

Chloramphenico-glycinatel に関する生物学的研究 第 I 報

抗 菌 力 に つ い て

星 野 保 夫・三 宅 章・横 井 山 繁 行

長 谷 川 大 四 郎 早 野 和 夫

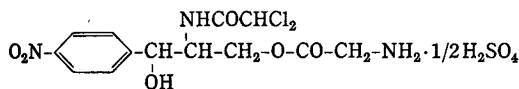
東 洋 釀 造 株 式 会 社 研 究 部 (部 長 : 阿 部 仁 之 助 博 士)

(昭 和 43 年 9 月 5 日 受 付)

は じ め に

Chloramphenicol-glycinate (CP-G と略す) は, 1956 年以來 CONCILIO^{1,2)} により研究された水溶性の chloramphenicol ester であり, 彼らが合成した多くの chloramphenicol ester の中, エステル分解がもつともすぐれ, 容易に chloramphenicol (CP) を遊離して抗菌力を表すために, 実際治療に適用されている物質である^{3,4,5)}。

CP-G は通常硫酸塩として用いられ, 下記の構造をもつ微黄色結晶性粉末で, 水に対して約 1g/ml の溶解度を示す。



本報告では, CP-G の *in vitro*, *in vivo* における細菌学的研究についての成績をのべる。

In vitro における CP-G の抗菌力試験

諸種細菌に対する抗菌スペクトラム, 検定条件について検討した。

(1) 実験材料および実験方法

a) 実験材料

CP-G はイタリー Zambon 社製の硫酸塩を用い, CP は東洋醸造株式会社によつて輸入されたものを用いた。

b) 抗菌スペクトラム

研究室保存の 20 株の細菌, 患者より分離した CP 感受性 *Staphylococcus aureus* 1 株および群馬大学医学部微生物学教室から分与された多剤耐性菌 12 株につき, 寒天希釈塗抹法により抗菌スペクトラムを検討した。すなわち, CP-G を無菌水で 2 倍希釈系列に調製して, この 1 ml とペプトン (極東製薬製) 1.0%, 肉エキス (極東製薬製) 0.5%, 食塩 0.3%, 寒天 (純正化学製) 1.5% からなる培地 (pH 6.5) 19 ml とよく混合して, 寒天平板培地を調製した。これに, あらかじめ肉水ブイヨン培地に 1 夜培養した試験菌菌液を 1 白金耳ずつ塗抹して 37°C, 24 時間培養後, 菌の発育の有無によつて最小発育阻止濃度を求めた。

c) 培地組成の検討

普通寒天培地, マッコンキー培地, ペプトン寒天培地 (いずれも日本栄養化学製), 血液寒天培地について, pH 6.5 で paper disc 法により標準曲線を作成した。試験菌は *E. coli* NIHJ 株を用いた。

Disc は東洋紙社 No. 51 の直径 8 mm のパルプを使用した。

d) 培地 pH の検討

検定の至適 pH を求めるため, pH 6.5, 8.0, 9.0 の普通寒天培地について, paper disc 法により試験菌 *E. coli* NIHJ 株の標準曲線を作成した。

e) CP-G の力価測定法の検討

表 1 CP-G の抗菌スペクトラム

試 験 菌	MIC (mcg/ml)	
	CP-G	CP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	25
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	1.6	3.2
<i>Escherichia coli</i> B	3.2	3.2
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	12.5*	12.5*
<i>Salmonella paratyphi</i> A	12.5	6.2
<i>Salmonella paratyphi</i> B	12.5	12.5
<i>Salmonella enteritidis</i> Gaertner	12.5	12.5
<i>Salmonella dysenteriae</i> E-1	12.5	12.5
<i>Shigella flexneri</i>	12.5	12.5
<i>Shigella sonnei</i> E-33	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209 P	12.5	12.5
<i>Staphylococcus albus</i>	12.5	12.5
<i>Staphylococcus citreus</i>	12.5	12.5
<i>Micrococcus flavus</i>	6.3	3.2
<i>Sarcina lutea</i>	6.3	3.2
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 1001	6.3	3.2
<i>Vibrio comma</i> (A)	1.6	1.6
<i>Vibrio comma</i> (B)	1.6	1.6
<i>Staphylococcus aureus</i> (患者分離株)	12.5	12.5

寒天希釈塗抹法 (pH 6.5)

* 10% 血液加寒天培地 (pH 7.0)

表 2 薬剤耐性 *Staphylococcus* に対する各種薬剤の抗菌力

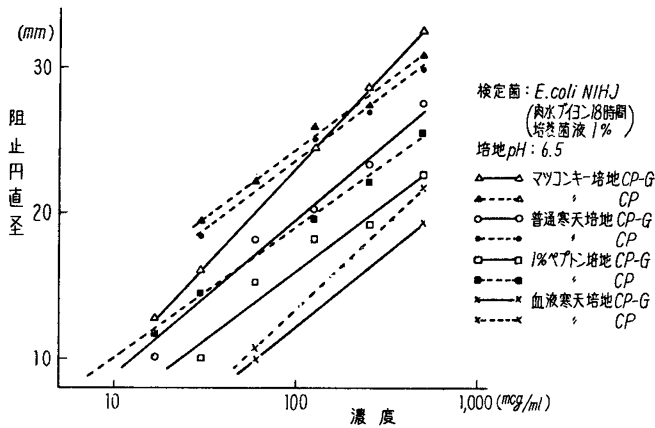
MIC(mcg/ml)

株番号	耐性型	PC-G	CP	SA*	PC	SM	TC	EM	LM	OM	KM	NB	DMP*
2844	SA, SM	6.3	6.3	40	<0.07	50	50	0.035	0.07	0.07	<0.07	—	0.15
2857	SA, PC, SM, TC, EM, LM, OM	12.5	12.5	100	100	50	25	100	25	25	0.15	—	0.3
2865	SA, PC, TC, EM, LM, OM, CP	100	100	50	100	0.350	100	25	25	0.3	—	—	0.15
2896	SA, PC, KM	50	50	200	0.6	3.2	0.15	0.035	0.07	0.07	25	—	0.15
2869	SA, SM, TC	12.5	12.5	12.5	<0.07	12.5	6.3	0.035	0.07	0.07	0.15	—	0.15
2836	SA, PC, EM, LM, OM, NB	12.5	12.5	50	50	0.8	3.2	0.8	3.2	25	0.15	0.8	0.8
2829	SA, PC	1.6	3.2	12.5	0.3	0.8	0.035	0.035	0.15	0.15	0.07	—	0.15
2803	SA, PC	1.6	3.2	12.5	3.2	3.2	0.15	0.035	0.07	0.07	0.3	0.04	0.8
2868	CP	12.5	12.5	3.2	<0.07	0.3	0.3	—	<0.07	<0.07	0.15	—	0.15
2846	SA, PC, TC	3.2	3.2	300	100	0.850	—	0.035	0.035	0.035	0.035	—	0.15
Yoshioka	TC, SM, CP, PC, EM	12.5	6.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Yonemoto	EM, CP	12.5	12.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

寒天希釈塗抹法 (pH 6.5)

* A: サルファ剤, DMP: Dimethoxyphenyl penicillin

図1 CP-Gの各種培地における検定曲線



重層法, paper disc 法, cup 法について行なつた。重層法は家兎血液 10% 加普通寒天培地を, paper disc 法は菌層 10 ml の普通寒天培地を, cup 法は基層 20 ml, 菌層 4 ml の普通寒天培地を用い, 各 pH 6.5 の培地で重層法は *Streptococcus S-23*, cup 法および paper disc 法は *E. coli NIHJ* 株の各試験菌の標準曲線を作成した。

(2) 実験成績

a) CP-G の諸種細菌に対する抗菌スペクトラム

試験菌に対する CP-G の最小発育阻止濃度を CP のそれと比較したが, 表 1, 表 2 のようにその抗菌力はほぼ同様であつた。

b) 培地組成の検討

マッコンキー培地での試験菌発育阻止帯は比較的明瞭で判定が容易であるが, 低濃度での測定が困難である。血液寒天および 1% ペプトン加寒天培地においては, 再現性に劣る。普通寒天培地においては, マッコンキー培地にくらべて, 標準曲線の傾斜がゆるやかであるが, 低濃度での測定が可能であつた。

c) 培地 pH の検討

図 2 に示したように, 培地 pH が高くなるにつれて阻止円が大きくなつた。しかし pH 8.0, 9.0 では pH 6.5 に比して再現性が劣つた。

d) CP-G の力価測定法の検討

図2 CP-G検定用培地 pH の検討

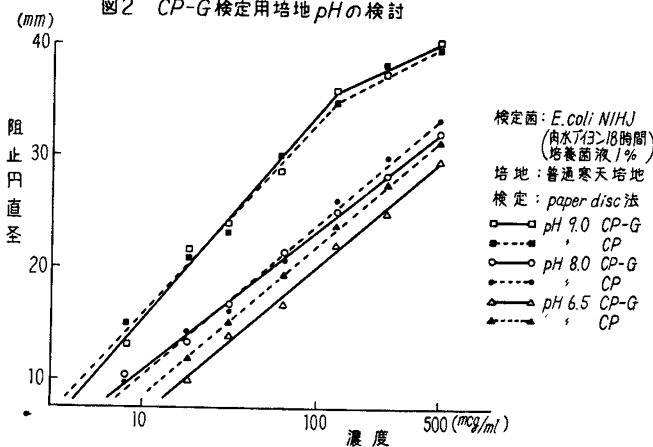


図3 CP-G 検定法の比較

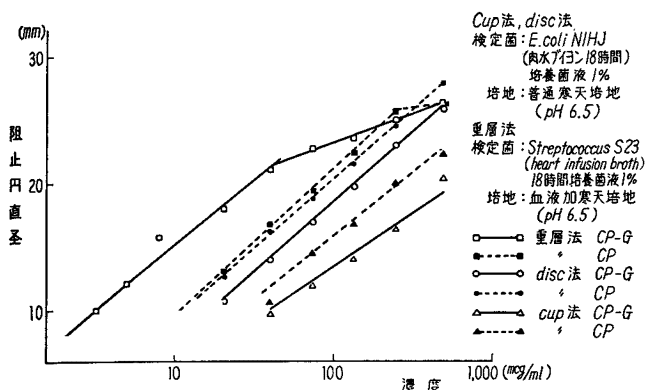


図3に示したように、重層法がもつとも感度はよいが、再現性に劣る。Disc 法は低濃度から高濃度まで、比較的安定した値を示し再現性がすぐれていた。

E. coli NIHJ 株を試験菌とし、普通寒天培地を用いて paper disc 法で検定した場合、CP 100 mcg/ml に相当する CP-G の量は、pH 6.5 で 175 mcg/ml、pH 8.0 で 130 mcg/ml、pH 9.0 で 114 mcg/ml であった。

(3) 小括

抗菌スペクトラムについては、感受性菌、諸種薬剤耐性 *Staphylococci* に対して、CP-G と CP との差がほとんど認められなかつた。

また CP-G の検定条件としては、*E. coli* NIHJ 株を試験菌とし、普通寒天培地 pH 6.5 で paper disc 法が最適であると考えられる。

In vivo における CP-G の抗菌力試験

(感染治療実験)

In vitro の抗菌力試験により、CP-G は CP とほぼ同程度の抗菌力を示すことを認めたので、次に動物感染実験により、*in vivo* の抗菌力を検討した。

(1) 実験方法

a) 感染菌

研究室保存の *Diplococcus pneumoniae* Type III (*D. pneumo.* III と略す) を用い、使用前に、マウスを6回通過させて毒力を高めたものを用いた。菌の毒力は、腹腔内注射での LD₅₀ が 2×10^8 /ml (4~5 日で死亡) であった。

なお *D. pneumo.* III に対する CP-G の最小発育阻止濃度は、表1に示したように、10%血液加寒天培地 (pH 7.0) において 12.5 mcg/ml であった。CP も同値であった。

b) 使用動物

体重 20 g 前後の健康な dd 系雌性マウスを1群5匹で使用した。

c) 感染

10% 血液加普通寒天培地に18時間培養した *D. pneumo.* III の1白金耳量を20%馬血清加 heart infusion broth (Difco) 中で18時間培養したものを 10^{-8} 希釈して、 5×10^6 /ml に調整し、その 0.2 ml ($5 \times LD_{50}$) をマウスの腹腔内に接種した。

d) 治療

1群5匹ずつのマウスに菌を接種後2時間目から治療を開始した。投与方法は、経口投与 (p.o.)、筋肉内注射 (i.m.)、静脈注射 (i.v.) の各経路で行なつた。

薬剤の投与は、菌接種後2時間目から4時間間隔で7回行ない、さらに最終投与 (7回目) から18時間後に追加投与1回を行なつた。

投与量の全量は、経口投与群で 750, 375, 187, 93, 46 mg/kg とし、筋肉内および静脈注射群はそれぞれ 375, 187, 93, 46, 23 mg/kg とした。

e) CP-G の急性毒性試験

感染治療実験における CP-G の投与量を決定する参考資料として、また安全係数を求めるために、ラットおよびマウスに対する LD₅₀ を測定した。観察は72時間とし、Witchfield-Wilcoxon 法⁹⁾によつて LD₅₀ を算出した。

表3 CP-G のマウス感染治療実験

投与経路	50% 治療量 (CD ₅₀) (mg/kg)	
	CP-G	CP
P. O.	400~420	360~420
I. M.	180~230	220~230
I. V.	—*	—*

感染菌: *Diplo. pneumo.* III (感染量: $5 \times LD_{50}$)

* 375 mg/kg 以上で薬物の毒性効果が現われる

表4 CP-G の急性毒性 (LD₅₀, mg/kg)

被験動物 投与方法	LD ₅₀ (mg/kg)		
	マウス*	ラット*	ウサギ**
静脈注射	♂ 275	♂ 284	♂ 189
	♀ 246	♀ 309	—
皮下注射	♂ 1610	♂ 1620	—
	♀ 2080	♀ 1931	—
筋肉内注射	♂ 2470	♂ >2856	—
	♀ 2510	♀ >2856	—

* Litchfield-Wilcoxon 法⁹⁾により算出

** Up and down 法⁹⁾により算出

(2) 実験成績

a) 治療成績

治療開始後 20 日目の延命率から probit 法によつて median curative dose (LD₅₀) を求めて、治療効果の判定を行なつた (表 3)。また、治療開始後 20 日までの延命状況を図 4 に示した。なお、無処置対照群は菌接種後 4 日目以内に全部死亡した。

b) 急性毒性試験

CP-G のラットおよびマウスに対する LD₅₀ 値は表 4 に示すとおりである。LD₅₀ 値付近の投与量における中毒症状は次のようであつた。すなわち、マウスにおいては呼吸抑制、四肢失調がみられ、一時的には外因の刺激に対する反応性が亢進した。ラットの場合もほぼ同様、呼吸抑制、興奮症状を示し、痙攣をおこし後肢伸展強直して死亡するものがあつた。

c) 安全係数

CP-G の安全係数を次の式から求め、CP のそれと比較したところ、ともに 10 以上であつた。

$$\text{安全係数} = \frac{\text{LD}_{50}}{\text{CD}_{50}}$$

(3) 小括

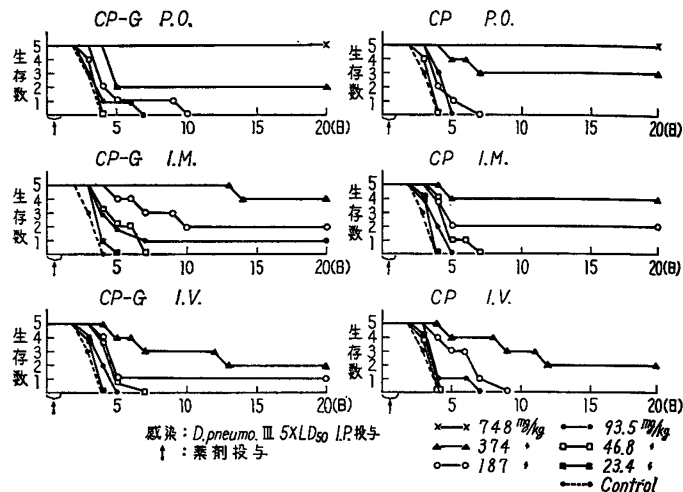
D. pneumo. III を感染させたマウスに対して CP-G と CP との延命効果を比較した場合、静脈注射および筋肉内注射において 187 mg/kg, 93 mg/kg では、CP-G のほうがすぐれていることを認めた。なお、静脈注射において 375 mg/kg 以上では薬物の毒性が出るので、CD₅₀ を正確に算出しえないが、187 mg/kg 以下の延命効果を筋肉内注射の場合と比較して推定すると、375 mg/kg 以上でも筋肉内注射とはほぼ同様の治療効果があると考えられる。

考 察

CP-G の *in vitro* の抗菌力を CP と比較した場合、両者ほとんど差がなかつたが、これは星野ら⁷⁾の成績によれば、pH 6.5 において、かなりの量の CP-G が CP と glycine に分解しているの、CP-G と CP との抗菌力の差はでないのが当然ともいえる。しかし *in vivo* の実験では、CP-G の効果は CP よりもすぐれていると考えられるので、CP-G は水溶性 CP として静注用あるいは筋注用に広く用いるものと考えられる。

総 括

(1) 水溶性 chloramphenicol 誘導体として開発された chloramphenicol-glycinate の *in vitro* の抗菌力は chloramphenicol とほぼ同等であつた。

図 4 *Diplococcus pneumoniae* III 感染防禦試験 (マウス)

(2) Chloramphenicol-glycinate の *in vivo* の抗菌力は、*Diplococcus pneumoniae* III 感染マウス生存率でみた場合、chloramphenicol よりやや良好であつた。

表 2 作成にあつて群馬大学医学部微生物教室 三橋進教授より諸種薬剤耐性菌を分与たまつたことを感謝いたします。

文 献

- 1) CONCILIO, C. *et al.*: Su un nuove idrosolubile del cloramfenicolo. *Il Farmaco*, Ed. sci. 11: 10, 1956
- 2) CONCILIO, C. *et al.*: Prime ricerche chimiche e farmacologiche sul glicinato di cloramfenicolo. nuovo estere idrosolubile dell'antibiotico. *Giorn. Malat. Infett. e Parassit.* 10(9): 845, 1958
- 3) DELUCA, G. *et al.*: Il cosi detto "Reffreddamento" pre-operatorio nell' empiema cronico tubercolare. *Giorn. Pneumol.* 5(4): 459, 1961
- 4) PIOVANELLI, G.: Considerazione sul trattamento delle meningiti purulente dell'infanzia con impiego per via endorachidea del cloramfenicolo glicinato. *Min. Ped.* 17(31): 1665, 1965
- 5) EMILIANI, G.: L'impiego della microclorina glicinato, nuove derivato idrosolubile del cloramfenicolo, nel trattamento aerosolico delle rino-sinusopatie infiammatorie acute e subacute (Note di terapie). *Clin. Otorinolaringo. Ital.* 26(6): 495, 1958
- 6) LITCHFIELD, J. T. *et al.*: *J. Pharmacol.*, 96: 99, 1949
- 7) 星野保夫, 他. *Chemotherapy* 17(8): 1588~1592, 1969
- 8) DIXON, W. J. *et al.*: *J. Amer. Statist. Assoc.* 43: 109, 1948

BIOLOGICAL STUDIES ON CHLORAMPHENICOL-GLYCINATE. I
ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY

YASUO HOSHINO, AKIRA MIYAKE, SHIGEYUKI YOKOIYAMA,
DAISHIRO HASEGAWA and KAZUO HAYANO

Research Laboratories, Toyo Jozo Co. Ltd. (Director : Dr. JINNO SUKE ABE)

1. Chloramphenicol-glycinate (CP-G) which has been researched as a water soluble chloramphenicol-ester in Italy indicated the antibacterial activity as well as chloramphenicol (CP) *in vitro* to 20 strains of CP sensitive bacteria and to 12 strains of CP resistant staphylococci.

Suitable condition of microdetermination method of CP-G was studied.

2. In the examination *in vivo*, CP-G reveals longer survival time than that of CP, when they are injected intramuscularly to mice infected with *Diplococcus pneumonia* III strain.