

Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討 第3報

Thiamphenicol および Thiamphenicol glycinate hydrochloride の定量法

金沢 保・片山幸一・河部 靖・藤田 孟・山本伸郎

エーザイ株式会社研究本部薬理研究所

金 政 泰 弘

岡山大学医学部微生物学教室

(昭和 44 年 4 月 17日受付)

Thiamphenicol(TP)の定量法は MC CHESNEY¹⁾が確立した比色定量法や KUNIN²⁾が *Sarcina lutea* あるいは *Pasteurella bovisseptica* を検定菌とした生物学的定量法などはその代表的なものといえる。

しかしこれらの定量法も改良の余地は充分残されているし、また Thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) を動物またはヒトに投与したとき加水分解をうけない未変化の TP-G を試料から分離定量する方法については文献的にも知られていない。著者ら³⁾はすでに *Shigella flexneri* 2a を検定菌として TP の bioassay が可能なことを簡単に報告したが、本報では bioassay を中心とした TP の定量法および TP と TP-G の分離定量法につき、ここにとりまとめて報告する。

I. TP の定量法

1. 生物学的定量法

Bioassay を cup 法および disc 法に大別し、その詳細な実験方法につき以下に記述した。

A. Cup 法

1% Phosphate buffer (pH 6.0) を用いて TP 適当量の希釈系列、たとえば 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64…… mcg/ml の各濃度液をつくり検量線用試料液とする。

培地は普通寒天培地(ペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, 食塩 0.25%, 寒天 1.5%, pH 6.5~6.6)を使用し宮村、金沢⁴⁾の報告に準じて薄層 cup 法を採用した。本培地 5 ml (菌液 1% 含む) を直径 9 cm のペトリシャーレに分注、抗生物質検定用の標準 cup を投下する。

菌液は *Shigella flexneri* 2a のスラント上 24 時間培養菌から 1 白金耳量を取り生理食塩水 2 ml に懸濁させ試験菌液とした。本菌液が培地中に 1% となるよう調製する。各希釈濃度の薬液を cup に分注し 4°C に 10 時間拡散を行なったのち 37°C に 16~18 時間培養し、示した阻止円を計測、対数図表上にスポットして検量線画いた。図 1 には本法により作成した TP の検量ならびに同様の条件で実施した Chloramphenicol(CP) の検量線を示した。Cup 法による定量最低感度は約 3 mcg/

ml である。

B. Disc 法

検量線作成用の各希釈濃度の薬液液は cup 法の場合と同じものを使用することができる。

培地は MUELLER-HINTON 培地 (Difco) またはその変法培地 (日水) を使用し cup 法のとおり同じ菌液を 0.5% 含有させ直径 9 cm のペトリシャーレに 3 ml ずつ分注して平板を作成した。

各試料液を直径 7.2 mm, 厚さ 0.95 mm の paper disc (東洋濾紙) にそれぞれ 0.08 ml 含有させたのち 25~27°C の恒温器中で 1 時間放置、水分を除去する。この薬剤含有の paper disc (各薬剤濃度につき 5 枚) を平板上に静置、4°C に 17 時間拡散させたのち 37°C に 18 時間培養し、示した阻止円を計測、5 枚の disc の平均値を対数図表上にスポットし検量線を書く。図 2 には paper disc 法による TP および CP の検量線を示した。Disc 法による最低感度は約 2 mcg/ml である。

図 1 TP および CP の検量線

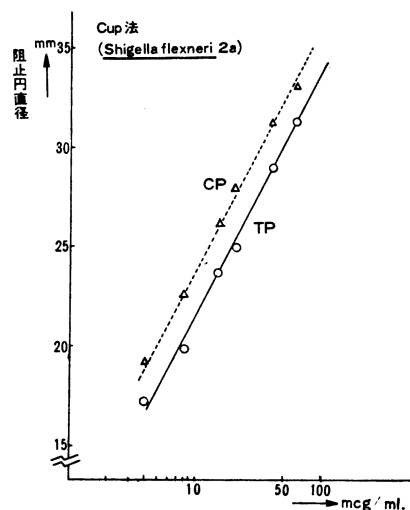
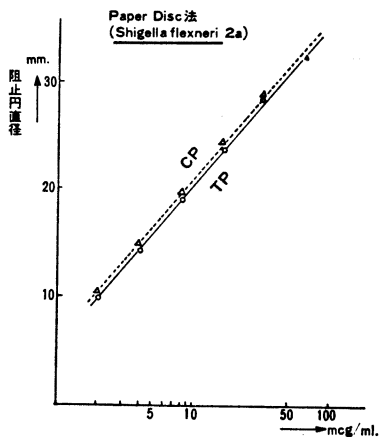


図2 TP およびCPの検量線



なお cup 法, disc 法ともに検定菌としては *Micrococcus flavus* PCI 1216, および *Bacillus subtilis* PCI 219 も使用したが感度の点ならびに生体内濃度の測定には *Shigella flexneri* 2a のほうがすぐれていた。

2. 化学的定量法

MC CHESNEY らりの報告した TP の比色定量法は操作が煩雑で一般的でない。有田ら^{5,7)}はこの点充分な検討を加え化学的定量法として確実なものをきづき上げた。

この比色法を著者らが追試した結果, 検体量を増せば最低約 0.5 mcg/ml まで測定が可能で生物学的定量法に比較すると感度がすぐれ, また TP ならびに TP の glucuronide など代謝産物も含めた, いわゆる total-TP と, TP そのもの, すなわち free-TP とを区別して定量が可能という利点もある。

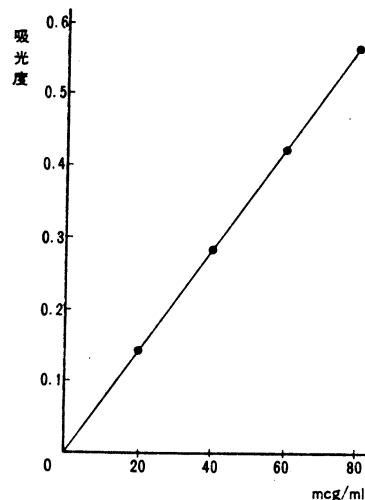
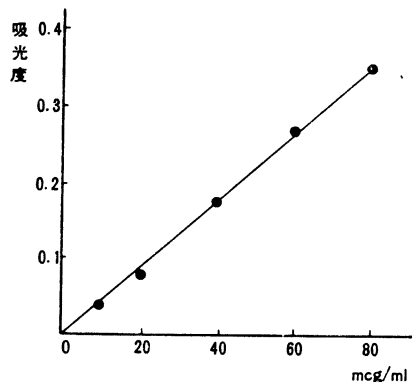
従がつて著者らは生体内濃度を測定するに当つてこの有田ら^{5,7)}の比色法によつて定量を実施した。この方法で作成した total-TP ならびに free-TP の検量線を, それぞれ図3および図4に示した。

II. 生体内における TP と TP-G の分離定量

TP-G を動物またはヒトに注射した場合, 生体内エステラーゼで短時間で容易に加水分解をうけて TP を生ずることは CONCILIO[®] によつてすでに明らかにされたところである。

このほかに代謝された型の TP-glucuronide, TP から脱アシルした amine 型 (TP-NH₂) などが MC CHESNEY らりによつて報告されている。

しかしそのほかに少量の未変化の TP-G の存在も予想されるがこのものの分離定量については報告が見られない。

図3 total-TPの検量線 (415m μ)図4 free-TPの検量線 (415m μ)

著者らは TP-G が生体内で TP, TP-glucuronide, TP-NH₂, ならびにそのまま少量の TP-G の形で存在するという予想のもとに血清中や組織内での TP と TP-G を, 表1に示したような方法に従がつて分離定量を試みた。分離した TP-G はアルカリで分解したのち有田ら^{5,7)}の方法に従がい TP の場合と同じ操作で定量した。

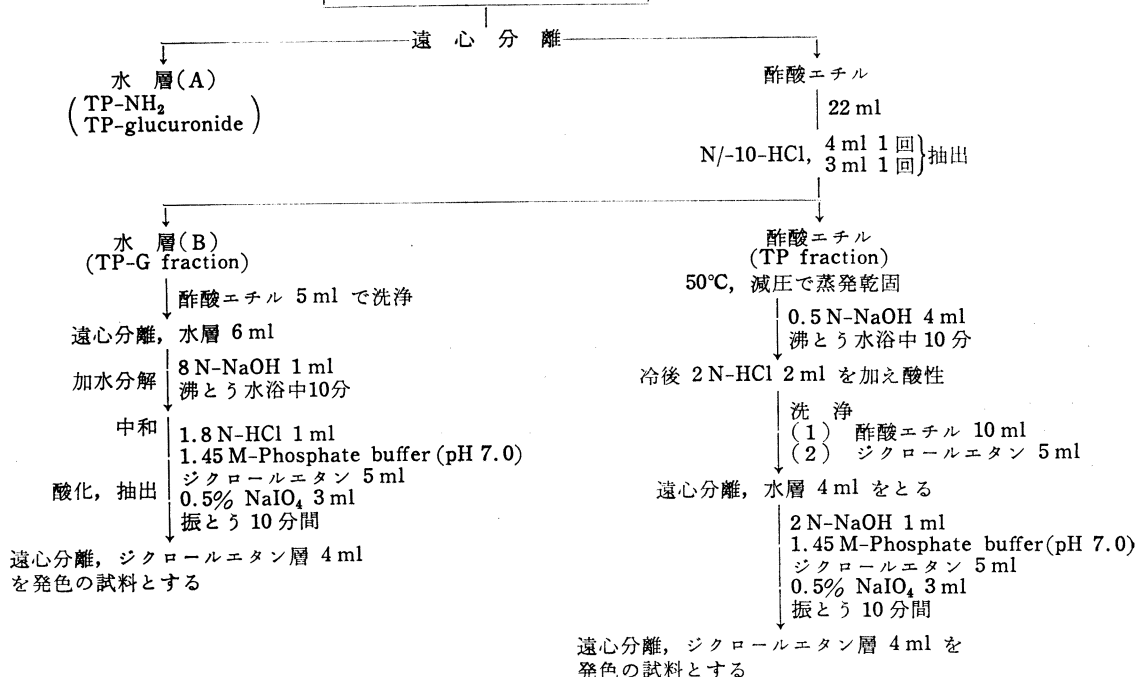
III. 結 語

本報では生物学的方法を中心とした TP の定量法, さらに生体内における TP と TP-G の分離定量法につき報告した。

すなわち, 生物学的定量法は cup 法ならびに disc 法を採用し *Shigella flexneri* 2a を検定菌として実施した結果, 最低感度は cup 法で約 3 mcg/ml, disc 法では約 2 mcg/ml を示した。

表 1 生体内の TP および TP-G の分離定量法

試料 1 ml + 0.2 M-Phosphate buffer(pH 7.0) 3 ml



化学的定量法は有田ら^{5,7)}が報告した比色法に従がい total-TP と free-TP を区別して定量できることを確認した。

また生体内に未変化で存在する少量の TP-G は溶媒に対する溶解度の差を利用して TP と分離し定量することができた。

文 献

- 1) MCCHESNEY, E. W., SHEKOSKY, J. M., ECKERT, H. W. & KOSS, R. F.: Colorimetric determination of dextrosulphenidol and raceophenidol. J. Am. Pharm. Assoc. 49: 28, 1960
- 2) KUNIN, C. M. & FINLAND, M.: Absorption and urinary excretion of chloramphenicol and 2 analogues: Thiocymetin and U-15,442 in normal men. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 103: 246, 1960
- 3) 河部 靖, 金政泰弘, 金沢 保, 山本伸郎, 滝本義一, 宮本淳子, 池田友久, 大熊晴男: 新化学療法剤 Thiophenicol の基礎的検討. Chemotherapy 14: 421, 1966
- 4) 宮村定男, 金沢 裕: Cup 法による Chloramphenicol の検定について. J. Antibiotics, Ser. A 4: 40, 1951
- 5) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 片山幸一: 医薬品の相互作用に関する研究(第4報), チオフェニコールの尿中定量法. 第24回日本薬学会総会, 1967
- 6) CONCILIO, C., LANZA, P. & PRETI, M.: Ricerche chimiche e biologiche sul glicinato di tiofenicolo. Farmaco (Ed. Prat.) 16: 371, 1961
- 7) 有田隆一, 堀了平, 上杉 孝, 片山幸一: Thi-amphenicol の体液中濃度測定法. Chemotherapy: 投稿中

BASIC STUDIES ON THIAMPHENICOL GLYCINATE HYDROCHLORIDE (III)

Quantitative Assays of Thiamphenicol and Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride

TAMOTSU KANAZAWA, KOUICHI KATAYAMA, KIYOSHI KAWABE,

TAKESHI FUJITA and SHINRO YAMAMOTO

Department of Pharmacology, Eisai Research Laboratories

YASUHIRO KANEMASA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

The authors have devised a cup method and a disc method for the bioassay of thiamphenicol (TP) with *Shigella flexneri* 2a as the test microorganism. The minimum sensitivity by the cup method was proven to be 3 mcg/ml, and that of the disc method to be 2 mcg/ml.

Chemical assays were conducted according to the method of ARITA *et al.* which is a modification of the colorimetric method of MCCHESENEY *et al.*, and this quantitative assay makes it possible to carry out the analysis of the total-TP and free-TP. As a result, it has been demonstrated that chemical assay proves to be more sensitive than bioassay.

In addition, it has been found that TP and thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) *in vivo* can be assayed quantitatively.