ニジマスにおける 5 種サルファ剤の胆汁および尿中代謝物の検討

石 田 典 子

(1989 年 7 月 3 日受付)

Metabolites of Five Sulfa Drugs in the Bile and Urine of
Rainbow Trout *Salmo gairdneri**¹Noriko Ishida*²

Metabolites of five sulfa drugs in the bile and urine were identified after oral administration to rainbow trout of sulfamerazine, sulfisoxazole, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine, and sulfisozole.

Bile samples were withdrawn at 48 h after administration while urine samples were collected continuously up to 72 h. Separation of metabolites in the sample fluids were carried out by two-dimensional thin-layer chromatography on Silica Gel 60 F₂₅₄ HPTLC plate. Reactions of Ehrlich, Tsuda, and naphthoresorcinol were then observed.

Unchanged forms, N⁴-acetylated forms, and glucuronides of the all drugs examined were detected. In the bile samples after administration of sulfisoxazole, two kinds of glucuronide were detected.

It is suggested that the sulfa drugs are mainly metabolized to N⁴-acetylated forms and glucuronides in rainbow trout.

サルファ剤はスルファニルアミドを基本とした骨格を持ち、広く臨床使用されている合成抗菌剤であるが、養殖魚においてもアユ、ニジマスおよびブリのビブリオ病、ウナギのひれ赤病、ヤマメ、アマゴおよびニジマスのせうそう病などの治療薬として用いられている。

サルファ剤の代謝に関しては哺乳動物において詳しく研究されており、アセチル体、グルクロン酸抱合体および硫酸抱合体等に代謝されることが明らかにされている。¹⁾ しかし、魚類においてはサルファ剤の代謝を検討した報告は見当たらず、投薬後の組織試料において酸処理した後に遊離するサルファ剤をアセチル体として算出しているのに留まっている。²⁾ 著者は前報³⁾においてニジマスの胆汁および尿中におけるナリジクス酸系抗菌剤の代謝物を同定し、抗菌性を有する非抱合型代謝物の存在を明らかにした。本研究においてもニジマスを対象魚種とし、スルファメラジン、スルフイソキサゾール、スルファジメトキシン、スルファモノメトキシンおよびスルフイソゾールのサルファ剤 5 種の代謝物について検討した。その結果、サルファ剤はニジマスにおいて主にアセチル体あるいはグルクロン酸抱合体に代謝されることが明らかになったので報告する。

実験方法

供試魚 養殖研究所玉城庁舎において飼育されたニジマス *Salmo gairdneri* の 2 年魚を用いた。

供試薬剤 スルファメラジン、スルフイソキサゾール、スルファジメトキシン、スルファモノメトキシン、スルフイソゾール (Fig. 1) およびスルファニルアミドは第一製薬株式会社において合成されたものを標品として用いた。これらの薬剤の N⁴ 位のアミノ基にアセチル体が抱合された N⁴-アセチル体を日本薬局法⁴⁾に準じて合成した。

投与方法 各薬剤を市販マス用粉末飼料と混合し、それぞれ魚体重 1 Kg 当たり 250 mg となるように強制経口投与した。

試料の採取 投薬 48 時間後に即殺し、注射器により胆汁を採取した。尿はカテーテルを用いて 72 時間後まで連続採取した。無投薬の対照群の胆汁および尿も採取した。

試料の調製 ロータリーエバポレーターにより胆汁は 1/2 容に、尿は 1/40-1/200 容に減圧濃縮してから同量のエタノールを加えて脱塩し、遠心分離後の上清を薄層クロマトグラフィーに供した。

*¹ 本研究は昭和 60 年度日本水産学会春季大会において発表した。

*² 中央水産研究所 (National Research Institute of Fisheries Science, Kachidoki, Chuo, Tokyo 104, Japan).

Fig. 1. Chemical structures of sulfa drugs.

Fig. 2. Chromatogram of the bile in rainbow trout after oral administration of sulfamerazine. The spots of No. 1~4 were not observed in the untreated fish.

Solvent system I: *n*-butanol-propanol-water (2:1:1).

Solvent system II: *n*-butanol-propanol-1*N* ammonia water (2:1:1).

薄層クロマトグラフィー 投薬および無投薬区の両試料を Silica Gel 60 F₂₅₄HPTLC プレート (E. Merck A.G.) に塗布し、2次元展開を行なった。展開溶媒は、前報⁹⁾と同様に検討してから、1次展開には *n*-ブタノール-プロパノール-水 (2:1:1, v/v) を、2次展開には *n*-ブタノール-プロパノール-1*N* アンモニア水 (2:1:1, v/v) を用いた。展開後、紫外線照射下で両試料のクロマトグラムを比較し、投薬区のみに見えるスポットを代謝物として検出した。各代謝物のスポットについてエールリッヒ試薬 (アミノ基検出用試薬)、津田試薬 (アミノ基検出用カップリング試薬) およびアニリンフタレート試薬⁹⁾ (グルクロン酸抱合体検出試薬) による呈色反応を調べた。標品を無投薬区試料に加えて薄層クロマトグラフィーを行ない、標品と代謝物の R_f 値を比較した。

Fig. 3. Chromatogram of the urine in rainbow trout after oral administration of sulfamerazine. The spots of No. 1~3 were not observed in the untreated fish.

Solvent systems I and II are the same as in Fig. 2.

結 果

スルファメラジン スルファメラジン投与後の胆汁および尿試料のクロマトグラムを無投薬試料のクロマトグラムと比較し、胆汁 (Fig. 2) で4個のスポット (No. 1, 2, 3, 4)、尿 (Fig. 3) で3個のスポット (No. 1, 2, 3) を代謝物として検出した。No. 1のスポットはエールリッヒおよび津田試薬により直ちに著しく呈色し、その R_f 値は標品のスルファメラジンと等しいことからスルファメラジンと同定した。No. 2はエールリッヒおよび津田の両試薬による呈色反応は示さないが、プレートに10%塩酸を噴霧して加水分解処理をした後には両試薬に呈色し、その R_f 値は標品の N⁴-アセチル体と等しいことからスルファメラジンの N⁴-アセチル体と同定した。No. 3はエールリッヒおよび津田試薬により呈色したので、スルファメラジンのグルクロン酸抱合体と同定した。No. 4はエールリッヒおよび津田試薬により呈色せ

ず，加水分解処理後も呈色反応を確認できなかった。

スルフィソキサゾール スルフィソキサゾール投与後の胆汁からは5個の代謝物のスポットが認められた(Fig. 4)。スルファメラジンの場合と同様の同定方法により，No. 5 はスルフィソキサゾール，No. 6 は N⁴-アセチル体，No. 7 はグルクロン酸抱合体と同定した。No. 8 はエールリッヒおよび津田試薬により呈色しないが，加水分解処理後は呈色した。また，アニリンフタレート試薬により呈色したので，No. 7 とは異なるグルクロン酸抱合体であると推定された。No. 9 はスルファメラジンにおける No. 4 のスポットと同様の呈色反応を示し，同定できなかった。尿試料からはスルフィソキサゾールおよび N⁴-アセチル体が検出された (Table 1)。

Fig. 4. Chromatogram of the bile in rainbow trout after oral administration of sulfisoxazol. The spots of No. 5~9 were not observed in the untreated fish.

Solvent systems I and II are the same as in Fig. 2.

スルファジメトキシシン スルファジメトキシシン投与区の胆汁からはスルファジメトキシシン，N⁴-アセチル体，グルクロン酸抱合体および No. 4 と同様の性質を示すスポットが検出された。尿からはスルファジメトキシシンが検出された (Table 1)。

スルファモノメトキシシン スルファモノメトキシシン投与区の胆汁からはスルファモノメトキシシン，N⁴-アセチル体，グルクロン酸抱合体および No. 4 と同様の性質を示すスポットが検出された。尿からはスルファモノメトキシシンおよび N⁴-アセチル体が検出された (Table 1)。

スルフィソゾール スルフィソゾール投与区では，胆汁からはスルフィソゾール，N⁴-アセチル体，グルクロン酸抱合体および No. 4 と同様の性質を示すスポットが検出された。尿からはスルフィソゾールおよび N⁴-アセチル体が検出された (Table 1)。

以上のように，すべてのサルファ剤において未変化体，N⁴-アセチル体およびグルクロン酸抱合体が検出された。スルフィソキサゾールにおいてはグルクロン酸抱合体が2種類認められた。

考 察

サルファ剤は細菌感染症における最初の有効な化学療法剤であり，1935 年に Domagk がプロントジルを発見して以来，ヒトでは 1930 年代後半から 1940 年代の抗生物質の開発に至るまで臨床用として広く使われてきた。水産用医薬品としてはスルファメラジン，スルファジメトキシシン，スルファモノメトキシシンおよびスルフィソゾールが製造承認されており，魚病の治療を目的として使用されている。サルファ剤はその作用持続時間の長短によって分類されているが，哺乳動物における分類が必ずしも魚類にそのまま当てはまらないことが明らかになっている。^{1,2)}

Table 1. Metabolites of sulfa drugs in the bile and the urine of rainbow trout

Sulfa Drug	Sample	Unchanged Form	N ⁴ -Acetylated Form	Glucuronide		Unknown
				A*1	B*2	
Sulfamerazine	Bile	+	+	+		+
	Urine	+	+	+		
Sulfisoxazole	Bile	+	+	+	+	+
	Urine	+	+			
Sulfadimethoxine	Bile	+	+	+		+
	Urine	+	+			
Sulfamonomethoxine	Bile	+	+	+		+
	Urine	+	+			
Sulfisozole	Bile	+	+	+		+
	Urine	+	+			

*1: Ehrlich and Tsuda reactions were positive.

*2: Ehrlich and Tsuda reactions were positive after spraying with 10% hydrochloric acid.

+: detected by thin-layer chromatography.

サルファ剤の N⁴ 位のアミノ基にアセチル基が抱合された N⁴-アセチル体は哺乳動物において最も主要な代謝物である。⁶⁾ しかし、イヌおよびキツネではアセチル抱合能が欠如しており、N⁴-アセチル体は認められていない。⁷⁾ N⁴-アセチル体は、本研究で供試したスルフィソキサゾール,⁵⁾ スルファジメトキシシン,⁸⁾ スルファモノメトキシシン⁹⁾ の他に、スルファチアゾール,¹⁰⁾ スルファジアジン,¹¹⁾ スルファメチルチアジアゾール¹²⁾ を投与したヒトの尿において検出されている。ニジマスにおいても供試したすべてのサルファ剤において N⁴-アセチル体が確認され、哺乳動物と同様に、ニジマスにおいても N⁴-アセチル体は主要な代謝物であると考えられた。

サルファ剤のグルクロン酸抱合体は N¹ 位および N⁴ 位のものが知られている。¹³⁾ N⁴ 位のアミノ基へのグルクロン酸抱合反応は非酵素的なものであり、すべてのサルファ剤に起こり得るのが特徴であるが、哺乳動物においては数 % 以下の生成率であることが明らかになっている。⁸⁾ ヒトの尿中における N⁴-グルクロン酸抱合体はスルフィソキサゾール,⁵⁾ スルファチアゾール,¹⁰⁾ スルファジアジン,¹¹⁾ スルファメチルチアジアゾール¹²⁾ で報告されている。一方、N¹-グルクロン酸抱合体は酵素反応によって生成し、本研究において供試したスルファジメトキシシン,⁸⁾ スルファモノメトキシシン⁹⁾ の他に、スルファチアゾール,¹⁰⁾ スルファイソメゾール¹⁴⁾ においても認められている。スルファジメトキシシンの N¹-グルクロン酸抱合体は、哺乳動物においては N⁴-アセチル体と並んで主要な代謝物であることが明かになっており、⁸⁾ グルクロン酸抱合能を欠くネコやウサギなどでは検出されていない。¹⁵⁾ 一方、本研究においてニジマスでスルファジメトキシシンのグルクロン酸抱合体が検出されたことから、これは酵素反応によって生成したものであると考えられた。N¹ 位および N⁴ 位の他に、2' の位置が抱合された抱合体もスルフィソキサゾール¹⁶⁾ およびスルファイソメゾール¹⁴⁾ において検出されている。ニジマスでは供試したすべての薬剤においてグルクロン酸抱合体が認められ、スルフィソキサゾールでは2種類も検出されていることから、グルクロン酸抱合体もアセチル体と同様ニジマスにおける主要なサルファ剤の代謝物であると推定された。スルフィソキサゾールの No. 8 以外のグルクロン酸抱合体は、アミノ基検出試薬であるエールリッヒおよび津田試薬によって直ちに反応したので、N⁴ 位のアミノ基以外の位置、例えば N¹ 位あるいは 2' 位にグルクロン酸が抱合されていると推定される。一方、No. 8 はアミノ基検出試薬に対する呈色反応が先のグループとは

異なり、加水分解処理後に呈色するため、N⁴ 位のアミノ基にグルクロン酸が抱合されたものであると推定される。

本研究においてニジマスのサルファ剤の代謝物として未変化体、N⁴-アセチル体およびグルクロン酸抱合体がすべての供試薬剤において認められたことから (Table 1)、ニジマスにおいてはこれらが主要な代謝物であると考えられた。ヒトの尿中においてもこれらの代謝物が主要であり、例えばスルフィソキサゾールでは未変化体 69%、N⁴-アセチル体 22%、N⁴-グルクロン酸抱合体 4%、2'-グルクロン酸抱合体 3%、N⁴-硫酸抱合体 1%、スルファニルアミド 1% である。¹⁷⁾ サルファ剤はナリジクス酸系合成抗菌剤とは異なり、非抱合型代謝物が検出されなかったことから、酸化などの薬物代謝の第一相反応を経由することなく直接抱合反応を受けると推察された。

文 献

- 1) 尾崎久雄, 池田弥生: 魚類薬理学 I サルファ剤, 緑書房, 東京, 1978, pp. 65-66, 99-103.
- 2) 原 武史, 井上進一: 日水誌, 33, 648-623 (1967).
- 3) 石田典子: 養殖研報, 12, 101-108 (1989).
- 4) 日本公定書委員会: 第八改正日本薬局方 第一部解説書, 廣川書店, 東京, 1971, p. C977.
- 5) 宇野富三, 河野昌男: 薬誌, 80, 201-204 (1960).
- 6) C. M. Stowe: in "Veterinary Pharmacology and Therapeutics 3rd." (ed. by L. M. Jones.) Ames Press, part 8(33) Iowa, 1965, pp. 483-485.
- 7) R. H. Adamson, J. W. Bridges, M. R. Kibby, S. R. Walkers, and R. T. Williams: *Biochem. J.*, 118, 41-45 (1970).
- 8) T. Uno, T. Kushima, and M. Fujimoto: *Chem. Pharm. Bull.*, 13, 261-267 (1965).
- 9) 上田道広, 村上則彦, 厚村治身, 古木和子: 薬誌, 87, 455-457 (1967).
- 10) 宇野富三, 上田道広: 薬誌, 80, 1785-1788 (1960).
- 11) T. Uno, H. Yasuda, and Y. Sekine: *Chem. Pharm. Bull.*, 11, 872-875 (1963).
- 12) 宇野富三, 岡崎雄交: 薬誌, 80, 1682-1686 (1960).
- 13) T. Uno and M. Ueda: *Chem. Pharm. Bull.*, 11, 709-712 (1963).
- 14) 上田道広, 仲川義人, 村上則彦: 薬誌, 87, 451-454 (1967).
- 15) J. Caldwell, R. T. Williams, O. Bassir, and M. R. French: *Europ. J. Drug Metab. Pharm.*, 2, 61-66 (1978).
- 16) 宇野富三, 河野昌男: 薬誌, 82, 1660-1663 (1962).
- 17) 日本公定書委員会: 第十改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京, 1981, p. C979.