ニトロフラン化合物の生物学的研究

第2報 ニトロフラン化合物の生体内濃度測定法

Biological Studies on Nitrofurans Compounds
II. Turbidimetric Determination of Nitrofurans Compounds in Body Fluids服 部 哲 也*
Tetsuya HATTORI

生体内の薬剤濃度を測定するには、用いる定量法が微量定量可能な感度の高い方法であると共に、再現性言いかえれば回収率が高く正確な結果が得られるよう充分検討された方法であることが必要である。即ち試料となる血液、尿、或は臓器などに存在する生体内成分が測定の際の阻害作用を有することは当然予想される所であるからこれを正確に評価し、この除去又は修正の方法を講じなければならない。又、試料から測定用検液を調製する際、再現性を高めるための処理も必要である。

前報に述べたニトロフラン化合物の一比濁定量法を生体内濃度測定に応用するに際し、上記のことについて家兎を用いて検討したので以下に報告する。

実験方法および材料

被検薬剤としては NF-3 (Furazolidone) を用い、実験動物としては 2~3kg の正常家兎を使用した。薬剤の溶解法および比濁法の操作は前報の通りである。

血清の影響：家兎の耳静脈より採血した血液を常法通り 37°C に1時間放置後、5°C に1夜おきその上澄液を100% 血清として用いた。この血清を培地に1%、10% 添加した場合の感性曲線（之が比濁法の標準曲線に使用し得ることは既に判つているので以下之を標準曲線と称する）を求めて血清の影響を検した。次に家兎血清の個体差を調べるため多数の家兎についてその血清を調製し、これを培地に10% 添加した場合の0~0.1mcg/ml 間の発育度差を求めた。又、常法通り血清を非働化した場合の血清の影響についても検討を加えた。

血清に於ける薬剤の回収率：家兎の耳静脈より採血した血液 4.5ml に 5, 10, 20mcg/ml の各濃度の薬剤溶液 (0.9% NaCl で稀釈した溶液) を夫々 0.5ml 加える。斯様にして得られた理論的薬剤濃度 0.5, 1, 2mcg/ml の血液より常法にて血清を調製して、この血清中の

薬剤濃度を測定し添加濃度に対する比で表わした。標準曲線用の対照血清は同じ家兎の血液 9ml に 0.9% NaCl 1ml を加えた血液より調製した。

尿の影響：家兎より導尿管にて採取した尿を 3,000 r.p.m. にて5分間遠心分離し、ついで Berkefeld 氏濾過器にかけ無菌化する。斯様にして得られた尿を2%、10% の割合に培地に添加した場合の標準曲線を求め尿の影響を検した。

尿に於ける薬剤の回収率：家兎の尿 9ml に 50, 100, 200mcg/ml の各濃度の薬剤水溶液 1ml を夫々加える。斯様にして得られた理論的薬剤濃度 5, 10, 20mcg/ml の尿中の薬剤濃度を測定し、添加濃度に対する比で表わした。

消化管試料の影響：瀉血屠殺後直ちに摘出した家兎の各消化器官を缺て細断し、之に 0.9% NaCl 水溶液を加え器官重量の10倍量となし、よく攪拌する。斯くして得られた懸濁液を10% 消化管水浮游液と呼称する。之に等量の95% エタノールを加え室温に1時間放置して滅菌し、更に蒸留水を加えて20倍に稀釈した。この稀釈液を培地に10% 添加（培地中濃度は0.025% になる）した場合の標準曲線の変化を調べた。尚、消化管水浮游液自体の濁度は予め測定しておき、培養後の発育度より差引いて補正した。

消化管試料に於ける薬剤の回収率：正常家兎の10% 消化管水浮游液 5ml に100及び200mcg/ml の濃度の薬剤溶液 1ml を夫々加えた。この薬剤添加量を消化管の重量当りに換算すると、夫々200及び400mcg/g になる。之等の溶液に95% エタノール 5ml を加え室温に1時間放置して殺菌し、更に蒸留水にて20倍に稀釈して検液となした。別に薬剤を含まない消化管水浮游液の稀釈液を上記と同様にして調製し対照液とした。検液中の薬剤濃度は対照液を添加して得た標準曲線 (A) とそれを添加しないで得た標準曲線 (B) の夫々を用いて測定し、添加薬剤濃度に対する比で表わした。

* 藤沢薬品工業株式会社研究所

1960年10月14日受付

実験結果および考按

血清の影響： 結果は図1に示す如くで、血清1%の添加では無添加の場合と殆んど差異がないが、10%の添加では試験菌の発育が抑制されている。然しこの場合も感度即ち標準曲線の傾斜は無添加の場合と殆ど変らない。従つて、血清中濃度は対照血清を検体血清と同濃度に添加した培地に標準曲線を求め、之を用いて測定すればよい。最低可測濃度は第1章にて述べた如く培地中濃度として0.05mcg/mlであるから、10%血清濃度で

図1 標準曲線に及ぼす血清添加の影響

試験菌：E. coli NIHJ 株

培地：肉エキス0.5%，ペプトン0.5%，NaCl 0.25%，エタノール2%，pH 8.0

培養：37°C，18時間

表1 家兎血清の個体差

No.	家 兎 性, 体重	発 育 度 (吸光度)*			類別**
		0mcg/ml	0.1mcg/ml	差	
1	M. 2.0kg	0.260	0.162	0.098	+
2	M. 2.2	0.214	0.107	0.107	+
3	M. 2.3	0.240	0.208	0.032	-
4	M. 2.3	0.310	0.233	0.077	±
5	M. 2.1	0.253	0.167	0.086	+
6	M. 2.1	0.243	0.105	0.138	+
7	M. 2.2	0.253	0.205	0.088	+
8	M. 2.1	0.293	0.245	0.048	-
9	M. 2.2	0.284	0.130	0.154	+
対 照 (血清無添加)		0.456	0.296	0.160	

* 培地中に血清10%添加時の試験菌の発育度。

0, 0.1mcg/ml は培地中の NF-3 の濃度である。

** 血清が薬剤 (NF-3) に拮抗作用を示す家兎を (-) とした。

測定すれば血清中濃度として 0.5mcg/ml まで測定可能である。

次に、家兎血清の個体差についての結果は表1に示す如くである。発育度差は家兎によつて区々であつたが、この中 No. 3, No. 8 の家兎の如く発育度差が特に著しく小さいものがあつた。斯様な実験を日を変えて実施しても同様な結果が得られたので、この現象は家兎の個体差によるものと考えられる。従つて発育度差の小さい血清を有する家兎は、薬剤濃度測定実験には使用すべきでないを考える。

血清を非働化した場合の結果は表2に示す如くである。薬剤濃度0の培地での発育度をみると未処理血清の場合と異り、血清添加の影響が認められない。即ち血清の発育抑制作用が失われていることを示している。又、発育度差はいずれの家兎でも同程度で、前記の個体差は認められないのである。然し乍らその発育度差は未処理血清の場合に比較すれば小さい値である。従つて、血清の非働化は家兎の個体差をなくす利点はあるが、標準曲線の感度を悪くし微量測定には不利な欠点となる。それ故、血清中濃度が低いと予想される検体では個体差をなくすために血清を非働化する方法を用いず、不適当な家兎を用いないようにする方がよいと考えられる。

表2 血清非働化の影響

家兎 No.	発 育 度 (吸 光 度) **					
	未 処 理 血 清			非 働 化 血 清		
	0 mcg/ml	0.1 mcg/ml	差	0 mcg/ml	0.1 mcg/ml	差
1	0.201	0.087	0.114	0.284	0.205	0.097
2	0.206	0.089	0.117	0.318	0.236	0.082
3	0.181	0.148	0.033	0.304	0.225	0.079
4	0.222	0.144	0.078	0.308	0.244	0.059
6	0.201	0.082	0.119	0.301	0.195	0.106
8	0.147	0.119	0.028	0.272	0.172	0.100
対照	0.302	0.205	0.097	0.302	0.205	0.097

* 家兎は表1と同じものを用いた。

** 表1の註参照。

血清に於ける薬剤の回収率： 結果は表3に示す如くで、いずれの場合にも100%の回収率は得られなかつた。その理由として、まず血餅への薬剤の移行が考えられるので血餅中の薬剤を測定したが、2mcg/ml 添加の場合にも全薬剤は検出し得なかつた。従つて、この回収率の低いのは血清調製中に薬剤が一部分解したためではないかと推測される。

表3 血液試料に於ける回収率

薬剤添加濃度 (A)	測定濃度 (B)	回収率 (B/A×100)
0.5mcg/ml	0.25mcg/ml	50%
1	0.8	80%
2	1.4	70%

血中濃度測定法：以上の検討結果より血中濃度の測定は次の如く行えばよい。標準曲線の傾斜に悪影響を及ぼさない血清を有する家兎を予め選択する。薬剤投与直前に採血し、これより対照血清を調製する。投与後採血した血液より検体血清を調製する。いずれの血清も非働化は行わない。標準曲線用の試験管内には標準薬剤液 0.5ml, 対照血清 0.5ml, 試験菌を接種された培地 4.5ml をいれ、検体用試験管内には蒸溜水 0.5ml, 検体血清

0.5ml, 試験菌を接種された培地 4.5ml をいれる。培地中の血清濃度は10% (factor=0.9) である。その他の操作は第1報記載の通りである。

尿の影響：結果は図2の如くである。添加濃度2%以下ではその影響は殆ど無視しうる。然し、尿試料の場合は対照尿を用いて求めた標準曲線を使用しても、尿の影響の修正は余り期待し得ないと考えられる。何となれば、尿成分の時間経過による濃度の変動が血清の場合より遙かに大きいからである。従つて培地中に許容し得る尿濃度は最大2%程度と考えられる。この場合の尿中最低可測濃度は先の血清の場合と同様の計算によれば約2.5mcg/ml である。

尿に於ける薬剤の回収率：結果は表4に示す如くで、

表4 尿試料に於ける回収率

薬剤添加濃度 (A)	測定濃度 (B)	回収率 (B/A×100)
5mcg/ml	4.8mcg/ml	96%
10	10.2	102%
20	20.4	102%

図2 標準曲線に及ぼす尿添加の影響

いずれの添加濃度の場合でも約100%の回収率が得られた。

尿中濃度測定法：以上の検討結果より尿中濃度の測定は次の如く行えばよい。薬剤投与後採尿又は自然排尿にて得られた家兎の尿を3,000r.p.mにて5分間遠心分離し、その上澄液をとる。之に95%エタノールを等量加え室温に1時間放置して殺菌し、更に蒸溜水にて2.5倍に稀釈する。斯くして20%の尿検体が得られる。別

表5 標準曲線に及ぼす各消化器官水浮遊液添加の影響

培地中 薬剤濃度	発育度 (吸光度)*						
	胃	十二指腸 空腸	回腸	盲腸	大腸	胆汁	対照
0mcg/ml	0.511	0.509	0.496	0.449	0.514	0.495	0.538
0.1	{ 0.371 (105%)**	0.335 (130)	0.342 (125)	0.378 (102)	0.401 (86)	0.343 (124)	0.386 (100)
0.2	{ 0.214 (113%)	0.235 (96)	0.242 (95)	0.246 (80)	0.239 (95)	0.194 (125)	0.229 (100)
0.4	0.092	0.088	0.093	0.162	0.076	0.097	0.107
0.6	0.069	0.067	0.065	0.102	0.056	0.065	0.071
0.8	0.072	0.061	0.061	0.094	0.056	0.063	0.064
1.0	0.065	0.061	0.061	0.089	0.056	0.061	0.061

* 各消化管水浮遊液を培地に0.025%添加した場合のNF-3各濃度に於けるE. coliの発育度である。

** ( ) 内数字は、対照標準曲線を用いて0.1, 0.2mcg/ml濃度の場合の発育度から夫々の薬剤濃度を算定し(B)理論的濃度(A)との比率(B/A×100)である。

に薬剤投与直前に採尿し同様に処理して対照尿とする。対照血清、検体血清の代りに夫々上記対照尿、検体尿を用いるほかは血中濃度測定の場合と同様の操作で尿中濃度を測定し得る。但し、検体及び対照尿には既にエタノールが含まれているので試験培地中に予めエタノールを添加しておく必要はない。

消化管試料の影響： 結果は表5に示す通りである。影響の程度を知るために消化管水遊遊液を添加しない対

照標準曲線を用いて0.1及び0.2mcg/ml濃度の場合の発育度からその薬剤濃度を算定し、(B)、理論的濃度(A)0.1及び0.2mcg/mlとの%比率($B/A \times 100$)を示すと表5の括弧内数字の如くなる。この影響率が比濁法自体の誤差以上を示す器官もあり、その器官内の薬剤濃度を測定するに際し不可避な誤差と考えられる。

消化管試料に於ける薬剤の回収率： 結果は表6に示す通りである。理論的にいえば標準曲線(A)を用いて

表6 各消化管試料に於ける回収率

添加濃度	測定法*	回 収 率										
		胃	十二指腸 空	腸	回	腸	盲	腸	大	腸	胆	汁
200mcg/g	a	64%		60		50		30		35		60
	b	84%		100		94		66		66		100
400mcg/g	a	78%		90		90		78		102		75
	b	90%		120		120		92		89		55

* 対照の消化管水浮遊液を添加して得た標準曲線(A)とそれを添加しないで得た標準曲線(B)とを用いて測定した値が夫々a, bの回収率である。

得た値(a)を正確な回収率とすべきであるが、実際に薬剤を経口投与して測定する場合には対照消化管試料は得られないのであるから、標準曲線(B)を用いて得た値(b)が回収率となるわけである。a値とb値とを比較してみるとa値の方が低く一見矛盾しているように思われるが、これは表5に示した如く消化管水遊遊液を添加した場合の標準曲線の発育度が対照のそれより概して低いからである。a値が100%より明らかに低いのは、消化管試料に薬剤を混ざることにより薬剤の一部が不活性化されたためではないかと考えられる。この現象は盲腸、大腸に於て特に著明であり、又、添加濃度が低い場合に著しいようである。従つて本測定法の実施に当つてはこれらの事を念頭におき乍ら結果を評価しなければならない。

最低可測濃度は上記の不活性化現象を無視して測定法上からのみ考え、各消化管水遊遊液添加時の標準曲線の傾斜と第1報にて示した発育度誤差より求めるならば培地中で0.025mcg/ml(但し消化管水遊遊液の培地添加濃度0.25%の場合)であり、従つて元の試料としては100mcg/g程度である。盲腸、大腸ではこれよりも高く約200mcg/gが最低可測濃度になる。

消化管内濃度測定法： 以上の検討結果より消化管内濃度の測定は次の如く行えばよい。薬剤を含有する各消化管より夫々10%消化管水遊遊液を作り、之に95%エタノールを等量加え室温に1時間放置して殺菌する。更に之を蒸留水にて20倍に稀釈して検体とする。標準曲線は消化管試料を含まない培地を用いて求める。検体用試験管には検体0.5ml、試験菌を接種された培地(但し

エタノール未添加)4.5mlをいれる。検体自体の濁度を測定しておき培養後の発育度より差引いて補正する。その他の操作は第1報記載の通りである。

総 括

ニトロフラン化合物の比濁法による生体内濃度測定法について検討した。

血清を10%培地に添加しても感性曲線の感度に殆ど影響がなかった。Furazolidoneについては最低0.5mcg/mlの血清中濃度まで測定可能であり、血清に於ける薬剤の回収率は約70%であつた。

少数ではあるが薬剤の抗菌力に拮抗を示す血清をもつた家兎が存在した。この作用は血清を非働化することにより消失せしめ得たが標準曲線の感度が低下し微量測定には不利となるので、血中濃度測定前に不適当な家兎の除外が必要である。

尿を5%以上培地に添加すると標準曲線は著しく変動したので、添加率は2%以下で測定するのが適當であつた。最低2.5mcg/mlの尿中濃度まで測定可能であり、尿に於ける薬剤の回収率はほぼ100%であつた。

消化管内容物は培地に添加しても、又直接薬剤と混合することによつても薬剤の抗菌力に大きな影響を与えた。消化管試料の培地中濃度を0.25%にして測定してもその誤差は比濁法自体の誤差を越える器官が多かつた。回収率は30~90%で器官により異なるが、特に盲腸、大腸に於て不良であつた。

(文献は第3報末尾に一括掲載する)。

Summary

The turbidimetric assay method established previously was studied to apply for determination of nitrofurans compounds in the body fluids.

The slope of the growth curve was not affected by adding 10 per cent of rabbit serum to the medium. As a result, it has been found that serum concentration of about 0.5 mcg/ml of furazolidone could be measured by using this standard curve. About 70 per cent of furazolidone added to rabbit blood was recovered by this assay method.

There were some rabbits of which sera showed antagonistic action to the drug. This action was removed by inactivation of their sera, but in the rabbit of which serum had no antagonistic action, the slope of standard curve became slower on using the inactivated serum than on using the intact serum. This phenomenon is disadvantageous for microdetermination and, therefore, it would be better in this experiment not to use the rabbit of which serum shows an antagonistic action.

As the standard growth curve was greatly affected by adding more than 5 per cent of rabbit urine to the medium, it was necessary to make urine concentration in the medium less than 2 per cent. In this condition, urine concentration of more than 2.5 mcg/ml of furazolidone was determinable. And by this method 100 per cent of furazolidone added to rabbit urine was recovered.

The activity of furazolidone was considerably affected by adding the gastrointestinal saline suspensions. When the concentration of gastrointestinal samples in the medium was 0.025 per cent, the minimum determinable concentration of the drug was about 100 mcg/gm in the stomach and small intestine and about 200 mcg/gm in the large intestine. The recovery rates of added furazolidone from the gastrointestinal organs were roughly 30-90 per cent, varying according to the organs.

Research Laboratory, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.