

氏 名（本籍） 遠 藤 裕 子  
学位の種類 博 士（薬 学）  
学位記番号 薬 第 342 号  
学位授与年月日 平成 5 年 6 月 16 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 高速液体クロマトグラフィーによる動物試料中の  
動物用抗寄生虫薬の定量に関する研究

論文審査委員 (主 査)  
教授 橋 本 嘉 幸 教授 鈴 木 康 男  
教授 後 藤 順 一

## 論文内容要旨

畜産には現在動物用医薬品及び飼料添加物として抗コクシジウム剤、抗トキソプラズマ剤、抗タイレリア剤、抗ピロプラズマ剤、抗肝てつ剤等数多くの抗寄生虫薬が用いられている。これらの薬物には実験動物に対して催奇形性を有するものもあり、畜産物を介して人体に摂取された場合に公衆衛生上大きな問題となる。これを未然に防ぐことを目的として、各薬剤にはその用法及び用量ごとに休業期間（家畜の出荷前に薬剤の使用を禁止する期間）が定められている。また一方では、食品衛生法により畜産物中には抗菌性物質を含有してはならないとされており、この抗菌性物質のなかには抗原虫剤も含まれることから、畜産物への抗寄生虫薬の残留は法律的にも大きな問題である。

畜産物中の薬物の残留を防ぎ公衆衛生上の安全性を確保するためには、薬剤の休業期間を遵守することが第一であるが、畜産物中に薬物が残留していることを明らかにする適切な分析法も必要である。一方、薬物の適正な使用をはかるためには、薬物を対象動物（投薬の対象となる動物）に投与した場合の薬物の体内動態に関する研究が不可欠である。そのためには動物の生体試料中の薬物及びそれらの生理活性のある代謝物を定量する適切な分析法が必要である。しかし抗寄生虫薬については動物試料中の適切な分析法が確立されていないものや、対象動物における薬物の体内動態に関して報告されていないものもあり、これらの薬物についてはまず動物試料中の当該薬物及びその代謝物の感度及び精度の良い定量法を確立することが先決である。

本研究に於いては高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を分析手段として用いることにより、現在産業動物に用いられている12の抗寄生虫薬及びその代謝物の動物試料中の定量法を確立し、そのうちのいくつかのものについてはその定量法を用いて対象動物での体内動態を調べた。

第2章では、primaquine (PAQ), pamaquine (PRQ) と PRQ の代謝物である carboxy PRQ (CPRQ) を分析の対象とした。PRQ, PAQ はいずれも 8-aminoquinoline 誘導体であり、現在牛タイレリア病の治療薬として使用されている。これらの薬物は牛での体内動態に関して報告されておらず、これを調べることは薬物の適正な使用という観点からみて重要な意義がある。本章の研究に於いては1) 感度及び選択性のすぐれた電気化学検出 HPLC (HPLC-ECD) を用いて牛血漿中 PRQ, CPRQ 及び PAQ の同時定量法を確立し、2) フォトダイオードアレイ検出 HPLC (HPLC-PD) を用いて PRQ を投与した牛血漿中に CPRQ が出現することを確認し、3) PRQ, PAQ を牛に投与してこれらの 8-aminoquinoline の血漿中動態の解析を行った。

本法においては、アセトニトリルを用いて子牛の血漿よりこれらの薬物を抽出し、HPLC-ECD により血漿由来の物質と分離した。0.02~1.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でこれらの薬物を子牛血漿に添加した場合の本法の平均回収率は 68.3~107.2%であったが、このうち 85%以下であったのは血

漿に 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加した CPRQ のみであり、全体としては良好な回収率を示した。また変動係数は 1.8~23.4% の範囲であったが、このうち 15% を超えたものは血漿に 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加した CPRQ のみであり、全体としては良好な変動係数を示した。検出限界はいずれも 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。さらに CPRQ が子牛にも存在することを HPLC-PD を用いて確認した。

また PAQ を投与した子牛の血漿中の PAQ の動態と PRQ を投与した子牛の血漿中の PRQ 及び CPRQ の動態を本法を用いて調べ、非線形最小自乗法を用いてコンパートメントモデルにより解析した。PRQ 及び PAQ はヒトなどで報告されている動態とは異なり、それぞれ静脈内・皮下ないし筋肉内投与後血漿中から急速に消失し、その原因は迅速な代謝及び組織への迅速な分布であろうと推察された。一方 CPRQ は PRQ を静脈内または皮下投与した子牛の血漿からゆっくりと消失し、その動態はヒトなどで報告されているのと類似していた。8-aminoquinoline 誘導体はその治療量と副作用の現れる量が近い薬物として知られており、これらの体内動態に関する知見は、対象動物での適正な使用をはかるために重要である。

第 3 章では、bromofenofos (BF) 及びその代謝物 dephosphate bromofenofos (DBF) を分析の対象とした。BF は反すう動物の肝てつ症の治療に広く使用されている薬物であり、BF を投与した牛の乳汁中には BF の代謝物である DBF のみが検出され BF は全く検出されないことが明らかにされている。最近、BF にはラットに対する胚胎仔致死作用及び催奇形作用があるという報告がなされ、同様の作用が DBF についても報告されている。これらの毒性学的な問題を明らかにするためにはラット及び牛での BF の体内動態を調べる必要がある。本章の研究に於いては 1) UV 検出 HPLC (HPLC-UV) を用いてラット及び牛血漿中 BF 及び DBF の同時定量法を確立し、2) BF をラット及び牛に投与して BF 及び DBF の血漿中動態を調べた。

本法においては、水で希釈したラットの血漿より酢酸エチルを用いてこれらの薬物を抽出し、HPLC-UV により血漿由来の物質と分離した。1.0~100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でこれらの薬物をラット血漿に添加した場合の本法の平均回収率は 82.8~100.7% と良好であった。また変動係数は 0.5~3.3% と良好であった。検出限界はいずれも 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。牛血漿からの抽出の場合は水の代わりにリン酸緩衝液 (pH8.5) を用いることにより、ラットと同様の良好な回収率を示した。本法は、既に報告されているガスクロマトグラフィー (GC) 法に比べて試料の前処理法が迅速かつ簡便で、誘導体化の必要がなく、しかも臨床的に有効な量の BF を投与したラット及び子牛の血漿中の BF 及び DBF の分離定量が可能であった。本法は、GC 法に比べて感度は低かったが、ラット及び子牛での BF の投与試験の結果に示されたように、BF の体内動態を調べるには充分有用であった。

さらに本法を用いてラット及び子牛の血漿中の BF と DBF の動態を調べた。BF をラットに腹腔内投与した場合には血漿中に BF が出現したが、牛に経口投与した場合には BF は出現しなかつ

た。また、いずれの場合にも DBF は血漿中に比較的長く存在していた。これらの知見は、BF の対象動物での適正な使用をはかるためのみならず、BF の催奇形作用を明らかにする上でも有用である。

第4章では、sulfonamide 5 剤とそれらの N<sup>4</sup>-acetyl 代謝物及び sulfonamide と併用されることの多い diaminopyrimidine 3 剤を分析の対象とした。分析の対象とした sulfonamide は sulfadiazine (SDZ), sulfamonomethoxine (SMM), sulfamethoxazole (SMX), sulfaquinolaxaline (SQ) 及び sulfadimethoxine (SDM) であり、diaminopyrimidine は ormethoprim (OMP), trimethoprim (TMP) 及び diaveridine (DIV) である。Sulfonamide は鶏などの感染症の予防及び治療の目的で抗菌剤あるいは抗コクシジウム剤として、単独であるいは diaminopyrimidine との配合剤として広く使用されている薬物である。SDM を鶏に投与した場合他の組織より皮膚に長く SDM が残留すると報告されていることから、特に鶏の皮膚中に残留しているいくつかの sulfonamide の同時定量法の確立は大きな意義を持っている。また、sulfonamide の N<sup>4</sup>-acetyl 代謝物は抗菌・抗原虫活性を持たないが、ヒトにより摂取された場合に体内で代謝されて sulfonamide にもどることが明らかにされており、畜産物中に残留した場合に食品衛生上問題となるため分析の対象とした。

これまでに、GC, HPLC などを用いて畜・水産物中に残留しているいくつかの sulfonamide の同時定量法が多く報告されているが、皮膚を含む鶏のほとんどの可食部位に残留しているいくつかの sulfonamide 及びその N<sup>4</sup>-acetyl 代謝物の同時定量法は報告されていない。また sulfonamide と併用されることの多い diaminopyrimidine についても同時に定量することができればその意義は大きい。本章の研究に於いては 1) HPLC-UV を用いて鶏組織（筋肉・肝臓・腎臓・皮膚・血漿）中のこれら 13 の化合物の同時定量法を確立し、2) Sulfonamide 5 剤と diaminopyrimidine 3 剤を同時に投与した鶏の組織中のこれら 13 の化合物を分離、定量することができることを確認した。

本法においては、アセトニトリルを用いて鶏の筋肉、肝臓、腎臓、皮膚及び血漿よりこれら 13 の薬物を抽出後、抽出液を n-ヘキサンで洗浄し、濃縮してアルミナカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製された抽出液中の 13 の薬物は本法の HPLC 条件で組織由来の物質と分離した。0.05 µg/g (µg/ml) または 0.2 µg/g (µg/ml) の濃度で 13 の薬物を鶏の筋肉・肝臓・腎臓・皮膚・血漿に添加した場合の本法の平均回収率は 53.9~106.3%であったが、このうち 70%以下であったのは血漿に添加した SQ と筋肉に 0.05 µg/g の濃度で添加した OMP のみであり、全体としては良好な回収率を示した。また変動係数は 0.6~21.3%の範囲であったが、このうち 15%を超えたものは血漿に添加した SQ、肝臓に 0.05 µg/g の濃度で添加した SDM 及び腎臓に 0.05 µg/g の濃度で添加した N<sup>4</sup>-acetyl SMM のみであり、全体としては良好な変動係数を示し

た。検出限界はいずれの薬物及び組織の場合でも  $0.02\sim 0.05\ \mu\text{g/g}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) であった。

さらに、これら 8 剤を同時に投与した鶏由来の組織でも全ての化合物の定量が可能であったため、本法の残留試験法としての妥当性が示された。

第 5 章では sulfamoyldapson (SMD) を分析の対象とした。SMD は豚のトキソプラズマ症の予防及び治療薬として日本で開発された動物用医薬品で、豚及び猫に広く使用されている。SMD の生体試料中分析法としてはモルモット血清中の分析法の報告があるのみで、豚での残留分析法として用いることのできる方法はない。本章の研究に於いては 1) HPLC-UV を用いて豚組織 (筋肉・肝臓・腎臓・脂肪) 中の SMD の定量法を確立し、2) 豚で現在使用されている他の 27 の動物用医薬品 (抗生物質及び合成抗菌剤) により分析を妨害されることがないことを確認した。

本法においては、n-ヘキサンで飽和したアセトニトリルを用いて豚の筋肉、肝臓、腎臓、脂肪より SMD を抽出後、抽出液をアセトニトリルで飽和した n-ヘキサンで洗浄し、抽出液を濃縮してアルミナカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製された抽出液中の SMD は本法の HPLC 条件で組織由来の物質と完全に分離した。 $0.1\ \mu\text{g/g}$  または  $0.5\ \mu\text{g/g}$  の濃度で SMD を豚組織 (筋肉・肝臓・腎臓・脂肪) に添加した場合の本法の平均回収率は  $93.3\%\pm 6.0$  と良好であった。さらに豚で現在使用されている他の 27 の動物用医薬品 (抗生物質及び合成抗菌剤) により分析を妨害されることがないことが確認され、本法の残留試験法としての妥当性が示された。

本研究により、動物試料中の 12 の抗寄生虫薬とそれら代謝物の定量が可能になり、そのうちのいくつかのものについて体内動態が明らかとなった。これらの知見は公衆衛生上、及び畜産において抗寄生虫薬を適正に使用するために極めて重要である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

畜産においては動物用医薬品および飼料添加物として種々の抗寄生虫薬が使用されているが、これらの薬物には実験動物に対して催奇形性を示すものもあり、畜産物を介して人体に摂取された場合の危険性を考慮する必要がある。従って安全性の確保のためには畜産物中の残留薬物を適確に定量することが要求される。そのためには、また、動物体内における摂取薬物の代謝物を含めての定量が必要である。

本研究においては高速液体クロマトグラフィーを分析手段として用いることにより、12種の抗寄生虫薬およびその代謝物の動物試料中定量法を確立し、また、その定量法を用いて対象動物における薬物動態を検索している。

最初に、牛タイレリア病治療薬である Primaquine (PRQ) と PRQ の主代謝物の血中濃度の同時定量法を樹立し、子牛への薬物投与時における薬物動態を解析した。その結果、投与した薬物は急速に血中および組織中から消失することが確認された。(2章)

次に牛の肝てつ症治療薬である Bromofenofos (BF) およびその代謝物の血中同時定量法を確立し、その方法を用いて BF を投与した牛およびラットの血中動態を検索した。その結果ラット血中には BF が検出されたが牛では検出できなかった。しかし、その代謝物である DBF は両動物共に比較的長期に血中より検出された。(3章)

ついで鶏のkokshizum病などの予防・治療薬である sulfonamide 5 剤とそれらの N<sup>4</sup>-acetyl 体並びに sulfonamide と併用されることの多い diaminopyrimidine 3 剤の鶏組織および血中の同時定量法を確立し(4章)、さらに豚トキソプラズマ病の予防・治療薬である Sulfamoyldapsone の豚組織中の定量法も樹立した(5章)。

以上の研究は食肉摂取において混入が予想される各種の動物医薬品の適確な定量法を樹立し、食品衛生に多大の貢献をする業績として評価され、博士論文に値するものと思われる。