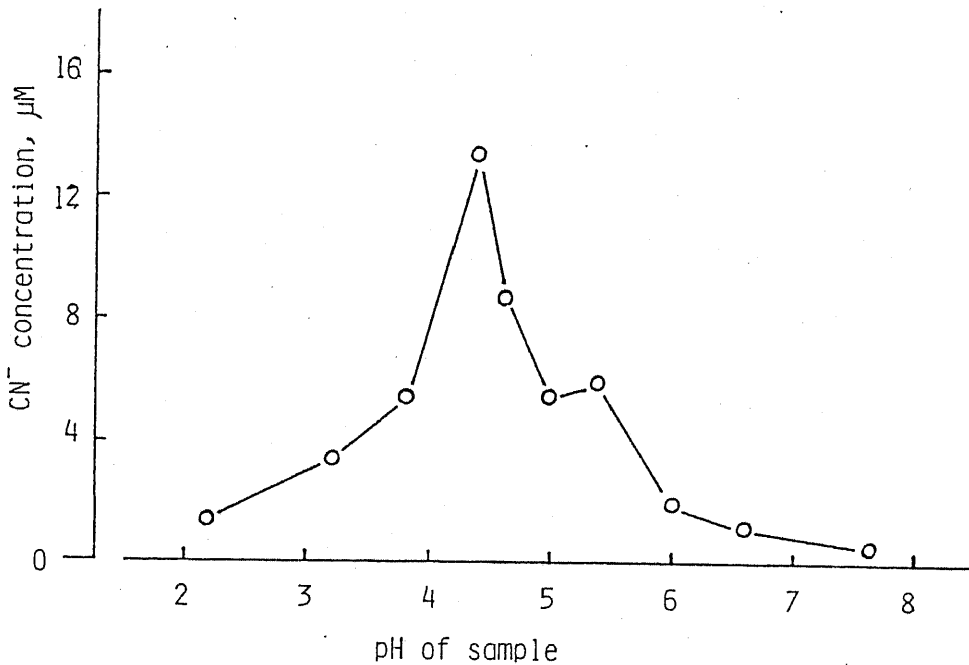


sample: saline containing 30% erythrocytes, 6.0ml

1.0mM KCN in saline, 0.1ml

10.0mM sulfur compound in saline, 0.1ml

Fig.4-4 HCN formation by haemolysates incubated at 37°C with KSCN at various pHs



Experimental conditions were described in the text.

pH 2.3 および pH 7.4 における KCN の添加回収率はそれぞれ $97.4 \pm 4.7\%$, $62.6 \pm 5.1\%$ であった

4.5 考察

血液中での CN^- , SCN^- の動態および代謝について検討を行った。

CN^- は、添加した大部分が赤血球に存在することかわかった。それらが "stable cyanide" として存在することから (Fig. 4-1), *in vitro* において、赤血球中のヘモグロビンが酸化され、メトヘモグロビンが生成し、シアノメトヘモグロビンとして存在しているものと考えられる。しかし、生理的 pH 条件下で CN^- はシアニ化水素として存在すると考えられ (Table 3-1), シアニ化水素の赤血球膜脂質への溶解も無視できない。又、前章で述べたように、血漿に添加した CN^- は消失する。そこで、血漿を sephadex G-150 を充填したカラム (内径 22mm, 長さ 900mm) でゲルろ過し、分子量により分画した各フラクションについて CN^- の添加回収実験を試みた。その結果、高分子量画分

グロブリン画分, アルブミン画分において CN^- の回収率は低下し, たん白質の存在と CN^- の消失に因果関係が認められた. 更に, δ_2 -グロブリン画分に相当するセルロプラスミンの存在する画分においても CN^- の回収率が低下した. *in vivo* において CN^- は速やかに赤血球に集まると思われ, 血漿における CN^- の代謝は副経路であると考えられるが, CN^- の存在様態について考えると興味深い.

以上の検討の結果, CN^- の動態について図示すると, Fig. 4-5 に示すように要約できる.

一方, SCN^- について, CN^- と同様に血液中の動態を調べた.

一般に, 赤血球膜の透過速度について, 無機陰イオンは, 金属陽イオンに比べて 10^8 倍大きいことが知られている.⁵³⁾ そのことから推察すると SCN^- は生理条件下で, 陰イオンとして存在していることがわかる.(Fig. 4-2).

又, 血液における CN^- , SCN^- の代謝について調べた. 赤血球中には CN^- を SCN^- に代謝する酵素が見出

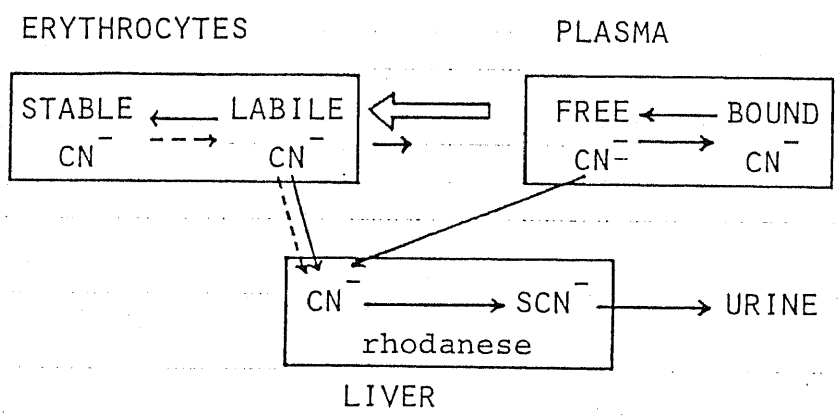
されているが、⁶¹⁾ チオ硫酸イオンを基質とする Rhodanese は見出されていない。⁶¹⁾ 今回、著者が行った予備試験のみで、赤血球中の Rhodanese の存在を推定するのは早計であろう。単に赤血球に存在する銅の触媒効果であることも考えられ、今後の検討が期待される。

ヘモグロビンの Thiocyanate oxidase 活性を調べた結果、pH 4.5 付近でインキュベートすると SCN^- から CN^- が最も多く生成することがわかった。Goldstein ら⁷⁾ は、同様の実験を行い赤血球中には至適 pH 7.4 の Thiocyanate oxidase が存在することを報告している。しかし、彼らの方法は Versey ら⁵²⁾ が指摘しているように、pH 7.4 でインキュベート後、トリクロ酢酸を加えて $90^\circ C$ に加熱しシアン化水素を通気捕集している⁷⁾ ため、 SCN^- から人為的に生成する CN^- を考慮しておらず、誤った結論を与えたものと考えられる。前章における著者の検討からも Versey らの指摘は正しいものと思われるが、一方では、 $KSCN$ の大量投与でシアン中毒を起す

し死亡した例が報告され、⁷²⁾ 又、ウサギに対する KSCN の投与 (0.5 mg/kg) を試みたところ、徐々にはあるが赤血球中の CN^- が上昇する傾向がみられた。以上の結果より、生体内には SCN^- から CN^- を生成する系が存在することは否定できないが、仮に CN^- が生成したとしても正常な状態では、この CN^- が毒性発現に関与するとは考えにくい。

しかし、KSCN の大量投与によるシアン中毒の例を考えると、Rhodanese による解毒代謝系が何らかの原因で抑制されると、多量の SCN^- の存在は、シアン中毒を引き起こす原因となる可能性は常に考慮しなければならない。

Fig.4-5 Several Possible Metabolic Pathways of Cyanide



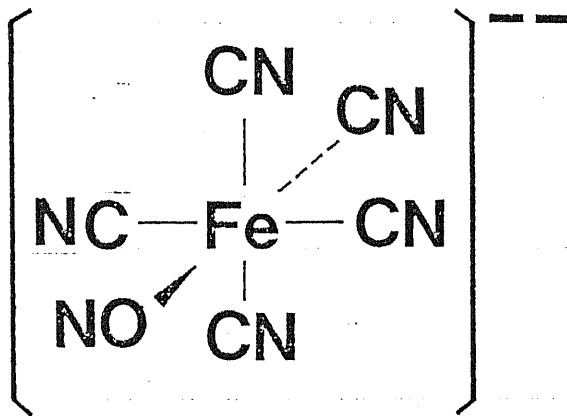
第5章 血圧降下薬 Sodium Nitroprusside の 代謝研究への応用

Sodium Nitroprusside (以下 SNP と略記) は、Fig. 5-1 に示すように3個の鉄に5個のシアノ基、1個のニトロシル基が配位している無機の錯化合物である。1959年、Gifford ら⁷⁴⁾により、SNPの血圧降下薬としての価値が確認されて以来、急速にその有用性が高まり、欧米では一般に使用されている。⁷⁵⁾

SNPの血圧降下作用は、血管壁の自律神経直接支配による末梢血管拡張によるものである。⁷⁶⁾ その作用は速効かつ一過性で投与後1-2分で血圧は降下し、投与中止後1-10分で回復する。⁷⁷⁾ それ故、血圧の制御が容易で血管系の手術に際して広く使用されるようになった。

しかし、SNPの特徴上、連続的な静脈投与方法が用いられ、分解して生成するCN⁻の毒性が考慮

Fig.5-1 Structure of Nitroprusside

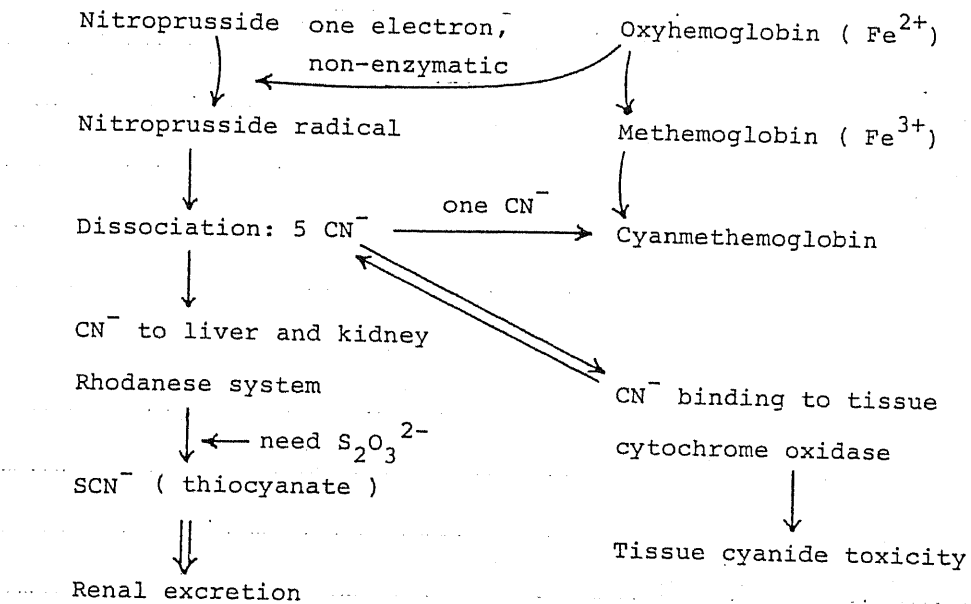


されねばならない。⁷⁸⁾ SNPの投与量の制御は、血圧を測定するという生物学的な指標のもとに行われているのが現状である。SNPの代謝過程は1976年、*Inker*ら⁷⁹⁾によりFig. 5-2に示すような経路が提出されている。又、SNPを投与した患者の血中 CN^- 、 SCN^- 濃度をモニターしてSNPの安全な投薬を図ろうとする試みが行なわれているが、その測定法が確立されているとはいえず、暗中模索の状態といっても過言ではない。そこで、著者の方法を用いてSNPの投与における血液中 CN^- 、 SCN^- 測定法を検討した。同時に、SNPの安定性をその新しい分析法を開発することにより調べた。

5.1 ジアゾカップリング反応を用いたSNPの新しい定量法⁸⁰⁾

SNPは、分析化学の分野において、ケトン、アルデヒド類、その他、硫黄化合物、脂肪族アミンなどの定性試薬として古くから用いられてきた。⁸¹⁾

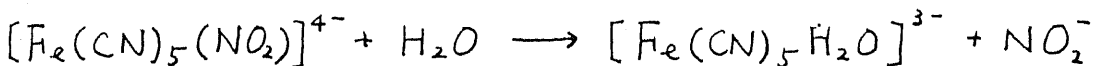
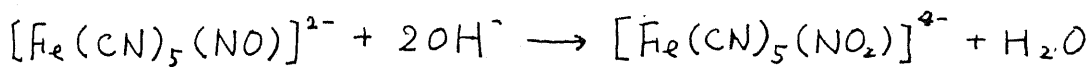
Fig.5-2 Schematic Representation of Nitroprusside Metabolism



又、最近では前述のように臨床分野での汎用性が高まり、その純度、品質管理の点でこれまで以上に精度の良い、高感度なSNPの定量法が要求されている。

現在までに報告されているSNPの定量法にはSNP固有の吸収帯を用いて測定する方法⁸²⁾、イソフロロンを用いた比色定量法⁸³⁾などがあるが、感度、精度の点で問題がある。又、SNPを弱アルカリ性でシステインにより分解し、生成するCN⁻をピリジン-ピラゾロン法で比色定量する方法が報告されているが⁸⁴⁾ 前処理に長時間を要し、又、煩雑な操作を必要として高感度ではあるが実用性に欠ける。

著者は、下記のSNPの反応に着目し、生成する亜硝酸イオンをジアゾカップリング法で測定することにより、SNPを定量する方法について検討した。



5-1-1 定量条件の検討

試料として $50 \mu\text{M}$ SNP (0.5 ml) を用い、アルカリ溶液 (1.0 ml)、 1% スルファニルアミド試薬 (1.0 ml)、 0.1% N - (1-ナフチル) エチレンジアミン試薬 (1.0 ml) を用いて至適条件を調べた。

i) アルカリ濃度

SNPの水溶液、および塩酸酸性溶液に直接ジアゾカップリング反応を行っても呈色しない。しかし、これらの溶液を水酸化ナトリウムでアルカリ性とし、一定時間放置後、ジアゾカップリング反応を行うと呈色する。そこで、SNP水溶液を用いて、各種の濃度の水酸化ナトリウム水溶液を加え、一定時間放置しジアゾカップリング反応を行い至適濃度を調べた。結果を Fig. 5-3 に示す。反応溶液中の水酸化ナトリウム濃度が、 0.067 M 以上で一定の吸光度を示したので、水酸化ナトリウムは 0.2 M を用いることにした。

ii) 反応時間

SNP から亜硝酸イオンを生成する反応につい

Fig.5-3 Effect of NaOH Concentration on Color Development

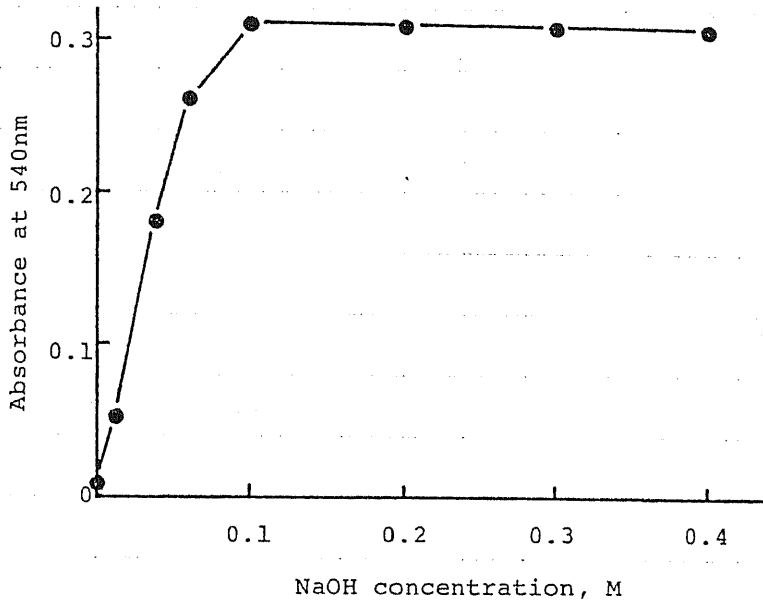
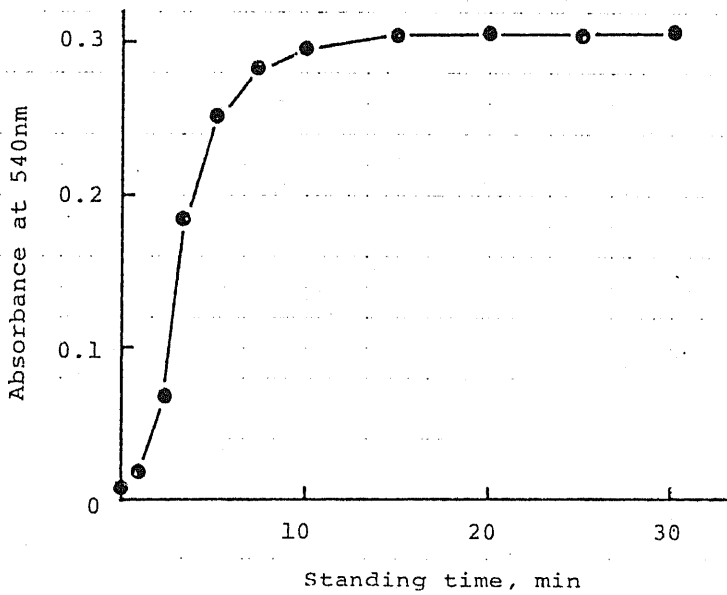


Fig.5-4 Effect of Standing Time at Alkaline Condition on Color Development



2. 経時的に調べた。即ち、水酸化ナトリウムを加えてから1%スルファニルアミド試薬(1.2M塩酸溶液)を加えて液性を酸性にするまでの時間について0.5-30分のあいだで検討した。結果をFig. 5-4に示す。反応時間の経過とともに呈色が増大し15分以上で一定となったので、反応時間は15分と定めた。

iii) 反応温度

SNPから亜硝酸イオンが生成する反応に及ぼす温度の影響について調べた結果、Fig. 5-5に示すように15°C以上で一定となったので、反応は15°C以上で行うことにした。又、亜硝酸イオンに対するジアゾカップリング反応に、温度はほとんど影響しないので、0°C並びに10°Cにおける吸光度の低下はSNPから亜硝酸イオンを生成する反応速度が低下したものと考えられる。

5.1.2 検量線および共存物質の影響

確立した測定操作をFig. 5-6に示す。この操作に従って検量線を作成したところ、1-200

Fig.5-5

Effect of Reaction Temperature on Color Development

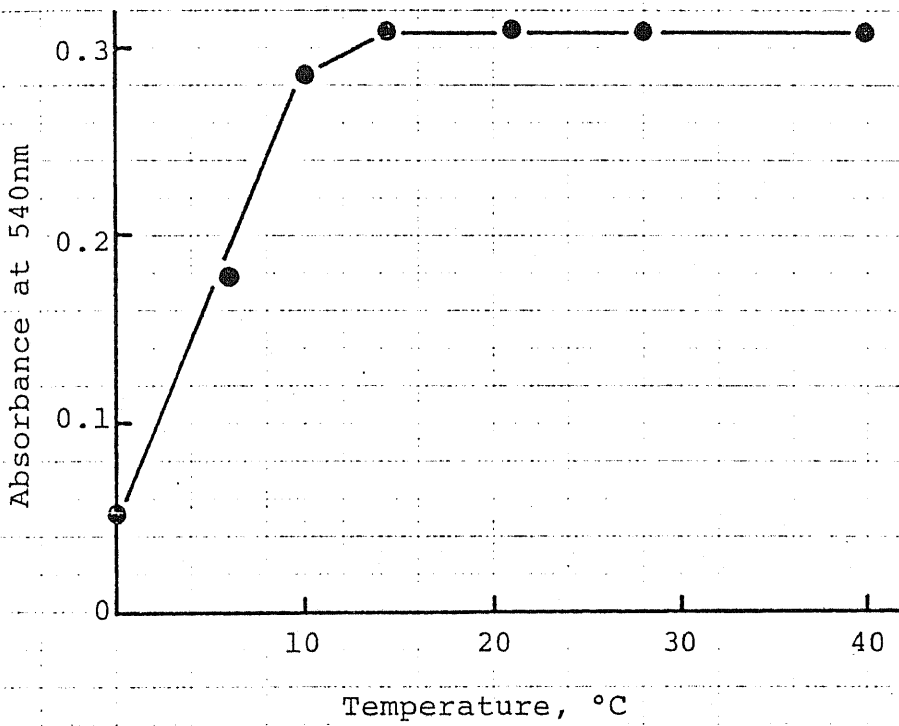
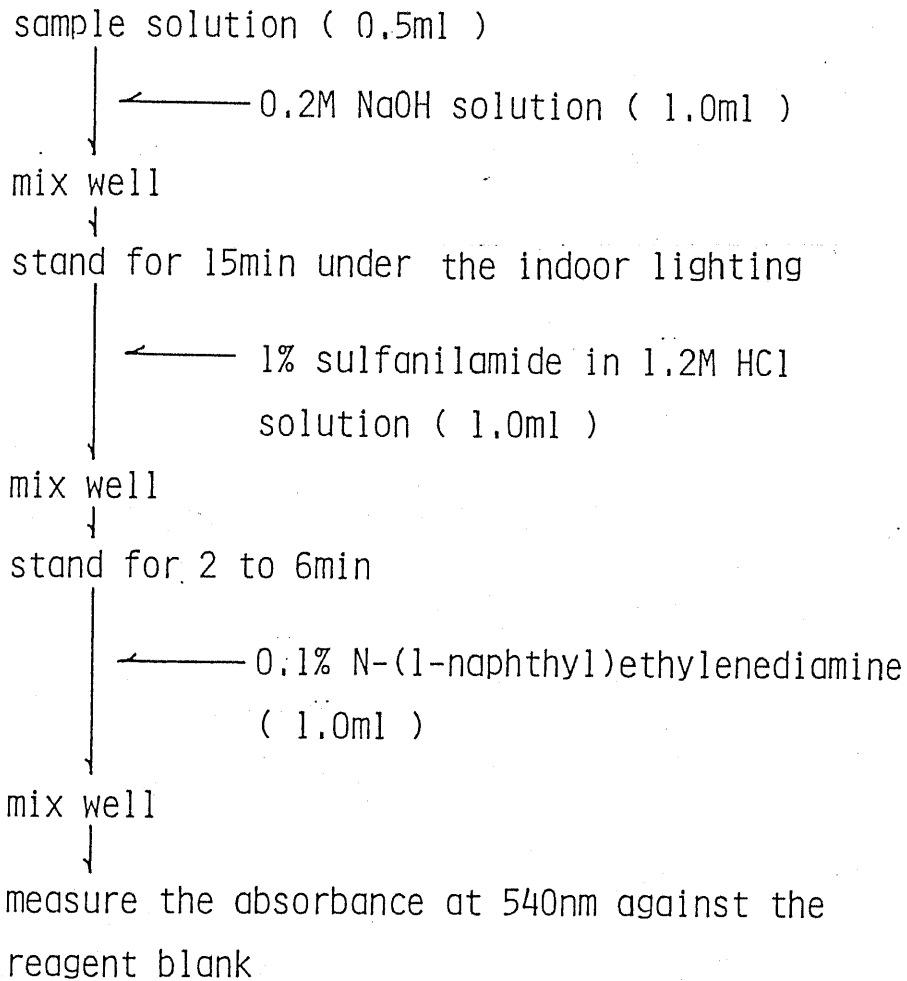


Fig.5-6

Assay Procedure for Sodium Nitroprusside(SNP)



μM で原点を通る直線的な検量線が得られた。
又、6回繰り返しによる測定値の変動係数は
 $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ SNPにおいてそれぞれ1.26%, 0.96%と良好であった。

共存物質について検討した結果を Table 5-1 に示す。ジアゾカップリング反応を用いる亜硝酸イオンを定量する場合に妨害となる物質のほか、アルカリ性で SNP のニトロシル基と反応する硫黄化合物、活性メチレンを有する化合物は、大きな負の妨害を示す。なお、Table 5-1 に示す結果は、SNP と各物質を混合して15分間室温で遮光し放置後、定量操作を行ったものである。

又、亜硝酸イオンが共存する場合は、試料溶液をあらかじめ中性、あるいは酸性にし、亜硝酸イオンのみを測定する。次に確立した定量操作より亜硝酸イオンと SNP の総量を求め、得られた測定値から差し引くことで SNP のみが測定できる。この方法により求めた $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ 亜硝酸イオン共存下における $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ SNP の回収率は

Table 5-1
Effect of Foreign Substances on Determination of SNP

substance	added, mM	Recovery, %
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	5	57.8
Na_2SO_3	5	77.2
Na_2SO_4	5	100.2
Na_2HPO_4	5	100.1
NaCl	5	100.1
NaSCN	5	94.7
NaCN	0.5	103.0
Na_2S	1	0
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	5	90.6
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	5	—*
Cysteine	5	80.8
Acetylacetone	5	45.6
NaNO_3	5	100.1
NaNO_2	0.01	99.4
	0.05	102.0

*; precipitated

99.4% から 102.0% であった。又、SNP から亜硝酸イオンが生成する反応の回収率を、亜硝酸ナトリウム標準液を対照として調べたところ、 $10\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ の SNP でそれぞれ $97.5 \pm 1.3\%$ ($n=6$), $92.2 \pm 0.23\%$ ($n=6$) であった。この結果から、アルカリ性で SNP を放置することにより SNP のニトロシル基はその大部分が亜硝酸イオンとなり遊離することが推察される。

5.2 SNP の安定性

5.2.1 光の影響

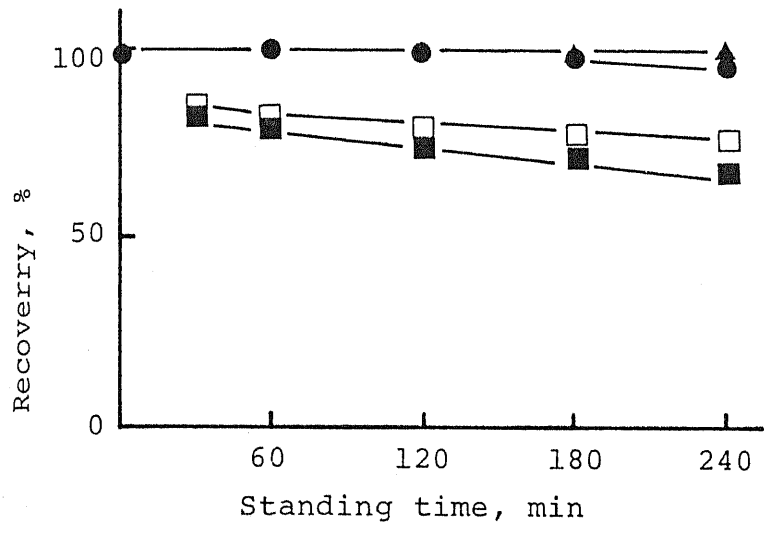
SNP は光によって SNP ラジカルとなり分解し、 CN^- , NO ラジカルを生成することが知られている。⁸⁶⁾ 水溶液、 0.1M 塩酸溶液、 0.1M 水酸化ナトリウム溶液として太陽光に約 30 分照射すると SNP 1モルから 5モルの CN^- が生成することが確認された。又、40 W の蛍光灯から等距離 (約 10 cm) に、ガラスの厚さが均一なパイレックス製試験管に SNP 水溶液を入れ、経時的に SNP をジアゾカップリング法で測定

したところ、Fig. 5-7に示すように $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ SNPは徐々に分解され、室内においても遮光して保存しなければならぬことが明らかとなった。又、アルミ箔で遮光して保存すれば4時間以上安定に存在することが確認された。

5.2.2 酸, アルカリの影響

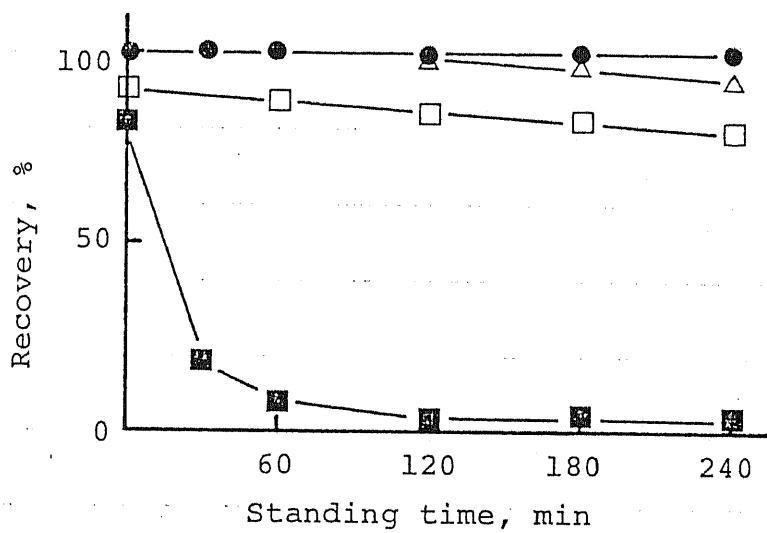
硫酸, 過塩素酸など試料の前処理に用いる酸に対する SNPの安定性, 又, 尿の前処理に用いる水酸化ナトリウムに対する SNPの安定性について調べた。Fig. 5-8に示すように、遮光下において、酸による分解は起こらないことがわかった。しかし、pH 7以上で徐々に分解が進み、アルカリ条件下では、5.1に示した反応でニトロシル基が亜硝酸イオンとなり、更に CN^- も遊離することが明らかとなった。その結果、SNP投与時の血液、尿をアルカリ性にすることは CN^- の正誤差を招く要因となり適当でないことがわかった。しかし、通常 SNPの投与に際して用いられる5%ブドウ糖あるいは生理食塩水中においては遮光下、安定に存在している。

Fig.5-7 Stability of SNP in Aqueous Solution under the Room Light or at Dark Place



●:10µM SNP > at dark place
△:100µM SNP
■:10µM SNP > under the indoor lighting
□:100µM SNP

Fig.5-8 Stability of SNP in Acid or Alkaline Solution

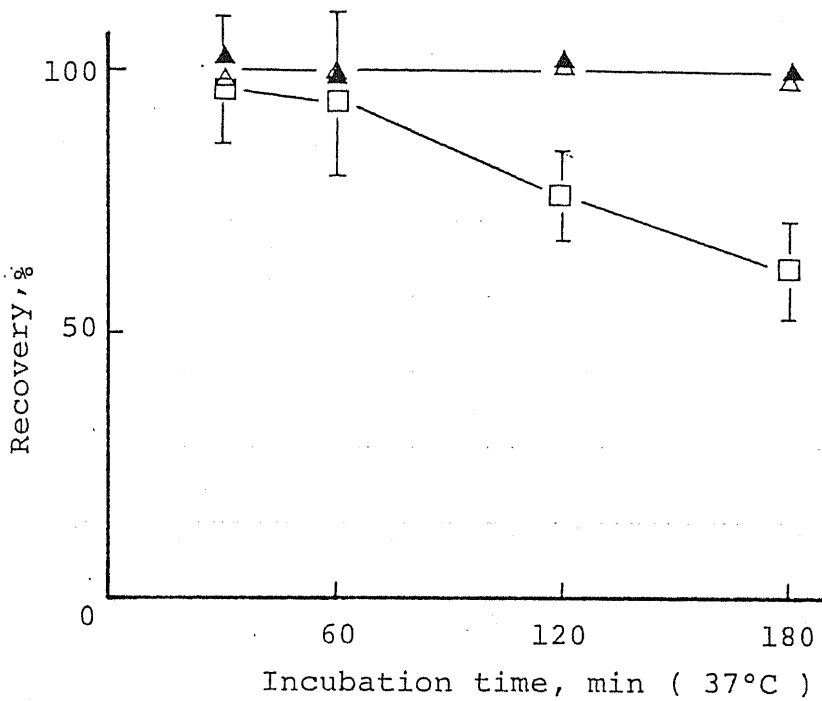


● : 10% HClO₄, △ : pH7, □ : pH9,
■ : 0.1M NaOH. sample: 50μM SNP.
standing at dark place.

5.2.3 血漿，赤血球中でのSNPの安定性

血漿に添加されたSNPは，過塩素酸除たん白法で良好に回収されるこゝがジアゾカップリング法を用いた定量法で確かめられた。この知見をもとに，血漿，ヘパリン処理した血液，生理食塩水にSNPを加え，遮光下，37℃でインキュベートし，経時的なSNPの変化を調べた。結果をFig. 5-9に示す。生理食塩水，血漿中のSNPは60分以上のインキュベートにもかかわらず，ほとんど減少せず，特に血漿中で安定に存在するこゝがわかった。しかし，赤血球が共存すると経時的なSNPの分解が生じるこゝが明らかとなった。又，この時，赤血球中の“total cyanide”および“stable cyanide”を測定するとその値に大きな差はなく，SNP 1分子から1個のCN⁻が放出され，それが“stable cyanide”として赤血球に存在するこゝがわかった。この結果はFig. 5-2に示したオキシヘモグロビンによるSNPの最初の分解過程を示唆するものと思われるが，その

Fig.5-9 Stability of SNP in Saline, Plasma and Blood



▲ ; saline

△ ; plasma

□ ; blood

後、4個の CN^- が検出できない結果は、SNPの分解が赤血球以外の部位でも起こることも考えられる。又、1個の CN^- を放出した後、他の赤血球内成分と安定な錯体を形成し存在していることも否定できない。

5.3 ウサギへのSNPの投与

SNPのウサギに対する最小致死量は、皮下投与で 7.5mg/kg と云われている。⁸⁶⁾ そこで、投与方法を経口、皮下、静脈投与とに分け、致死量以下の投与でそれぞれの場合における血液中 CN^- 、 SCN^- を測定した。

まず、ウサギを48時間絶食させ、SNPを 2.5mg/kg 、水溶液で経口投与した。投与後10分から360分の範囲で約2ml採血し、赤血球中 CN^- 、血漿中 SCN^- を測定したが、全くその濃度に変化はなかった。SNPは経口投与において、消化管内で CN^- への分解は遅いが、吸収されないものと考えられる。

次に、注射用5%ブドウ糖液5mlに 0.7mg/kg

Fig.5-10 Time Course of CN^- Concentration in Erythrocytes and SCN^- Concentration in Plasma after Subcutaneous Administration of SNP to Rabbit

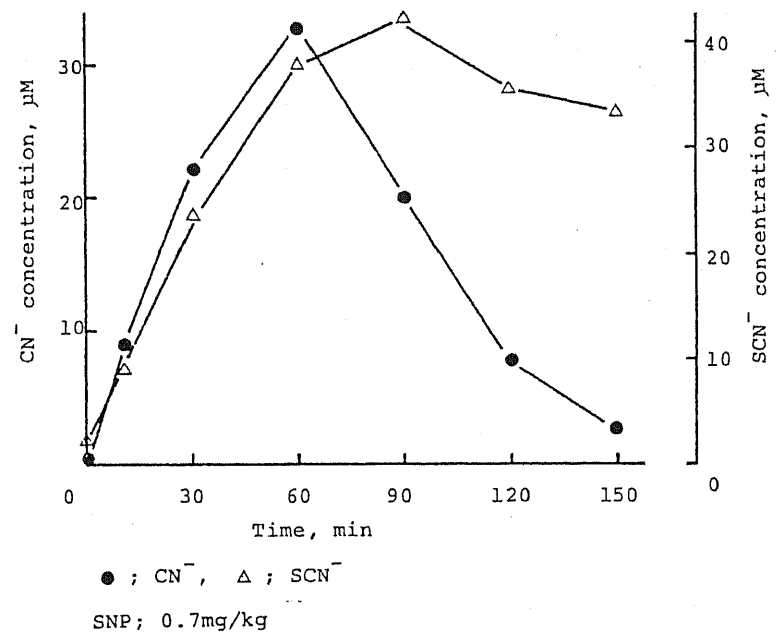
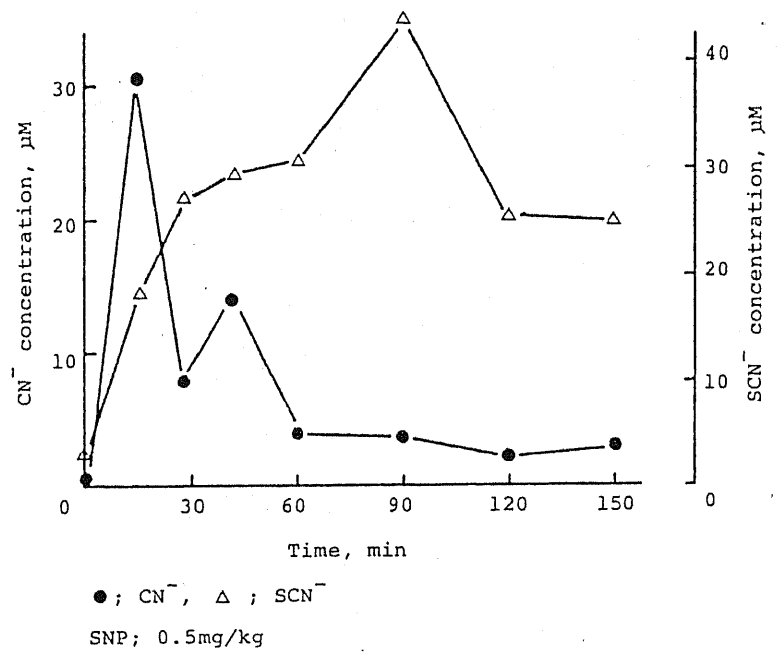


Fig.5-11 Time Course of CN^- Concentration in Erythrocytes and SCN^- Concentration in Plasma after Intravenous Administration of SNP to Rabbit



になるように SNP を溶かし前頸部に皮下投与した。投与後、経時的に赤血球中 CN^- 、血漿中 SCN^- を測定した結果を Fig. 5-10 に示す。投与後 60 分で赤血球中 CN^- が最大値を示し、その後急激に減少していきることがわかる。一方、血漿中 SCN^- は CN^- の上昇にわずかに遅れ、急速に上昇し、90 分で最大値を示しゆるやかに減少していきることがわかる。

更に、SNP 0.5 mg/kg を皮下投与の場合と同様に調製し、その 5 ml を耳介静脈より投与した。投与後、経時的に赤血球中 CN^- 、血漿中 SCN^- を測定した結果を Fig. 5-11 に示す。皮下投与に比べ赤血球中 CN^- の上昇は急速で投与後 10 分で最大値を示した。又、血漿中の SCN^- も急速に上昇するが、一時、赤血球中の CN^- の再度の上昇と同時にゆるやかになることがわかる。

5.4 術中, 術後 SNP 投与患者の血液中 CN⁻ および SCN⁻ の測定

SNP は欧米において高血圧症, 循環器系障害などの治療に常用されているが,^{74) 87)} 本邦においては厚生省の認可は受けておらず, 医師の判断のもとに使用されている。今回, 先天性の心臓障害, 循環器系障害小児の根治手術中, および手術後の血圧コントロールに SNP を用いた血液について, 著者らの方法を用いて CN⁻, SCN⁻ を測定した。13 例について試みたが, その中で手術時の出血, 並びに血圧を低く保つ上で低体温処置 (約 30°C) した群 (Group I) と, 正常体温 (約 37°C) で行った群 (Group II) とに分けて測定を行った。それぞれ比較的長期の SNP 投与を行った例を 3 例ずつ Fig. 5-12, 5-13 に示す。

5.5 考察

SNP の新しい定量法として, アルカリ条件下, 亜硝酸イオンの生成に着目し, ジアゾカップリング反応を

Fig.5-12

CN⁻ Concentration in Erythrocytes during and after SNP Infusion to Child

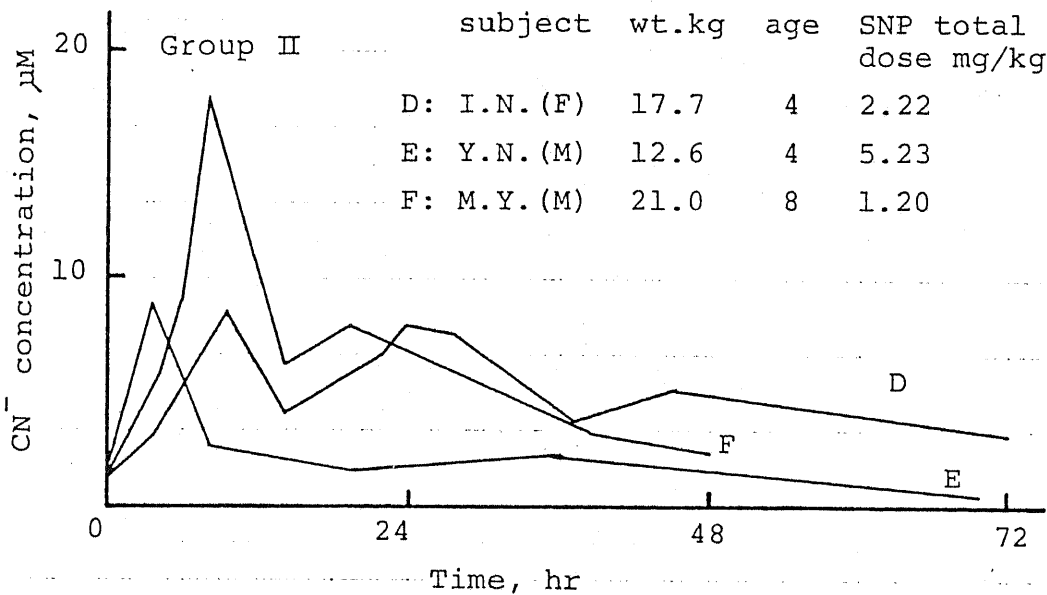
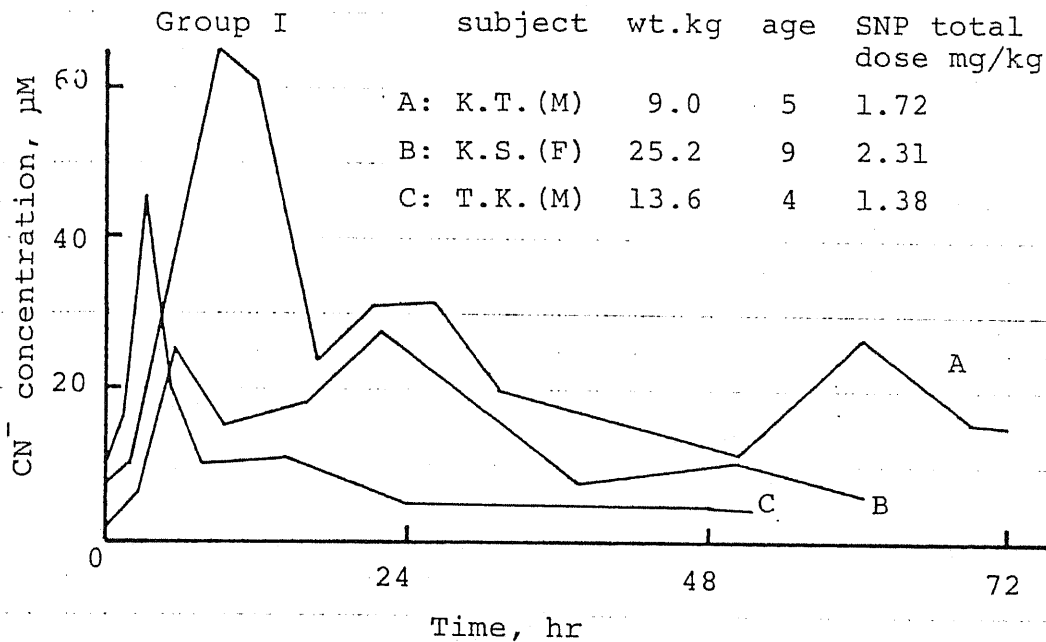
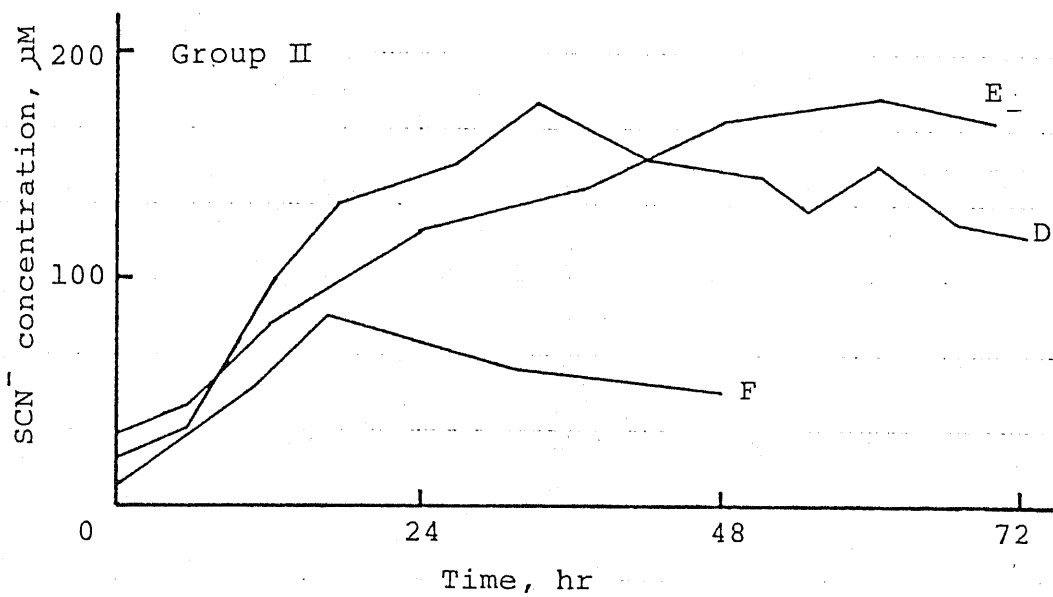
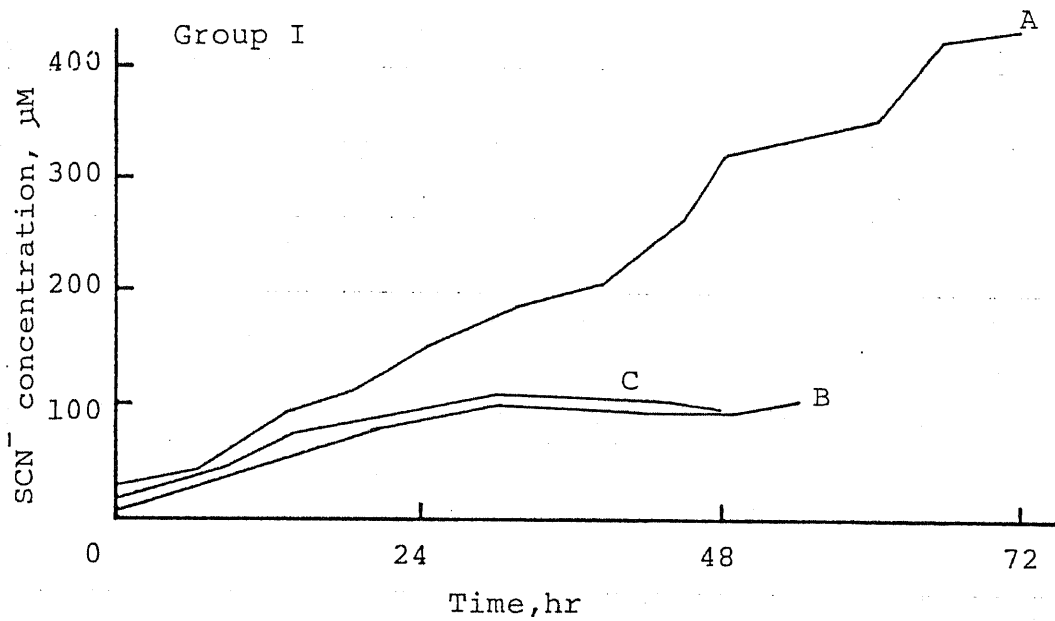


Fig.5-13

SCN⁻ Concentration in Plasma during and after
SNP Infusion to Child



用いた方法を確立した。本法は操作が簡便で比較的高感度でありSNPの測定法として汎用されるものと考えられる。又、本法と、HPLCによる CN^- の定量法を併用し、SNPの安定性について調べたところ、光に対して不安定で容易に CN^- を遊離することがわかった。この結果より薬剤としてSNPを用いる場合は、たとえ室内灯下であっても遮光して保存しなければならない。又、SNPは血液中において赤血球で分解されることがわかった。

ウサギへのSNPの投与実験において、皮下および静脈投与により CN^- の生成が観察されたが(Fig. 5-10, 5-11), その生成に遅れることわずかの差で SCN^- も急速に生成された。この現象は肝臓、腎臓などでの CN^- の解毒代謝がはやいことを示している。又、赤血球に存在する CN^- が"stable cyanide"であったことから、生体内でのシアノトヘモグロビンの生成、およびシアノメトヘモグロビンの CN^- が SCN^- に解毒される反応も急速に起こるものと考えられる。

一方、二次的な CN^- 濃度の上昇が静脈投与の際にみられたが (Fig. 5-11), この現象は、
4章で述べた thiocyanate oxidase による作用と
考えることもできるが、しかし、SNPの二次的な
分解から生じた CN^- の上昇であるという推論も
無視できない。

通常、SNPは静脈から点滴などによる連続
投与が用いられており、⁷⁵⁾ 血液中での分解から
生じる CN^- 、その解毒代謝物としての SCN^- の血中
濃度が問題となる。ウサギを用いた実験から、
SNPより遊離する CN^- は、大部分が "stable cyanide"
として赤血球に存在すること、 CN^- から SCN^- への解
毒代謝が急速であることなどから推察すると、SNP
投与時には血漿中 SCN^- のモニタリングを行うことによ
り、 CN^- の毒性発現を未然に防ぐことができるもの
と考えられる。

ヒトに対する SNP の投与において、低体温処置
群と正常体温群とで顕著な違いが観察される。
即ち、赤血球中 CN^- の濃度が正常体温群に比

が低体温処置群は一樣に高く約3倍の高値が示されていること、血漿中 SCN^- の生成速度がゆるやかであることである。この結果は、低体温処置により、肝臓あるいは腎臓における CN^- の解毒が抑制されたものと考えられる。一方、どちらの群においても連続的なSNPの投与にもかかわらず、SNP投与開始後、急速な CN^- の生成が起こった後は、低濃度で安定していることがわかる。この結果から、高濃度の CN^- が解毒酵素Rhodaneseを誘導したとも考えられる。

又、ウサギにおけるSNP静脈一回投与の際に観察された再度の CN^- の上昇が連続投与でも観察された(Fig. 5-12, 5-13)。SNP, CN^- , SCN^- の代謝過程を考えると興味深い。

更に、赤血球中 CN^- 濃度が $60\mu M$ を示した患者が観察されたが、現在も生存しており、当時も CN^- 中毒の徴候は観察されなかったという報告を受けている。全血中濃度として $10\mu M$ が CN^- の最小致死量と云われており、不可解な結果であるが、毒性発現に

関与できない "stable cyanide" として存在すること
を考えると説明できる。

第6章 総括

本研究から次のことが明らかとなった。

1) Kömig 反応を用いた CN^- および SCN^- の比色定量法を種々検討した結果、ピリジン-バルビツール酸法の呈色物質が発蛍光性を有することを見出した。これに基づいて CN^- , SCN^- の蛍光定量法を検討し、新しい超微量定量法を確立した。

さらに、この反応を高速液体クロマトグラフィーの検出系に応用し、分離カラム、溶離条件などを調べ、精度、感度ともに優れた、これまでに類をみない CN^- , SCN^- の同時定量法に発展させた。

本法は、操作も簡便で、環境水中の濃度が問題とされている CN^- の測定は、直接、試料を注入するだけで、特別な前処理を行わずに可能である。

2) 生体内 CN^- および SCN^- を測定するために、

種々の方法について検討し、これを確立した。

本法を用いた健康人血液中の CN^- および SCN^- の測定、並びに血液中における CN^- 、 SCN^- の動態、代謝研究への応用を試み、適用可能であることを明らかにした。

3) SNP から定量的に亜硝酸イオンを生成する条件を調べ、ジアゾカップリング反応を応用した SNP の新しい比色定量法を確立した。

本法を用いて SNP の安定性を検討し、その性質を一部明らかにした。

4) ヒトおよびウサギにおける SNP の代謝を検討し、新しく確立した CN^- 、 SCN^- および SNP の定量法が、生化学、臨床化学の分野において十分、適用できることを明らかにした。

実験の部

第1章 新しい蛍光定量法の確立

1.1 試薬

CN^- の標準液は、シアン化カリウム（和光純薬，試薬特級）を、0.1 M 水酸化ナトリウムを用いて約 0.1 M 溶液を調製し、Liebig-Dénegès 法で滴定してその濃度を求めた。 SCN^- の標準液はチオシアン酸カリウム（和光純薬，試薬特級）を 0.1 M、水に溶解して標準試料として用いた。これらを保存溶液とし、使用に際しては、適宜希釈して用いた。検出試薬として用いた試薬類は、市販の特級品をそのまま用いた。水はイオン交換樹脂を通し、二度蒸留して用いた。

1.2 装置

分光光度計は、分光光度計 100-50 型、および 181 型、蛍光光度計は 蛍光分光光度計 MPF 4 型、吸収スペクトルは 自記分光光度計 340 型、赤外吸収スペクトルは 自記赤外分光光度計 254 型（日立製作所製）をそれぞれ用いて測定した。

第2章 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による CN⁻ および SCN⁻ の分離定量法の確立

2.1 試薬

1.1 に同じ。

充填剤には、強塩基多孔性ポリスチレン樹脂 TSK Gel LS-222 (東洋曹達), 強塩基ヘリキュラー型シリカ樹脂 TSK Gel IEX 520 QAE を用いて 益進製薬(株)製ハイレックスカラムに充填して用いた。

2.2 装置

HPLC は、益進製薬(株)製 シングルフランジャー型ポンプ PSU-2.5 および PSU-3.2, TSK Gel LS-222 を充填したカラム, 島津製作所製 HPLC 用蛍光検出器 RF-530, および 島津製作所製記録計 R-11M で構成した。

試料の注入は、マイクロシリンジを用い、セフトムラバーを用いる注入器を六方バルブに取り付け、使用した。

第3章 生体内 CN^- および SCN^- の測定

3.1 試薬

1.1 に同じ。

通気捕集に用いた N_2 ガスは純度 99.99% (小沢酸素) を用いた。

3.2 装置

Conway Cell は市販の規格品 (紫田理化) を用いた。通気装置は JIS シアン分析用規格品を用いた。限外ろ過は、アミコンセントリフロ-[®] CF 25 を常法で処理して用いた。

遠心分離機は KN-70, KN-15 (久保田) および SC-15AR (トミー) を用いた。

3.3 動物

日本白色種およびニュージーランド白色種 ウサギ (雄, 体重 2.7 kg - 3.7 kg) を固型飼料と水道水で 1 週間以上予備飼育してから実験に用いた。

第4章 血液中 CN^- および SCN^- の動態と代謝

4.1 試薬

1.1 に同じ

4.2 装置

3.2 に同じ

インキュベーターは BT-21 (ヤマト) および サーモユニット C-600 (大洋) を用いた。

4.3 動物

3.3 に同じ

第5章 血圧降下薬 Sodium Nitroprusside の 代謝研究への応用

5.1 試薬

1.1 に同じ

Sodium Nitroprusside は JIS 規格品 および 日本ロッキン社製を用いた。投与に際しては 注射用 5% ブドウ糖に溶解して用いた。

5.2 装置

3.2 に同じ

5.3 動物

3.3 に同じ

5.4 ヒトの血液試料

採血後、遮光して遠心分離し、血漿、赤血球に分け、 -15°C で凍結後、冷凍のまま運搬し、暗所で解凍して試料とした。

謝 辞

本研究，並ひに本論文の作成に当り，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜，た千葉大学薬学部教授今成登志男先生に厚く御礼申し上げ，深く感謝いたします。

また，本研究に当り，御懇篤なる御助言を賜わりました千葉大学薬学部助教授田口清水先生，田辺信三先生，緒方惟治先生，貴重な試料を御提供して下さいました国立小児病院の先生方に厚く御礼申し上げます。

さらに，種々御援助を賜，た千葉大学薬学部薬品分析化学研究室の大学院，卒業研究の皆様に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Lang, S., Arch. Exp. Path. Pharmac., 34, 247 (1894).
- 2) Lang, K., Biochem. Z., 259, 243 (1933).
- 3) Smith, A. D. M., and Foulkes, M., Nature (London), 209, 919 (1966).
- 4) Boxer, G. E., and Rickards, J. C., Arch. Biochem., 39, 7 (1952).
- 5) Wood, J. L., and Cooley, S. L., J. Biol. Chem., 218, 449 (1956).
- 6) Goldstein, F., and Rieders, F., Am. J. Physiol., 167, 47 (1951).
- 7) Goldstein, F., and Rieders, F., Am. J. Physiol., 173, 287 (1953).
- 8) Bertrand, I., and van Bogaert, L., Rev. Neurol. (Paris), 1, 779 (1925).
- 9) Leber, T., Albrecht v. Graefe's Arch. Ophthal., 17, 2.Abt., 249 (1871).
- 10) Fowler, R. C., and Dubetacki, A. J., Am. J. Physiol., 171, 724 (1952).
- 11) Feldstein, M., and Klendshoj, N. C., J. Lab. & Clin. Med., 44, 166 (1954).
- 12) Epstein, J., Anal. Chem., 19, 272 (1947).
- 13) König, W., J. Prakt. Chem. ii, 69, 105 (1904).
Ibid., 83, 325 (1911); 84, 558 (1911).
- 14) Durst, R. A., Anal. Lett., 10, 961 (1977).
- 15) Hanker, J. S., Gamson, R. M., and Klapper, H., Anal. Chem., 29, 879 (1957).

- 16) Guilbault, G. G., and Kramer, D. N., *Anal. Chem.*, 37, 918 (1965).
- 17) Takanashi, S., and Tamura, Z., *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1633 (1970).
- 18) Funazo, K., Tanaka, M., and Shono, T., *Anal. Chem.*, 53, 1377 (1981).
- 19) Valentour, J. C., Aggarwal, V., and Sunshine, I., *Anal. Chem.*, 46, 924 (1974).
- 20) Völlmin, J. A., Omura, I., Seible, J., Grob, K., and Simon, W., *Helv. Chim. Acta*, 49, 1768 (1966).
- 21) Bowler, R. G., *Biochem. J.*, 38, 385 (1944).
- 22) Butts, W. C., Kuehneman, M., and Widdowson, G. M., *Clin. Chem.*, 20, 1344 (1974).
- 23) Gilman, H., "Organic Chemistry" vol. II, 2nd ed., pp. 1174, Wiley, New York, 1945.
- 24) Baker, M. O., Foster, R. A., Post, B. G., and Hiett, A., *Anal. Chem.*, 27, 448 (1955).
- 25) Lundquist, P., Martenson, J., Sörbo, B., and Ohman, S., *Clin. Chem.*, 25, 678 (1979).
- 26) Aldridge, W. N., *Analyst*, 69, 262 (1944).
Ibid., 70, 474 (1945).
- 27) Bark, L. S., and Higson, H. G., *Talanta*, 11, 471 (1964).
- 28) Murty, G. V. L. N., and Viswanathan, T. S., *Analytica Chimica Acta*, 25, 293 (1961).
- 29) Toida, T., Tanabe, S., and Imanari, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 3763 (1981).

- 30) Jennen, J. J., and Vandenbrouele, O. H., U.S. Patent 2644754
July 7 (1953).
- 31) Giraudi, G., and Grills, C., *Analytica Chimica Acta*, 128,
169 (1981).
- 32) Yagi, K., *Biochem. Med.*, 15, 212 (1976).
- 33) Imanari, T., Tanabe, S., and Toida, T., *Chem. Pharm. Bull.*,
30, 3800 (1982).
- 34) Sörbo, B., and Ohman, S., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38,
521 (1978).
- 35) Pollay, M., Stevens, A., and Davis, C. Jr., *Anal. Biochem.*,
17, 192 (1966).
- 36) Sawyer, W. H., and Puckridge, J., *J. Biol. Chem.*, 248, 8429
(1973).
- 37) Bond, A. M., Heritage, I. D., and Wallase, G. G., *Anal. Chem.*,
54, 582 (1982).
- 38) Imanari, T., Tanabe, S., Toida, T., and Kawanishi, T.,
J. Chromatogr., 250, 55 (1982).
- 39) Broderius, S. J., *Anal. Chem.*, 53, 1472 (1981).
- 40) Kruse, J. M., and Thibault, L. E., *Anal. Chem.*, 45, 2260 (1973).
- 41) Worley, F. P., and Brown, V. R., *J. Chem. Soc., Trans.*,
111, 1057 (1917).
- 42) Schneider, C. R., and Freund, H., *Anal. Chem.*, 34, 69 (1962).
- 43) Claeys, R. R., and Freund, H., *Environ. Sci. Technol.*, 2,
458 (1968).
- 44) Morgan, R. L., Isom, G. E., and Way, J. L., *Toxicol. Appl.
Pharmacol.*, 50, 323 (1979).
- 45) Baar, S., *Analyst*, 91, 268 (1966).
- 46) Pettigrew, A. R., and Fell, G. S., *Clin. Chem.*, 18, 996 (1972).

- 47) Vogt, T. M., Selvin, S., Widdowson, G., and Hulley, S. B.,
Am. J. Public Health, 67, 545 (1977).
- 48) Dastur, D. K., Quadros, E. V., Wadia, N. H., Desai, M. M.,
and Bharucha, E. P., Br. Med. J., 3, 260 (1972).
- 49) Boxer, G. E., and Rickards, J. C., Arch. Biochem., 39, 292
(1952).
- 50) Bowler, R. G., Biochem. J., 38, 385 (1944).
- 51) Landis, J. B., Rebec, M., and Pardue, H. L., Anal. Chem.,
49, 785 (1977).
- 52) Vesey, C. J., and Wilson, J., J. Pharm. Pharmac., 30, 20
(1978).
- 53) 柴田 進, 「图解-赤血球」 第一版, p.340, 金芳堂 (1979).
- 54) 平野 四蔵 他 「無機 応用比色分析」 2, 334 (1974) 共立出版.
- 55) Smith, R. P., and Kruszyna, H., Fed. Proc., 35, 69 (1976).
- 56) Pettigrew, A. R., and Fell, G. s., Clin. Chem., 18, 996 (1972).
- 57) Densen, P. M., Davidow, B., Bass, H., and Johnes, E., Arch.
Environ. Health, 14, 865 (1967).
- 58) Wilson, J., and Matthews, D. M., Clin. Sci., 31, 1 (1966).
- 59) Crandall, L. A. Jr., and Anderson, M. A., Am. J. Digestive
Diseases Nutrition, 1, 126 (1934).
- 60) Naughton, M., Anaesth. Intens. Care, 11, 351 (1974).
- 61) Hamer, C. J. A., Morell, A. G., and Scheinberg, I. H.,
J. Biol. Chem., 242, 2514 (1967).
- 62) Sayer, J. W., and Kaymackalan, S., New Engl. J. Med., 270,
1113 (1964).
- 63) Solomon, R. J., Silva, P., Bend, J. R., Epstein, F. H.,
Am. J. Physiol., 229, 801 (1975).

- 64) a) Oram, J. D., and Reiter, B., *Biochem. J.*, 100, 373 (1966).
b) Chung, J., and Wood, J. L., *Archs Biochem. Biophys.*,
141, 73 (1970).
- 65) Sörbo, B., and Llungren, J. G., *Acta Chem. Scand.*, 12, 470
(1958).
- 66) Maloof, F., and Soodak, M. J., *J. Biol. Chem.*, 239, 1995
(1964).
- 67) Ohkawa, H., Ohkawa, R., Yamamoto. I., and Casida, J. E.,
Pest Biochem. Physiol., 2, 95 (1972).
- 68) Smith, A. D., *Lancet i*, 1001 (1961).
Ibid., *Lancet ii*, 668 (1964).
- 69) Wilson, J., *Clin. Sci.*, 29, 505 (1965).
- 70) 藤井達三, 渡辺 富久子, 奥田 潤, 「臨床化学概論」 p.116 廣川書店 (1977) 第6版.
- 71) Gettler, A. O., and Goldbaum, A., *Anal. Chem.*, 19, 270 (1947).
- 72) Pines, K. L., and Crymble, M. M., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*,
81, 160 (1952).
- 73) Smith, A. D. M., and Foulkes, M., *Nature*, 209, 919 (1966).
- 74) Gifford, R. W. Jr., *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 34, 387
(1959).
- 75) Tuzel, I. H., *J. Clin. Pharmacol.*, 14, 494 (1974).
- 76) a) Page, I. H., Corcoran, A. C., Dustan, H. P., and Koppanyi,
T., *Circulation*, 11, 188 (1955).
b) Bhatia, S. K., and Frohlich, E. D., *Am. Heart J.*, 85, 367
(1973).
- 77) Wildsmith, J. A. W., Marshall, R. L., Jenkinson, J. L.,
MacRae, W. R., and Scott, D. B., *Brit. J. Anaesth.*, 45, 71
(1973).

- 78) Kim, Y. H., Foo, M., and Terry, R. D., Arch. Pathol. Lab. Med., 106, 392 (1982).
- 79) Tinker, J. H., and Michenfelder, J. D., Anaesthesiology, 45, 340 (1976).
- 80) 戸井田 敏彦, 小林 一則, 今成 登志男, 分析化学, 印刷中.
- 81) a) Cambi, L., Attiaccad. Lincei, 22, I, 376 (1913).
b) Feigl, F., and Anger, V., Mikrochim. Acta, 1, 134 (1937).
c) Pavolini, T., Boll. Chim. Farm., 69, 713 (1930).
- 82) Philip, C. E., Manalili, F. S., Umagat, H. J., Hagel, R. B., and Gomez, R. J., Pharm. Sci., 67, 1752 (1978).
- 83) Carpignano, R., Ann. Chim.(Rome), 45, 81 (1955).
- 84) Rodkey, F. L., and Collison, H. A., Clin. Chem., 23, 1969 (1977).
- 85) Morand, P. J., Borghi, E. B., Schteingart, L. M., and Blesa, M. A., J. Chem. Soc.(Dalton), 1981, 435.
- 86) Frank, M. J., Johnson, J. B., and Rubin, S. H., J. Pharm. Sci., 65, 44 (1976).
- 87) 池田 良雄, 「薬物致死量集」 初8版 p.135 南山堂 (1977).
- 88) Eppens, H., Brit. J. Anaesth., 45, 124 (1973).
- 89) JIS, K 0102-1974, p. 142, Table29.1.