ラジオアイソトープ (R. I) 標識抗生物質の体内分布に関する研究

第1編：液体シンチレーションカウンターによる R. I 標識抗生物質の生体試料の測定法

伊 藤 弘

Study on distribution of radioisotope-labelled antibiotics in the body.

I. Determination of radioisotope-labelled antibiotics in biological samples by means of the liquid scintillation counter.

Hiromu Ito

I. 緒 言

抗生物質の定量法には、生物学的定量法（重層法¹⁾、薄層カップ法²⁾、帯培養法³⁾、拡散法⁴⁾）、化学定量法（直接呈色法⁵⁾、ジアゾ連結定量法⁶⁾）、放射線同位元素標識抗生物質による体内分布測定法などがある^{7), 8), 9)}。

一般に応用範囲の広さ、直接抗菌力と結びついている理由から、主に生物学的測定法による血液、組織内濃度に関する基礎的、臨床的測定が盛んにおこなわれてきた。しかし生物学的測定法にも種々なる問題がある。それは使用する検定菌の種類により、測定値に大きな変動があるほか、生体における代謝や不活性化の問題も当然考えられる¹⁰⁾ので、その測定値に誤差が生じること、また動物実験において、人体の投与量よりも比較的大量に投与しなければならない、換言すれば末端組織内の微量測定ができないといった欠点も見られる。化学定量法においては、測定できる抗生物質の種類に限界がある。

近年、放射線同位元素の開発、発展により薬物の代謝、生体内変換、吸収、排泄、分布における実験的研究にも、放射線同位元素は広く応用され、動物実験においても、臨床薬用量またはそれ以下の量を投与した時の組織内濃度の微量測定も可能になり mcg 以下のレベルで追跡できるようになった。また、測定値に対する信頼度が高いこと、実験操作が容易であることなどもあって、放射線

同位元素標識抗生物質を使用しての体内分布に関する実験的研究も次第に多くなってきた^{7), 8), 9), 10), 11), 12)}。

標識抗生物質の体内分布の検定には、Macro Autoradiography による定性的分布を知る場合と、Gas-flow counter や Liquid Scintillation counter (液体シンチレーションカウンター) による定量的分布を知る場合がある。

著者は、臨床的に頻用されている抗生物質にラジオアイソトープ (³H, ¹⁴C) で標識し、その体内分布に関する実験において、Solubilization Method¹³⁾⁻¹⁶⁾ を使用しての液体シンチレーションカウンター測定法が適するか否かを検討し、いささかの知見を得たので報告する。

II. Solubilization Method による液体シンチレーションカウンター測定法に対する検討

薬物による生体内の吸収、排泄、分布などの代謝領域にも低エネルギーの β 線である ³H, ¹⁴C は盛んに利用されているが、測定法の面で種々な困難がある。このような β 線の測定には、液体シンチレーションカウンター測定装置が適しているが、測定のための生体試料（組織、血液、尿、排泄物等）の処理法が繁雑で複雑をきわめている。

著者は、1) すべての組織にも適用できる。2) 試料調整が簡単で迅速である。3) 水溶液の測定に適していることなどを考慮に入れ、溶解補助剤であるシンチラミン OH (1M メタノール溶液) による Solubilization Method を使用して試料の処理、quenching 現象の減少、測定効率のよい正確な測定などにつき検討を行った。

愛知学院大学歯学部第2口腔外科学教室(主任:河合幹教授)
Second Department of Oro-Maxillo-Facial Surgery, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University
(Chief: Prof. Tsuyoshi Kawai)
受付 昭和48年10月29日

1. シンチレーター添加量に対する測定効率の影響

a) 実験試薬

R.I 標識抗生物質： ^3H -Lincomycin, ^{14}C -Benzyl penicillin

溶解補助剤：シンチラミン OH (1M メタノール溶液、和光純薬)

シンチレーター：Toluen シンチレーター (特級 Toluen 1000 ml, 米山製薬, ppo 4g, popop 100 mg, 和光純薬)

標準液： ^3H -Toluen 標準液 (NENC 製), ^{14}C -Toluen 標準液 (NENC 製)

b) 測定装置：Beckman 液体シンチレーションカウンター LS 100 型,

c) 実験方法

液体シンチレーション測定用バイアル (20 ml 容器) に各々 1 ml, 2 ml のシンチラミン OH 溶液を入れ、次に ^3H -Lincomycin 水溶液 0.5 ml (0.00375 mci) を加え、さらに Toluen シンチレーター、1 ml から 12 ml までの各段階量を添加し、よく攪拌混和し、シンチレーター添加量に対する測定効率を測定した。同様な方法で、 ^{14}C -Benzyl penicillin 水溶液 0.5 ml (0.00188 mci) のシンチレーター添加量に対する測定効率を測定した。測定効率の測定には、おのおのの検液に ^3H -Toluen 標準液 (NENC 製), ^{14}C -Toluen 標準液 (NENC 製) を添加して内部標準法で測定した。

Fig. 1 Effect of increasing the volume of scintillator on the counting efficiency for a ^3H -Lincomycin in aqueous solution blended with scintillamin OH methanol

d) 実験成績

Fig. 1, Fig. 2 に示すごとく, background が 100cpm (Counter per minute) 以下で, 測定効率の高いのは,

Fig. 2 Effect of increasing the volume of scintillator on the counting efficiency for a ^{14}C -Benzylpenicillin in aqueous solution blended with scintillamin OH methanol

1 ml のシンチラミン OH 溶液と 7 ml の Toluen シンチレーター添加量であった。 ^3H -Lincomycin 0.5 ml で 37.5% の最高効率, ^{14}C -Benzyl penicillin 0.5 ml の 66% 最高効率を得た。次に、シンチラミン OH 溶液を 2 ml に増加すると、測定効率の減少は、 ^3H で約 12%, ^{14}C で約 5% であった。Toluen シンチレーター添加量が 7 ml 以上でも測定効率はそれほど減少しない。

2. R.I 標識抗生物質溶液量に対する測定効率の影響

a) 実験試薬：II-1 の実験と同じものを使用

b) 測定装置：II-1 の実験と同じものを使用

c) 実験方法

^3H -Lincomycin 水溶液量を 0.5 ml, 1 ml の 2 種類を

Fig. 3 Effect of scintillamin OH methanol and Sample volume on the counting efficiency for ^3H -Lincomycin

検液として、おのおのを測定用バイアルに入れ、Toluen シンチレーター 7 ml 添加し、よく攪拌し、シンチラミン OH 溶液の添加量を 0.5 ml から 4.5 ml までに種々な混和溶解した場合の測定効率を測定した。同様に ^{14}C -Benzyl penicillin 水溶液量を 0.5 ml, 1 ml の 2 種類の測定効率を測定した。

d) 実験成績

Fig. 4 Effect of scintillamin OH methanol and Sample volume on the counting efficiency for a ^{14}C -Benzyl penicillin

Fig. 3, Fig. 4 に示すごとく, ^3H -Lincomycin 0.5 ml 水溶液はシンチラミン OH 1 ml で 37.5% の最高効率を示し, ^3H -Lincomycin 1 ml 水溶液では, シンチラミン OH 2 ml で 28% の最高効率を得た。 ^{14}C -Benzyl penicillin 0.5 ml 水溶液はシンチラミン OH 溶液 1 ml で 65% の最高効率を示し, ^{14}C -Benzyl penicillin 1 ml 水溶液では, シンチラミン OH 溶液 2.5 ml で 45% の最高効率を得た。

3. 添加組織重量に対する測定効率の影響及び Toluen 系における至適重量の決定

a) 実験試薬: II-1 の実験と同じものを使用。

b) 測定装置: II-1 の実験と同じものを使用。

c) 実験方法

dd 系雄マウス (生後 25 g 前後) の各組織 (脳, 舌, 顎骨, 心, 肺, 腎, 脾, 肝, 大腿骨) を摘出し, それぞれの組織を化学天秤で 50 mg, 100 mg, 200 mg を確実に秤量し, 血液については, 凝固反応を起こす前に速やかに採血したものより, 0.2 ml, 0.4 ml, 1 ml を秤量し, 各組織, 血液を共栓試験管 (5 ml 容器) に入れ, おおのにシンチラミン OH 溶液 1 ml を添加し, 55°C で 24 時間, 恒温槽で浸漬しつつ加熱溶解し, その溶解液に ^3H -Lincomycin 0.5 ml (0.00375 mci) を添加し, よく

攪拌後, 測定用バイアルに移し, Toluen シンチレーター 7 ml を加え効率を測定した。効率の測定は, 内部標準法にて施行した。同様な方法で ^{14}C -Benzyl penicillin の効率を測定した。さらに測定した試料重量における効率を乗じたものを Merit 値として算定し, Merit 値が最高になる点を Toluen 系における至適重量とした (Table 1, 2)。

d) 実験成績

Table 1, 2 に示すごとく, 各組織 50 mg, 血液 0.2 ml で測定効率よく, 各組織, 血液の重量が増加するにつれて測定効率は減少する。Toluen 系の至適重量は, 各組織においては 100 mg 秤量, および血液においては 0.4 ml であった。

以上の予備実験により, R.I 標識抗生物質の体内分布に関する実際の実験において, 次のような方法を採用した。体重 25 g 前後の dd 系雄マウス 3 匹を 1 群として, マウス腹腔内に R.I 標識抗生物質をマウス g 重量あたり 10 mcg の割合で注射し, 注射後 5 分, 10 分, 15 分, 20 分, 30 分, 60 分, 120 分後に頸部を切断して, 屠殺し, 各臓器 (脳, 舌, 顎骨, 心, 肺, 肝脾, 腎, 大腿骨) を摘出し, 化学天秤にて 100 mg を確実に秤量し, 組織に付着した血液を精製水にて十分に水洗し, 血液については, 凝固反応を起こす前に 0.4 ml 採血し, 各組織, 血液をシンチラミン OH 溶液 1 ml を加えた共栓試験管 (5 ml 容器) 内に入れ, 恒温槽にて, 55°C , 24 時間浸漬しつつ加熱し, 組織, 血液を溶解後, 30% H_2O_2 を 1 滴ずつ加え, 脱色し, その溶解液を液体シンチレーターカウンターバイアルに移し, Toluen シンチレーター溶液 7 ml を加え, 2 時間暗箱中に静置し, Beckman 製液体シンチレーションカウンターにて c. p. m. (Counter per minute) を測定した。同様な方法で, 無投与マウスの各臓器 100 mg および血液 0.4 ml を摘出し, おおのに 0.5 ml の R.I 標識抗生物質水溶液を添加し, c. p. m. を測定した。

各組織内濃度および血液内濃度の算定は次の式によっておこなうことができる。

算定方法:

既知 R.I 標識抗生物質量

$$\times \frac{\text{摘出臓器 (血液) g 重量当たりの c. p. m.}}{\text{添加検体の g 重量当りの c. p. m.}}$$

III. 総括および考按

化学療法剤の臓器, 組織内への移行と分布に関する基礎的研究は, 主に生物学的定量法を使用し, 報告が多い^{17)~21)}。しかし近年になって, 放射線同位元素の発展,

Table 1 Optimum weight (or volume) efficiency and merit values for tissues containing ³H-Lincomycin

Tissue	Solvent System	Sample state	Optimum wt. or vol., mg. ml.	Counting efficiency %	Merit
Brain	Sc. a)	Sol. b)	50	30	1500
			100	26	2600
			200	13	2600
Tongue	Sc.	Sol.	50	26	1300
			100	21	2100
			200	10	2000
Mandibula	Sc.	Sol.	50	28	1400
			100	22	2200
			200	9	1800
Heart	Sc.	Sol.	50	28	1400
			100	27	2700
			200	13	2600
Lung	Sc.	Sol.	50	26	1300
			100	25	2500
			200	9	1800
Kidney	Sc.	Sol.	50	33	1650
			100	27	2700
			200	13	2600
Spleen	Sc.	Sol.	50	32	1600
			100	28	2800
			200	13	2600
Liver	Sc.	Sol.	50	24	1200
			100	21	2100
			200	10	2000
Femur	Sc.	Sol.	50	26	1300
			100	21	2100
			200	10	2000
Blood	Sc.	Sol.	0.2	20	4
			0.4	17	6.8
			1.0	4	4

a) Sc, Scintillamin toluen system
b) Sol, Solubilization

Table 2 Optimum weight (or volume) efficiency and merit values for tissues containing ¹⁴C-Benzyl penicillin

Tissue	Solvent system	Sample state	Optimum wt. or vol., mg. ml.	Counting efficiency %	Merit
Brain	Sc. a)	Sol. b)	50	52	2600
			100	46	4600
			200	22	4400
Tongue	Sc.	Sol.	50	58	2900
			100	55	5500
			200	24	4800
Mandibula	Sc.	Sol.	50	55	2750
			100	48	4800
			200	24	4800
Heart	Sc.	Sol.	50	50	2500
			100	48	4800
			200	22	4400
Lung	Sc.	Sol.	50	48	2400
			100	40	4000
			200	18	3600
Kidney	Sc.	Sol.	50	50	2500
			100	44	4400
			200	20	4000
Spleen	Sc.	Sol.	50	58	2900
			100	54	5400
			200	24	4800
Liver	Sc.	Sol.	50	46	2300
			100	42	4200
			200	17	3400
Femur	Sc.	Sol.	50	54	2700
			100	49	4900
			200	23	4600
Blood	Sc.	Sol.	0.2	40	8
			0.4	21	8.4
			1.0	6	6

a) Sc, Scintillamin toluen system
b) Sol, Solubilization

開発により薬物代謝研究領域でも、いわゆる低エネルギーの ^{14}C 、 ^3H を標識した薬物が広く応用され、液体シンチレーションカウンターの普及に伴って、これらの測定装置を利用した標識抗生物質の臓器、組織内分布の研究も報告されるようになった。

一般に、標識抗生物質を動物に投与した際の生体内放射活性分布の測定には、液体シンチレーションカウンターが適しているが、測定のための生体試料(組織、血液、尿、排泄物等)の処理法は繁雑をきわめている。それは、生体試料の処理法において、試薬の化学形に起因する quenching 現象などの弱点があり、特に動物を扱う実験的研究において、組織中における ^{14}C 、 ^3H などを測定する際の著しい障害とされている。そこで測定にあたって、できるだけ quenching 現象の少ない処理法を利用しなければならない。

生体試料の処理法は、測定試料を均一相で測定する場合には、1) Combustion counting^{22)~25)}、2) Solubilization Method^{13)~16)26)27)}、3) Extraction Method¹³⁾があり、不均一相で測定する場合には、4) Suspension counting²⁸⁾²⁹⁾、5) Paper Strip counting³⁰⁾、6) Continuous Flow Measurement³¹⁾らの種々な処理法が報告されているが、草間¹⁴⁾は、Combustion counting は操作が繁雑で試料が多いときは不便であると述べ、さらに Suspension Method は ^3H の場合において自己吸収の問題があり、正確な測定は困難で着色試料による quenching が強いので測定効率の低下があると述べている。上田ら¹³⁾は、Extraction Method は、組織などの処理には用いられるが、血液の場合は color quenching が強く、測定は困難であると報告している。Paper Strip counting は、 ^3H のような試料の処理法には適せず、定量的な値が得がたい欠点がある。Continuous Flow Measurement は、測定効率は ^{14}C で50%以下、 ^3H で7%以下と悪い¹⁴⁾ため、低放射能の試料に適しない。Solubilization Method は、Herberg³²⁾、Hall³³⁾、Brown³⁴⁾、草間¹⁶⁾、東村ら³⁵⁾、上田ら¹³⁾によれば、比較的操作が容易で、すべての組織に適用でき、水溶性性物質の測定に適し、測定効率も割合と高いと報告している。

Solubilization Method による液体シンチレーション測定には、生体試料をシンチレーターに溶解することが前提となるが、組織はそのままの形で、シンチレーターに難溶であり、各種の溶解補助剤には、KOH-methanol、Hyamine OH、KOH-ethanol、Triton×100、NaOH、NcS 等があるが、Herberg³²⁾は、Hyamine 10 X-OH の改良型であるシンチラミン OH 溶液は、シンチレーター

中に対する溶解度もよく、quenching 現象も少ないなどの利点があると報告している。

一般に、化学的 quencher であると言われているシンチラミン OH 溶液、標識抗生物質水溶液、Toluen シンチレーターは、測定効率を低下させるので実験にあたって必要な範囲で最低量に止めるべきである³⁶⁾と考えられている。

著者は、 ^3H -Lincomycin、 ^{14}C -Benzyl penicillin の2種の標識抗生物質を予備実験試薬として、シンチラミン OH 溶液量、Toluen シンチレーター溶液量、標識抗生物質水溶液量における測定効率を検討した。実験成績が示すごとく、化学的 quenching 現象を少なくし、かつ正確に測定するためには、動物に投与する ^3H -Lincomycin 水溶液量および ^{14}C -Benzyl penicillin 水溶液量は0.5mlで、組織溶解補助剤であるシンチラミン OH 溶液量は1ml、測定用 Toluen シンチレーターは7mlであり、この処理法を使用して ^3H -Lincomycin の測定効率は37.5%、 ^{14}C -Benzyl penicillin の測定効率は65%と、他の溶解補助剤³⁷⁾と比較して、割合と高い測定効率を得た。

次に、添加生体試料は測定効率を低下させる着色クエンチャーとして影響するので添加組織量を検討したところ、組織50mg、血液0.2mlにおいて測定効率は最高であったが、Toluen 系における至適処理重量は Merit 値が最高となる組織100mg、血液0.4mlであった。しかも、組織100mg、血液0.4mlの添加組織量の場合でも測定効率の低下はわずかであった。

以上の理由により、著者はシンチラミン OH 使用による Solubilization Method が、液体シンチレーション測定法に適した方法であると考えたので、その結果について報告した。

IV. 結 論

- 1) 液体シンチレーションカウンター測定装置使用による標識抗生物質の体内分布に関する実験には、シンチラミン OH 溶液の Solubilization Method が使用できる。
- 2) Solubilization Method による液体シンチレーションカウンター測定には、組織100mg、(血液の場合は0.4ml)をシンチラミン OH 1ml を使用して55°C、24時間恒温槽にて加熱溶解し、その溶解液を30%過酸化水素にて脱色し、Toluen 系シンチレーター7mlにて測定できる。

尚本論文の要旨は、昭和46年11月、第14回、日本口腔科学会中部地方会、昭和47年4月、第26回日本口腔科学会総会において発表した。

稿を終るにあたり御指導、御校閲頂いた河合幹教授に深謝致

します。また種々御指導御助言頂いた生化学教室、永律俊治教授、口腔衛生学教室桑原幸夫助教授ならびに本研究に御協力下さった服部孝範助教授ならびに教室員各位に深謝致します。

参 考 文 献

- 鳥居敏雄, 他: 重層法(1次拡散法)によるペニシリン定量法に就いて. *Journal of Penicillin* 1: 281 1947.
- 宮村定男, 他: 薄層カップ法による体液中ペニシリン及びストレプトマイシン濃度測定法. *J Antibiotics* 3: 411 1950.
- 古川牧一: 抗生物質の定量, 体内分布並びに腎排出に関する研究, 特に研究方法の新考案, 第1編, 抗生物質の1新生物学的微量簡易定量法「帯培養法」の研究. *通進医学* 8: 703 1956.
- Heatley, N.G.: A method for the assay of penicillin. *Biochem J* 38: 61 1944.
- Boniger, Berichte der Deut. Chem. Gesellschaft. 27: 25 1938. (真下哲明: 日新医学 36: 401 1949 より引用)
- 土屋文雄, 他: Sulfonmid 化合物の吸収, 排泄並びに体内分布について. *泌尿誌* 46: 452 1939.
- 栗秋 要, 他: Josamycin の研究VI, Josamycin の吸収および体内分布に関する研究. *J Antibiotics* 22: 226 1969.
- Sullivan, H.R., et al.: Metabolism of cephalixin- ^{14}C in mice and in rats. *J Antibiotics*. 20: 195 1969.
- Sullivan, H.R., et al.: Metabolism of D-cephaloglycin- ^{14}C and L-cephloglycin- ^{14}C in the rat. *J Antibiotics*. 22: 27 1969.
- 清水喜八郎, 他: 化学療法剤の体液濃度の意義. *最新医学* 24: 1826 1969.
- Ulberg, S., et al.: *Am J Vet Res.* 19: 84 135 1958. (化学の領域 増刊 95 号 isotope による薬物代謝実験. 南江堂, 東京. 1971. p 136. より引用)
- Funke, H.: *Acta Vet Scand Suppl.* 2: 1 1961. (化学の領域 増刊 95 号 isotope による薬物代謝実験. 南江堂, 東京. 1971. p 136. より引用)
- 上田英雄, 他: 液体シンチレーション計測における医学処理法について. *最新医学* 21: 2513 1966.
- 草間慶一: 液体シンチレーションカウンターの生体物質の測定について. *生物物理* 7: 31 1967.
- 草間慶一: 液体シンチレーションカウンターの生体物質の水溶液の新測定法. *Radio isotopes* 14: 145 1965.
- Brown, W.O. et al.: Liquid scintillation counting of C^{14} -labelled animal tissues at high efficiency. *Biochem. J* 78: 571 1961.
- 大久保況, 他: 諸種抗生物質の体内分布に関する研究. *日内会誌* 43: 518 1954.
- 買手哲美: 各種抗生剤の組織内および病巣内分布に関する研究. *Chemot erapy* 11: 4 257 1963.
- 中山脩郎: 抗生剤の臓器内濃度に関する研究. *慈医誌* 72: 801 1957.
- 藤本安男: 諸種生物質の臓器内分布と胆汁内排泄態度に関する研究, 第1編, 諸種抗生物質の臓器内分布に関する研究. *J Antibiotics* 9: 272 1956.
- 鳥居敏雄: 化学療法と内科臨床 1. 抗生剤の吸収, 排泄, 体内分布に関する研究. *日内会誌* 49: 908 1960.
- Kelly, R.G. et al.: Determination of ^{14}C and ^3H in biological samples by schoniger combustion and liquid scintillation techniques. *Analy Biochem* 2: 267 1961.
- 樫田義彦, 他: 液体シンチレーションスペクトロメーターによる ^{14}C , ^3H の測定 (VI) 酸素フラスコ燃焼法による植物組織中の ^{14}C の測定. *Radioisotopes* 14: 331 1965.
- 馬場茂雄, 他: 液体シンチレーション計数装置による生体試料中の ^3H の測定法. *薬学雑誌* 87: 830 1967.
- Gupta, G.N.: A simple in vial combustion method for assay of hydrogen-3, carbon-14, and sulfur-35 in biological, and organic materials. *Anal Chem* 38: 1356 1966.
- 滝口 久: 液体シンチレーションカウンター用のカテールの処方とその使い方. *歯界展望*: 39: 773 1972.
- 樫田義彦, 他: 液体シンチレーション測定法の最近の進歩, 新しい試料調整法. *Radioisotopes* 19: 41 1970.
- Hayes, F.H., et al.: Counting suspension in liquid scintillation. *Nucleonics*. No. 3. 48, 1956.
- Rapkin, E.: Suspension counting. *Pachard Technical Bulletin* No. 5. 1963.
- Roucaurol, J., et al.: Liquid scintillation counting of paper chromatography. *Biochem Biophys Res comm* 1: 203 1959.
- Rapkin, E.: Continuous flow measurement. *Pachard Technical Bulletin* No. 11. 1963.
- Herberg, R.T.: Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissues. *Analytical chemistry*. 32: 42 1960.
- Hall, T.C.: High-efficiency liquid scintillation counting of ^{14}C -labelled material in aqueous solution and determination of specific activity of labelled proteins. *Biochem J* 96: 626 1965.
- Brown, W.O.: Liquid Scintillation Counting of ^{14}C -labelled animal tissue at high efficiency. *Biochem J* 78: 571 1961.
- 東村武信, 他: 放射性同位元素取り扱い(液体シンチレーションカウンターについて) 4. 測定試料の調製法, 続生物物理学講座 3. 吉岡書店, 京都, 1968. p 264.
- 樫田義彦, 他: Liquid scintillation counting の最近の進歩. *Radioisotopes* 14: 152 1965.
- 樫田義彦: 放射線の測定 (II), 低エネルギーベーター線の測定, 液体シンチレーションによる測定法 (I). *Radioisotopes* 16: 85 1967.