

チアンフェニコールの体内変化とその胆汁排泄

出 内 秀 人

北海道大学医学部第二内科 (主任: 真下啓明教授)

(昭和 45 年 2 月 13 日受付)

I. 緒 言

TP は 1952 年 CUTLER ら¹⁾により CP 同族体として合成され, CP の $-\text{NO}_2$ 基が $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 基に置換されたものである。TP は CP 同族体の中では抗菌力を有する化合物の 1 つであり, しかも TP 投与時のウサギ血中濃度, ヒト尿中濃度, ラット胆汁中濃度が CP に比し高く且つ持続し, またヒト尿中累積排泄量も圧倒的に多いことから, CP が体内ではほとんど抗菌力を失うのとは異なり TP は体内で抗菌力をあまり失わないと報告されている²⁾。また TP はウサギ肝ホモジェネートによりほとんど不活性化されなかつたとの報告もある³⁾。しかるに, 我々^{4,5)}はモルモットを実験動物とする時に胆汁中に TP の体内変化物が多量に排泄されていることを化学的定量法により認めたので, まずモルモット胆汁中の TP の主な体内変化物を検索し, 続いてウサギも用いて胆汁および尿中の体内変化物の検索を行なつた。薄層クロマトグラフィーについては LACHARME ら⁶⁾の方法を用いた。

II. 実験条件

1. 薄層クロマトグラフィープレートの作製

メルク社の Kieselgel HF₂₅₄ 25 g と蒸留水 72 ml を蓋付きフラスコに入れ混和した後, 薄層クロマトグラフィー用板硝子 (20 cm×20 cm 3 枚および 20 cm×10 cm 1 枚) にアップリケーターを用い厚さ 0.25 mm として均等に展延し 5~12 時間風乾した後, 110°C 1~2 時間活性化した。

2. 検出方法

1) Naphthoresorcinol 試薬によるグルクロン酸抱合体の検出

Naphthoresorcinol 30 mg を 1.5 ml のエタノールに溶かし一方別に濃硫酸 3 g を水 12 g に溶かし, 両者を混和したものを Naphthoresorcinol 試薬とする。この試薬を展開したプレート上に粉霧した後ドライヤーで 5~7 分間熱するとグルクロン酸およびグルクロン酸抱合体が存在する時は青灰色を呈する。

2) Carbonyl 試薬によるアルデヒド体の検出

p-Nitrophenylhydrazine 0.5 g を 100 ml のエタノールに溶かしこれに濃塩酸 0.8 ml, 蒸留水 0.2 ml を加えたものを Carbonyl 試薬とする。この試薬は極めて鋭敏で薄層上に約 30 mcg のアルデヒド体が存在すれば確

認することが出来る。

3) その他, 紫外線ランプ (UV light) による検出法も利用した。

3. 展開溶媒

1) ブタノール展開溶媒

水飽和ノルマルブタノール: 氷酢酸=30:1

2) 酢酸エチル展開溶媒

水飽和酢酸エチル

3) クロロホルム, メタノール, アンモニア展開溶媒

クロロホルム: メタノール, 28%以上アンモニア水=10:4:1 および 9:4:1

ノルマルブタノール, 氷酢酸, 20%以上アンモニア水は試薬特級を使用し, 酢酸エチル, メタノール, クロロホルムは 1 級を蒸留し精製して使用した。

4. 展開条件

試料はプレートの下端から 2 cm の場所に付け展開槽に入れて展開した。展開距離は 15 cm とし展開温度は約 20°C とした。

5. β グルクロニダーゼによる検出

東京臓器化学株式会社製 Lot No. A 004 (10,000 単位/ml) を使用した。また反応に用いた pH 5.0 酢酸緩衝液は 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液と 0.2 M 酢酸を 5.9:14.1 の割合に混じたものを使用した。検出には β グルクロニダーゼによりグルクロン酸抱合体の加水分解を行なつた後で先に記載した試薬により発色させ体内変化物の同定を行なつた。

6. 実験動物

1) モルモット ♂ (450±50) g

2) ウサギ ♂ (2500±500) g

7. 試料採取方法

1) 胆汁採取

動物を常法に従がいベントバルビタールで麻酔し, 腹部に正中切開を加え胆管にビニールカテーテルを挿入しカテーテルを留置した。TP 投与後モルモットでは 24 時間まで, ウサギでは最終静注後 3 時間までの胆汁を採取した。

2) 尿採取

モルモットでは TP 投与後 48 時間までの尿を, ウサギでは最終静注後 3 時間までの尿を膀胱カテーテルを用

Table 1 Materials and methods

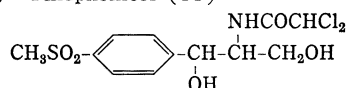
Animals

Guinea pig, male (450±50 g)

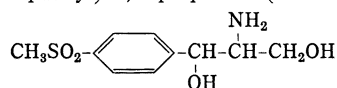
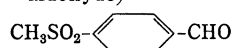
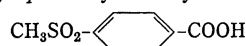
Rabbit, male (2500±500 g)

Standard substances

(a) Thiophenicol (TP)



(b) D-threo-2-amino-1-(4-methylsulfonyl-phenyl)-1,3-propanediol (TP-base)

(c) *p*-Methylsulfonylbenzaldehyde (MSB-aldehyde)(d) *p*-Methylsulfonylbenzoic acid (MSB acid)

いて採取した。

なおこの際の TP 投与は試料を 10 mg/ml の生理食塩水溶液とし、モルモットでは 1 匹当たり 10 ml (TP 100 mg) を経口的に投与した。またウサギでは 20 ml (TP 200 mg) を 2 時間おきに 3 回耳静脈から投与した。

8. 展開のための尿および胆汁試料の調製

胆汁および尿を 45°C 以下の低温で約 1/10 容量になるまで減圧濃縮した。次いで多量のメタノールを加え TP 関連物質をメタノールに十分に溶出させた。析出した塩類は濾過して除いた。ここに得たメタノール濾液を再び低温減圧で濃縮した後、薄層クロマトのプレートに带状に spot した。

9. 対照として使用した TP 関連化合物 (表 1 a~d)

(a) TP

TP 原末を水で再結晶しその 100 mg を 5 ml のメタノールに溶して spot した。

(b) D-Threo-2-amino-1-(4-methylsulfonyl phenyl)-1,3-propanediol (TP-base)

TP 100 mg を試験管に取り *N*-NaOH 2 ml を加え、沸騰水中で 10 分間加熱して加水分解を行ない、冷却後 *N*-HCl 2 ml, pH 7.0 緩衝液 1 ml を加えて対照に使用した。

(c) *p*-Methylsulfonylbenzaldehyde⁷⁾ (MSB-aldehyde)

TP 100 mg を (b) に従がい、TP-base に導き、続いてジクロルエタン 5 ml, 0.5% NaIO₄ 6 ml を加え 20 分間振とうしながら過ヨード酸化を行ない生じる MSB-aldehyde を有機溶媒層に移しその有機溶媒層を取

つて使用した。

(d) *p*-Methylsulfonylbenzoic acid (MSB acid)

TP 100 mg を MSB-aldehyde に導きこれを KMnO₄ で酸化した。過剰の KMnO₄ はエタノールを加え分解せしめた。この濾液に塩酸を加え酸性とする。液性がおおよそ pH 1 になるとこのものは白色の沈澱となり析出する。この沈澱をエタノールで再結晶し、spot のためには水溶液として用いた。

III. 実験方法および実験成績

1. モルモット胆汁中の TP の主体内変化物の検索

TP 100 mg を投与したモルモット胆汁を常法に従がい処理し、対照と共にブタノール展開溶媒で展開した (図 1)。TP 関連物質についてはそのままでは鋭敏に検出し得る適当な発色試薬がないため、次のような工夫を加えた。

図 2(a) に示すように、MSB acid を除く TP 関連物質は加水分解を行なった後、過ヨード酸化を行なうと MSB-aldehyde に導かれる。この場合 TP の 3 の位置の OH 基がグルクロン酸抱合を受けていても同様に反応し MSB-aldehyde となる。この MSB-aldehyde は反応性に富み *p*-nitrophenylhydrazine と鋭敏に反応し

Fig. 1 Chromatogram of Guinea pig Bile and Standard Substances by Butanol Solvent

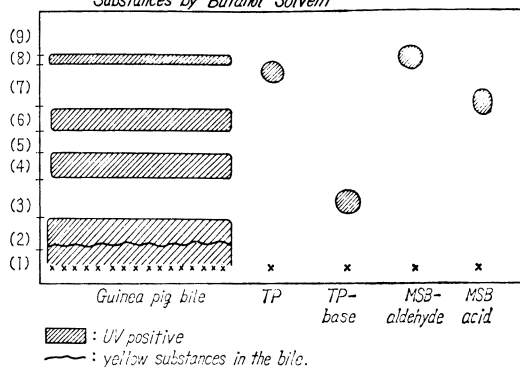
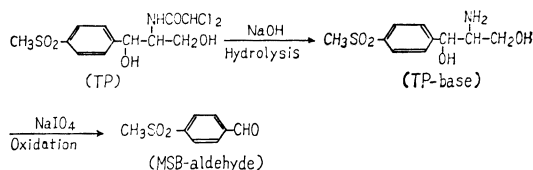
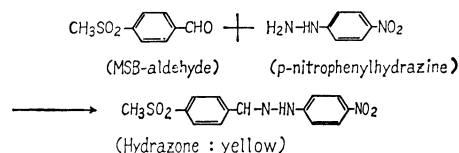


Fig. 2

(a) Synthesis of MSB-aldehyde from TP



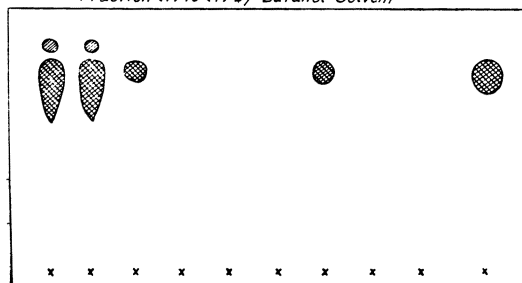
(b) Colour Reaction of MSB-aldehyde



て黄色のヒドラゾンを形成する。図2(b)この反応を薄層クロマトグラフィーに利用した。この加水分解、酸化は薄層上では行なえず試験管で行なわなければならない。このため図1に示すように薄層クロマトプレートのUV light 陽性部分(TP 関連化合物および胆汁成分)を基準として(1)から(9)までの分画に分け、20 cm×20 cm プレート7枚分の各分画を分取した。ついで各々をメタノールに溶かし含有物質を十分にメタノールに溶出した後、濾過しメタノール濾過を低温減圧濃縮した。各残留物に0.5 N NaOH 2 ml を加え沸騰水の中で10分間加水分解した。冷却後0.5 N HCl 2 ml, pH 7.0 緩衝液 3 ml を加え中和しジクロルエタン 5 ml, 0.5% NaIO₄ 3 ml を加え10分間振とうした。ついでジクロルエタン層を低温減圧濃縮しジクロルエタンを少量残した。このように処理した(1)から(9)までの各分画の濃縮ジクロルエタン溶液を対照 MSB-aldehyde と共に薄層クロマトプレートに spot しブタノール展開溶媒にて展開した(図3)。検出にはUV light および Carbonyl 試薬を用いた。図1および図3からTPの主な体内変化物は(1)および(2)に存在し(3)はTP-base (7)はTP未変化体によるものと考えられ、また(4)および(6)のUV陽性物質は胆汁中の常在物質と考えられた。(1)および(2)の部分にTPの主な体内変化物が存在することが明らかとなつたため、さらに(1)および(2)の部分を集めそのメタノール溶出液を低温減圧濃縮した後クロロホルム、メタノール、28%以上アンモニア10:4:1展開溶媒で展開したところ、2つのUV light 陽性部分に分れた。*Rf* はそれぞれ0.33 および0.12であつた。*Rf* 0.12 物質からはMSB-aldehydeが生じたが*Rf* 0.33 物質からはMSB-aldehydeは生ぜず胆汁内常在物質と考えられた。

この*Rf* 0.12 物質を再びブタノール展開溶媒で展開したところ、*Rf* 0.10 に spot が得られた。この物質は薄層上 Naphthoresorcinol 試薬と反応し青灰色を呈し

Fig.3 Chromatogram of Hydrolyzed and Oxidized Fraction (1) to (9) by Butanol Solvent

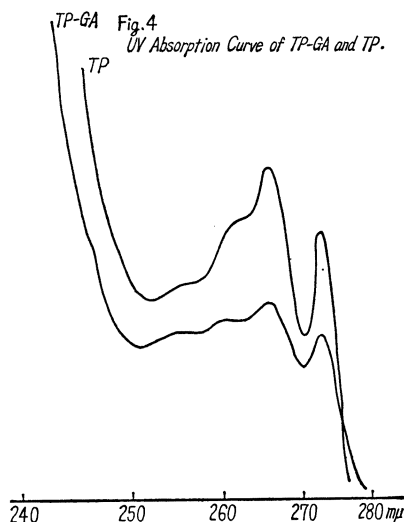


(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) MSB-aldehyde
 ■ : UV Positive and yellow by p-nitrophenylhydrazine reagent.

た。またこの*Rf* 0.10 物質の1部を2つの試験管に取り、一方の試験管にはpH 5.0 酢酸緩衝液 5 ml とβグルクロンダーゼ 2 ml を加え、他方には同じ緩衝液 5 ml と蒸留水 2 ml を加え、両試験管を37°C 10時間振とうした。反応終了後、酢酸エチル 20 ml で2回抽出し抽出された酢酸エチルの低温減圧濃縮液は対照TPと共にそれぞれブタノール展開溶媒で展開した。βグルクロンダーゼを加えないほうにはUV light 陽性部分が生じなかつたが、加えたほうには*Rf* 0.67 で対照TPと一致するUV light 陽性部分が生じた。この*Rf* 0.67 物質を加水分解後、過ヨード酸化を行なつたところMSB-aldehydeが生じた。これから(1)および(2)の分画中のブタノール展開溶媒で*Pf* 0.10を示す物質はTPのグルクロン酸抱合体であると考えられた。

2. TP主体内変化物の単離および紫外線吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトルによる検索

数匹のTP投与モルモット胆汁を常法に従がい処理しブタノール展開溶媒、クロロホルムメタノール、28%以上アンモニア、10:4:1および9:4:1の展開溶媒を用いさきにグルクロン酸抱合体と考えられた物質を精製した。この物質は吸湿性が強く5酸化磷で乾燥したところ、やや褐色をおびた粉末となつた。この物質の紫外線吸収スペクトルは255, 261.5, 265.5, 272.5 mμに吸収極大を示しTPと全く一致する吸収曲線を示したことからTP骨格を有することがわかつた(図4)。また、この物質の赤外線吸収スペクトルは水酸基に由来すると考えられる吸収帯とイオン化したカルボキシル基の吸収を示した。以上から、1) Naphthoresorcinol 試薬陽性、2) βグルクロンダーゼにより特異的にTPを生じた、3) 紫外線吸収スペクトル、4) 赤外線吸収スペクトル、

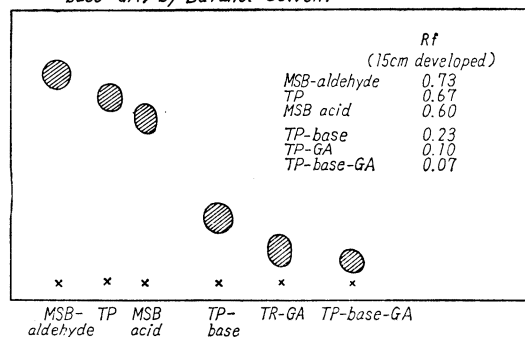


のデータを総合しブタノール展開溶媒で R_f 0.10 を示す物質は TP のグルクロン酸抱合体であることが明らかとなった (なお、上杉⁸⁾は著者の単離法を併用しこの物質を結晶化し元素分析値も TP のグルクロン酸抱合体の分子式と一致したことを報告している)。

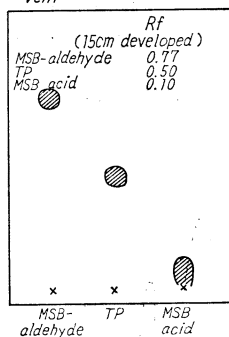
3. TP のグルクロン酸抱合体の脱アシル体の合成

TP のグルクロン酸抱合体 (以下、TP-GA とする) に 0.25 N NaOH を室温で 12 時間作用させて加水分解し TP-GA の脱アシル体を合成した。このものは薄層クロマト上、TP-GA と明らかに R_f が異なるが Naphthoresorcinol 試薬には陽性であった。次に加水分解を行わずに過ヨード酸化を行なつたところ MSB-aldehyde を生じた。従がつてこのものは TP-GA の脱アシル体

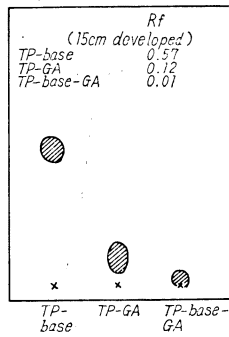
Fig.5 Chromatogram and R_f Values of Four Standard Substances, TP Glucuronide (TP-GA) and TP-base Glucuronide (TP-base-GA) by Butanol Solvent



(a) Chromatogram and R_f Values of MSB-aldehyde, TP and MSB acid by Ethyl Acetate Solvent



(b) Chromatogram and R_f Values of TP-base, TP-GA and TP-base-GA by Chloroform-methanol-ammonia Solvent



(TP-base-GA) であると考えられた。

4. 胆汁中および尿中の体内変化物の対照化合物による同定

図5は先に挙げた4種の対照化合物と TP-GA および TP-base-GA をブタノール展開溶媒で展開したものである。MSB-aldehyde, TP, MSB acid はそれぞれ R_f 0.73, 0.67, 0.60 と接近し TP-base, TP-GA, TP-base-GA はそれぞれ R_f 0.23, 0.10, 0.07 と接近した。上部3物質は酢酸エチル展開溶媒で展開すると図6(a)のとおり R_f 0.77, 0.50, 0.10 と明瞭に分離し、また下部3物質はクロロホルム、メタノール、28% 以上アンモニア、10:4:1の展開溶媒で展開すると図6(b)のとおり R_f 0.57, 0.12, 0.01 と分離した。この原理を利用して TP 投与動物の胆汁および尿に対照と同一の物質が含まれているかを検索するわけである。すなわち、採取試料を常法に従がい処理し試料全部を対照物質と共に薄層クロマトプレート数枚に spot し、これをブタノール展開溶媒で展開した。次いで対照物質の上部3物質と一致する部分を分取しメタノール抽出後に再び上部3物質と共に酢酸エチル展開溶媒で展開し各物質と一致する部分をそれぞれ分取しメタノール溶出した。また下部3物質と一致する部分もメタノール溶出した後、再び下部対照物質と共にクロロホルム、メタノール、28% 以上アンモニア、10:4:1の展開溶媒で展開し各対照物質と一致する部分をそれぞれ分取しメタノール溶出した。つづいて各メタノール溶出液を低温減圧濃縮後、加水分解後に酸化または酸化のみにより MSB-aldehyde を生じるか否かを検した。MSB acid はすでに酸化されており UV light のみで検出した。このようにして、ウサギおよびモルモットの胆汁および尿を検索した結果が表2である。なお、ここに示すプラスの数はそれぞれモルモットおよびウサギの胆汁およびウサギの胆汁および尿ごとに呈色の強さを比較したものである。マイナスは検出されなかつたことを意味する。これから TP 投与モルモットおよびウサギの胆汁および尿には TP 未変化体の他、TP-GA および TP-base が認められた。MSB-aldehyde, MSB acid および TP-base-GA は認められなかつた。

Table 2 TP and TP-metabolites in bile and urine of guinea pig and rabbit

		TP	TP-base	TP-GA	MSB-aldehyde	MSB acid	TP-base-GA
Guinea pig	Bile	+	++	+++	—	—	—
	Urine	++	+	++	—	—	—
Rabbit	Bile	+++	+	+	—	—	—
	Urine	+++	++	+	—	—	—

Table 3 Biliary excretion of TP after intravenous injection of TP(12.5 mg/kg) to guinea pig and rabbit

	Total TP % of dose	Free TP % of dose	Total TP— Free TP % of dose
*Guinea pig (3)	64.92	0.52	64.40
**Rabbit A	0.49	0.46	0.03
B	0.99	0.84	0.15

*: bile in 0~7 hr, **: bile in 0~6 hr

IV. 考察および結論

CP の体内変化については GLAZKO ら⁹⁻¹²⁾のすぐれた研究がある。彼らは CP の $-\text{NO}_2$ 基を還元しジアゾ化カップリングを行ない発色させる方法を用い CP を化学的に定量し、またペーパークロマトグラフィーを用い CP の体内変化物を検索した。彼らの報告によると、ヒト、イヌ、ラットでは CP は生体内で大部分グルクロン酸抱合体となり一部脱アシル化されて CP-base となる。またラットでは $-\text{NO}_2$ 基の還元された CP-base のアリルアミン体の存在が明らかとされたが CP の側鎖が酸化された para aminobenzoic acid の存在は推測はされたが未だ明らかではない。TP の体内変化については、TP の化学的定量法を初めて行なつた。MC CHESNEY らは¹³⁾ラットの腸管に排泄される TP を定量し Free 体と Total TP に差があることを見出しその差は TP のグルクロン酸抱合体が TP の脱アシル体であろうと推測している。ヒトおよびイヌでは TP は体内に入っても生物活性がほとんど落ちないため TP はほとんど体内変化を受けないであろうと考えられていた。しかし我々は⁵⁾先に化学的定量法を用い TP で投与モルモットおよびウサギの体液中濃度の測定を行ない、表3に示すような結果を得、さらに著者のこの実験からモルモットでは、TP は容易にグルクロン酸抱合体となり、また CP と同様に脱アシル体も存在することを明らかにした。ウサギでも体内変化を受ける割合は少ないがモルモットと全く同じ体内変化物が認められた。しかし、TP、TP-base、TP-GA の比率もウサギとモルモットでは異なっており、これはまず第1にウサギおよびモルモットでは TP の体内変化を受ける比率が異なるということ、第2に生じた体内変化物が肝臓および腎臓からそれぞれのクリアランスに従がつて排泄されることを示唆する。また WILLIAMS らは各種薬物の脂溶性と胆汁排泄の関係について報告しているが未だ明らかな結論に達していない。ここに著者の実験結果は種差によつてその代謝に大きな差のあることを明らかにしたもので1種類の動物のみではその体内における動態を結論づけるのは危険であることを示す一

方、薬物の体内変化の機構およびその排泄機構を研究する上にも役立つものと考えられる。

稿を終るに当り、本研究を終始御指導下さいました北大医学部第二内科教室 真下啓明教授、北大薬学部薬剤学教室 有田隆一教授および各教室の先生方に深謝します。

参 考 文 献

- 1) CUTLER, R. A., STENGER, R. J. & SUTER, C. M.: New antibacterial agents, 2-acylamino-1-(4-hydrocarbonylsulfonylphenyl)-1, 3-propanediols and related compounds. J. Amer. Chem. Soc. 74, 5475~5481(1952)
- 2) 河部 靖, 山本伸郎, 金沢 保, 滝本義一, 宮本淳子, 池田友久, 金政泰弘, 大熊晴男: 新化学療法剤 Thiophenicol の基礎的検討。Chemotherapy 14, 421~426(1966)
- 3) 清水喜八郎, 島田 馨, 陣立恒夫, 奥村有史: Thiophenicol の基礎的臨床的研究。Chemotherapy 14, 399~403(1966)
- 4) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 片山幸一: チオフェニコールの化学的定量法。第15回日本化学療法学会総会(1967年)発表(投稿中)
- 5) 有田隆一, 堀 了平, 上杉 孝, 小野寺善明, 出内秀人: 医薬品の体内変化と排泄の動態(第3報)クロランフェニコール, チオフェニコールの胆汁及び尿中への排泄について。日本薬学会第88年会(1968年)発表(投稿中)
- 6) LACHARME, M. M. J. & NETIEN, G.: Séparation par chromatographie en couche mince du chloramphénicol et de certains dérivés nitres. Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon 8, 122~128(1963)
- 7) MC CHESNEY, E. W., SHEKOSKY, J. M., ECKERT, H. W. & KOSS, R. F.: Colorimetric determination of dextrosulphenidol and racephenidol. J. Amer. Pharm. Ass. 49, 28~32(1960)
- 8) 上杉 孝, 堀 了平, 有田隆一: 医薬品の体内変化と排泄の動態(第6報), Chloramphenicol, Thiophenicol の種々動物における胆汁中体内変化と胆汁排泄の動態。第39回日本薬学会北海道支部2月例会(1969年)発表(投稿中)
- 9) GLAZKO, A. J., WOLF, L. M. & DILL, W. A.: Biochemical studies on chloramphenicol. I. Colorimetric methods for the determination of chloramphenicol and related nitro compound. Arch. Biochem. 23, 411~418(1949)
- 10) GLAZKO, A. J., WOLF, L. M., DILL, W. A. & BRATTON, A. C. Jr.: Biochemical studies on chloramphenicol. II. Tissue distribution and excretion studies. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96, 445~459(1949)
- 11) GLAZKO, A. J., DILL, W. A. & REBSTOCK, M. C.: Biochemical studies on chloramphenicol. III. Isolation and identification of metabolic products in urine. J. Biol. Chem. 183, 679~691(1950)

- 12) GLAZKO, A. J., DILL, W. A. & WOLF, L. M. : Observation on the metabolic disposition of chloramphenicol (Chloromycetin) in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 104, 452~458(1952)
- 13) MC CHESNEY, E. W., KOSS, R. F., SHEKOSKY, J. M. & DEITZ, W. H. : Sulphenidol in several animal species. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 49, 763~766(1960)
- 14) ABOU-EL-MAKAREM, M. M., MILLBURN, P., SMITH, R. L. & WILLIAMS, R. T. : Biliary excretion of foreign compounds species differences in biliary excretion. *Biochem. J.* 105, 1289~1293(1967)
- 15) MILLBURN, P., SMITH, R. L. & WILLIAMS, R. T. : Biliary excretion of foreign compounds biphenyl, stilboestrol and phenolphthalein in the rat: molecular weight, polarity and metabolism as factors in biliary excretion. *Biochem. J.* 105, 1275~1281(1967)

METABOLISM OF THIAMPHENICOL AND ITS BILIARY EXCRETION

HIDETO IDEUCHI

The Second Department of Internal Medicine, School of medicine, Hokkaido University

(Director : Prof. KEIMEI MASHIMO)

Up to this time it was said that thiamphenicol, one of relatives of chloramphenicol, hereafter TP, was almost not metabolized in comparison with chloramphenicol. But it was found by means of chemical assay that its metabolites were relatively more excreted in the guinea pig bile. Accordingly, after TP were administered to guinea pig and rabbit, their bile and urine were examined by thin layer chromatography, β glucuronidase and synthesized derivatives of TP, its probable metabolites. As the result, its glucuronide and deacylated TP were found as its metabolites.