

## Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討 第1報

*In vitro* 抗菌力および感染動物に対する治療効果

金 政 泰 弘・吉 岡 智 子

岡山大学医学部微生物学教室

金 沢 保・河 部 靖・佐 藤 勝

藤 田 孟・山 本 伸 郎

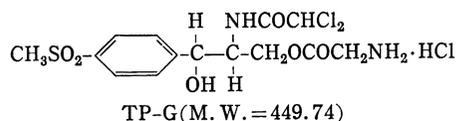
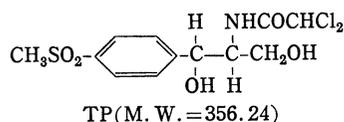
エーザイ株式会社研究本部薬理研究所

(昭和 44 年 4 月 17 日受付)

著者らは Chloramphenicol(CP) の NO<sub>2</sub>-基が CH<sub>3</sub>・SO<sub>2</sub>-基で置換された型の新しい化学療法剤 Thiamphenicol(TP) につきその抗菌力ならびに動物の実験的感染症に対する治療効果, さらに生体内動態につき種々基礎的検討を加えた結果, TP は CP のように生体内で不活化されることが少なく大部分が抗菌性のある TP 自体として排泄され, 各種感染症の治療薬として効果が期待されることを報告した。

今回さらにTPの水溶性誘導体で注射が可能な Thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) につき種々な観点から化学療法剤としての基礎的検討を加えること

ができたので, 本報ではまず *in vitro* 抗菌力ならびに感染動物に対する治療成績をとりまとめてここに報告する。

表1 TP-G, TP, CP および CP-S の *in vitro* 抗菌力 (MIC(mcg/ml))

pH	Sample	6.0				7.0			
		TP-G	TP	CP	CP-S	TP-G	TP	CP	CP-S
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P(JC-1)	25	12.5	6.25	100	12.5	12.5	6.25	100
	<i>Staphylococcus albus</i> 80	50	12.5	6.25	100	12.5	25	6.25	100
	<i>Streptococcus hemolyticus</i> Y-73-5	3.13	3.13	1.56	25	3.13	3.13	1.56	50
	<i>Micrococcus flavus</i> PCI 1216	12.5	3.13	1.56	25	6.25	6.25	1.56	25
	<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	6.25	6.25	1.56	25	6.25	6.25	1.56	25
	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	12.5	12.5	6.25	50	12.5	12.5	3.13	50
	<i>Escherichia coli</i> NIHJ (JC-1)	400	100	6.25	100	200	100	12.5	100
	<i>Escherichia coli</i> O-111	400	100	6.25	100	100	100	12.5	100
	<i>Escherichia coli</i> K-12	200	100	6.25	100	100	50	3.13	50
	<i>Shigella flexneri</i> 2 a	3.13	1.56	1.56	25	3.13	3.13	3.13	50
	<i>Shigella flexneri</i> 3 a	6.25	3.13	3.13	25	3.13	1.56	1.56	25
	<i>Shigella sonnei</i> 1922	6.25	3.13	6.25	50	6.25	3.13	6.25	50
	<i>Shigella sonnei</i> MATSUNAGA*	>1600	>1600	800	>1600	>1600	>1600	800	>1600
	<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	50	50	12.5	100	50	50	12.5	100
	<i>Salmonella paratyphi</i> A 1015	50	25	6.25	100	25	25	6.25	100
	<i>Salmonella paratyphi</i> B 8006	25	12.5	1.56	50	25	12.5	1.56	25
	<i>Salmonella pullorum</i>	25	25	1.56	50	25	12.5	3.13	50
	<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	25	12.5	6.25	50	12.5	6.25	6.25	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A 3	1600	400	800	>1600	800	400	400	>1600

\* 多剤耐性赤痢菌

I. *In vitro* における抗菌力

TP-G が TP と同様に *in vitro* においても抗菌力が見られること、また最小発育阻止濃度 (MIC) も両者の間にほとんど差が見られないことは著者ら<sup>1)</sup>がすでに報告したとおりである。本報ではさらに pH の変化にともなう TP と TP-G, CP, および Chloramphenicol succinate (CP-S) の相互間に MIC に差が見られるかどうかを精査する目的で培地の pH をそれぞれ 6.0, 7.0, 8.0 および 9.0 に補正して検討した。

抗菌試験は日本化学療法学会効果判定基準会 MIC 小委員会<sup>2)</sup>で決定した標準法<sup>2)</sup>に従った。

すなわち、増菌用培地は Trypticase Soy Broth (BBL) を使用し 37°C に 22 時間培養した菌液を薬剤含有の Heart Infusion Agar 培地 (Difco) に内径 1 mm の白金耳を用いて 2 cm 画線塗抹し、37°C に 18 時間培養後 MIC を判定した。この結果を、表 1 に示した。

表 1 の成績から見ると、TP-G に限らず、TP, CP, CP-S いずれも抗菌力は pH 6.0 の場合よりアルカリ側のほうが強い。TP-G の場合 pH 6.0 では TP と若干の差が認められたのに対し、pH 9.0 のときには全く同等の抗菌力といえる。

このことは著者ら<sup>1)</sup>が検討した結果より培地中で容易に TP-G がアルカリ側で加水分解を受け TP となり抗菌

力を発現したものといえる。さらにこの事実は LANZA<sup>4)</sup> が TP-G 水溶液の加水分解速度を検討した際にもアルカリ側に傾むくに従って分解が促進し TP になるという報告からも推測できることである。これに反し、CP-S は CP と比較し pH 9.0 でも抗菌力がかなりおとることは *in vitro* では加水分解を受けにくいものと考えられる。

TP-G は TP と同様にグラム陽性菌、陰性菌いずれの菌種にも抗菌性が強いが多剤耐性菌には交叉耐性が見られた。

TP-G の血清蛋白共存下における *in vitro* 抗菌力は、表 2 に示すように、馬血清を 10% 添加した範囲内では TP の場合と同様に無添加時に比較して抗菌力の低下は見られない。

方法は前記の試験培地に 10% の割合で馬血清を添加し標準法<sup>2)</sup>に従って実施した。

II. *In vitro* における耐性上昇の速さ

TP-G を含有する平板培地上で菌が薬剤に対する MIC の上昇する度合を累代継代法によってしらべた成績は、表 3 に示したとおりである。試験法は前述の標準法<sup>2)</sup>に

表 2 10% 馬血清加培地における TP-G の抗菌力 (pH 7.4) (MIC (mcg/ml))

Test organisms	Sample	
	TP-G	TP
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P(JC-1)	12.5	12.5
<i>Salmonella typhimurium</i> 1406	25	25

8.0				9.0			
TP-G	TP	CP	CP-S	TP-G	TP	CP	CP-S
12.5	12.5	6.25	100	12.5	12.5	6.25	50
25	12.5	3.13	50	25	50	6.25	50
3.13	3.13	1.56	25	3.13	3.13	0.78	25
6.25	3.13	0.78	25	3.13	3.13	1.56	12.5
6.25	3.13	1.56	25	3.13	3.13	0.78	12.5
12.5	6.25	3.13	50	12.5	6.25	3.13	25
100	100	12.5	100	50	50	6.25	50
50	50	6.25	50	12.5	12.5	3.13	25
25	25	3.13	50	6.25	12.5	1.56	12.5
1.56	1.56	1.56	25	1.56	1.56	1.56	12.5
1.56	1.56	1.56	12.0	1.56	1.56	7.78	6.25
3.13	3.13	3.13	50	3.13	1.56	3.13	25
>1600	>1600	800	>1600	>1600	>1600	400	>1600
25	25	6.25	100	25	6.25	3.13	50
12.5	12.5	6.25	100	6.25	6.25	1.56	12.5
12.5	12.5	1.56	12.5	6.25	6.25	3.13	25
12.5	6.25	3.13	25	6.25	3.13	3.13	12.5
12.5	12.5	1.56	25	6.25	6.25	1.56	12.5
400	400	400	>1600	200	200	200	1600

表 3 *In vitro* 耐性上昇試験 (MIC (mcg/ml))

継代数	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P(JC-1)			<i>Shigella sonnei</i> 1922		
	TP-G	TP	CP	TP-G	TP	CP
1	12.5	12.5	6.25	6.25	3.13	6.25
2	12.5	6.25	3.13	12.5	6.25	6.25
3	12.5	12.5	6.25	50	12.5	12.5
4	12.5	12.5	6.25	25	12.5	25
5	12.5	12.5	6.25	25	25	25
6	25	12.5	6.25	50	25	25
7	25	25	6.25	50	50	25
8	25	12.5	12.5	100	50	25
9	25	12.5	6.25	100	50	50
10	25	25	12.5	100	50	50
11	25	25	12.5			
12	50	25	12.5			
13	50	25	12.5			
14	50	50	12.5			
15	50	50	12.5			

もとずいて実施した。

表3の結果から、TP-GはTPまたはCPと全く同様に *in vitro* の耐性上昇はゆるやかでこれら3者の間に耐性獲得の遅速を論ずるほどの差は認められない。

III. 感染動物に対する治療効果

1. 肺炎双球菌感染マウスに対する治療効果

体重  $19 \pm 1$  g の dd 系マウス(♂)を1群に10匹使用した。試験菌は *Diplococcus pneumoniae* DP-3 5 A (type 3) を血液寒天培地上に継代したものより1白金耳量を肉汁ブイヨン 5 ml に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  に18時間培養したものを菌原液とした。この菌原液を生理食塩水で10倍希釈系列を作成し、 $10 \text{ LD}_{50}$  に相当する毒力の菌液 0.2 ml ずつをマウスの腹腔内に接種した。

TP-G ならびに対照とした CP-S は菌接種1時間後

図1 肺炎双球菌感染マウスに対する治療効果

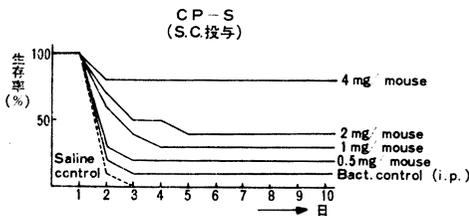
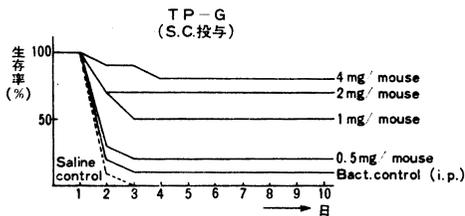


図2 溶血性連鎖球菌感染マウスに対する治療効果

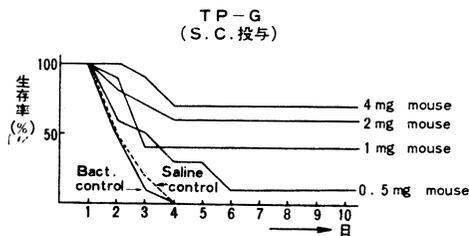


図3 腸炎菌感染マウスに対する治療効果

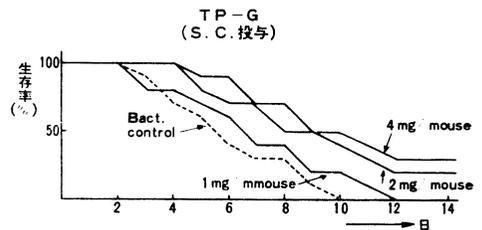
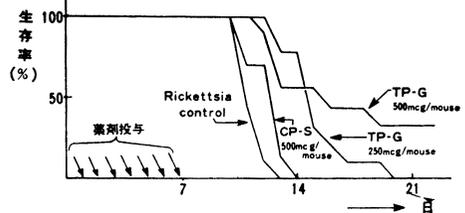


図4 つつが虫病リケッチア感染マウスに対する治療効果



にそれぞれ TP および CP としての換算量をマウス背部皮下に1回投与を行ない毎日生死を観察して生存率を求めた。その成績を、図1に示した。

2. 溶血性連鎖球菌感染マウスに対する治療効果

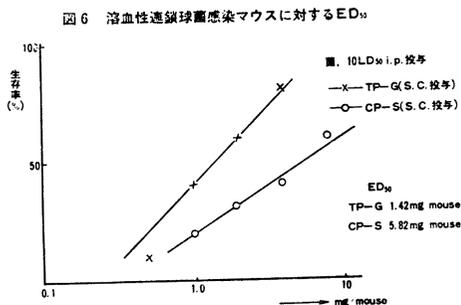
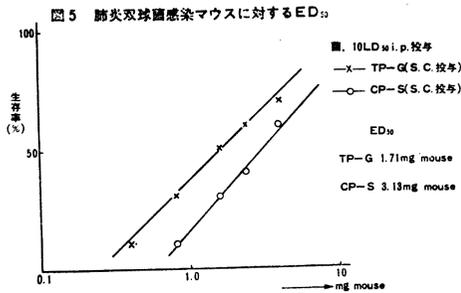
実験動物、試験菌液の調製法および薬剤の投与は前記肺炎双球菌による実験のときと同じように実施した。試験菌は *Streptococcus pyogenes* E<sub>14</sub> (group A, type 10) を使用し  $10 \text{ LD}_{50}$  の毒力の菌液 0.2 ml をマウスの腹腔内に接種した。この成績を、図2に示した。

3. 腸炎菌感染マウスに対する治療効果

実験動物ならびに実験方法については前記の諸感染実験の場合と同じである。ただしマウスの体重は  $20 \pm 1$  g のものを、試験菌は *Salmonella enteritidis* No. 11 株を使用し、毒力  $10 \text{ LD}_{50}$  に相当する菌液を腹腔内に接種した。本実験による成績を、図3に示した。

4. つつが虫病リケッチア感染マウスに対する治療効果

体重  $20 \pm 1$  g の dd 系マウス(♂)を1群に10匹使用した。試験菌は *Rickettsia tsutsugamushi* KATO 株を卵黄囊馴化したものの乳剤を生理食塩水で希釈し  $100 \text{ LD}_{50}$  に相当する毒力の菌液 0.25 ml をマウスの腹腔内に接種する。接種24時間後より TP-G (TP換算で500および250 mcg/mouse) および対照として CP-S (CP換



算で 500 mcg/mouse) を毎日 1 回連続 7 日間 マウス背部の皮下に投与し、その治療効果を感染後 21 日目まで観察してその生死を判定した。その成績を、図 4 に示した。

生存したマウスについては直ちに屠殺、肝臓および脾臓をとり出し生理食塩水で薬剤とし、それを次代のマウスに接種してそのリケツチア量を測定した。その結果、力価は  $10^{2.5} LD_{50}$  を示し治療実験で生存したマウスにはリケツチアが殺滅されずに生存していることが確認された。

#### 5. 感染マウスに対する ED<sub>50</sub> の検討

著者らは前述のように病原細菌感染マウスに対し TP-G の治療効果 (生存率) につき CP-S と比較検討したが、これをもう 1 歩精査する目的で肺炎双球菌ならびに溶血性連鎖球菌感染マウスに対する ED<sub>50</sub> を算出することとした。

実験方法は前記感染治療実験の項に示したのと同様で、体重  $17 \pm 1$  g の dd 系マウス (♂) を 1 群に 10 匹使用し菌株は *Diplococcus pneumoniae* DP-35A (type 3) および *Streptococcus pyogenes* E<sub>14</sub> (group A, type 10) の菌希釈液 (10 LD<sub>50</sub> に相当) 0.2 ml を腹腔内に接種した。薬剤は菌接種 1 時間後にマウス背部皮下に 1 回投与して各濃度における 10 日目の生存率を求め、LITCHFIELD-WILCOXON 法により ED<sub>50</sub> を算出した。その成績をそれぞれ、図 5 および図 6 に示した。

#### 6. 感染実験に対する考察

図 1 および図 2 の結果から、肺炎双球菌、溶血性連鎖

球菌感染マウスに対しては TP-G は CP-S と同量を皮下注射した場合を比較すると同等またはそれ以上の治療成績を有することがわかった。また腸炎菌感染マウスでの成績 (図 3) では菌対照が 10 日で全例死亡するため薬剤投与群では 14 日目まで観察したが TP-G と CP-S との間に差はほとんど見られなかった。

リケツチア感染マウスの場合は TP-G と CP-S では治療効果に明らかな大差が見られた。すなわち、感染後 7 日間の連続投与の結果、TP-G では感染後 3 週間でも 50% が生存しているのに対し CP-S の効果は菌対照の死亡率とほとんど差がない程度にわく感染後 13 日で全例が死亡した。すなわち、リケツチア感染マウスに対しては TP-G のほうが CP-S よりかなりすぐれた治療効果が認められた。ただし生残ったマウスの肝臓ならびに脾臓中にはリケツチアが殺滅されずに生存していることが確認された。従がつて TP-G のリケツチアに対する作用は rickettsiacidal ではなく static に働くものと思われる。

感染実験の成績をさらにうらずける ED<sub>50</sub> の成績として肺炎双球菌感染マウスに対して TP-G が 1.71 mg/mouse、CP-S は 3.13 mg/mouse、溶血性連鎖球菌感染マウスには TP-G が 1.42 mg/mouse、CP-S は 5.82 mg/mouse を示し、これらの値から推計学的にも TP-G は CP-S より有意 ( $p=0.05$ ) であることを認めた。

#### IV. 結 語

新しい化学療法剤 TP-G の *in vitro* における抗菌力ならびに細菌およびリケツチア感染マウスに対する治療効果を検討した。その結果は、

- 1) TP-G は *in vitro* で TP と同様に抗菌力を示し、この抗菌作用はアルカリ側に移行するに従がつて強くなることが判明した。また *in vitro* における耐性上昇の度合を累代継代法で検討した成績では TP-G は TP および CP と同様にゆるやかであることがわかった。
- 2) 肺炎双球菌、溶血性連鎖球菌、腸炎菌、さらにつづが虫病リケツチア感染マウスに対し TP-G を皮下投与した場合、対照とした CP-S よりすぐれた効果を示し、ED<sub>50</sub> の成績からも TP-G は CP-S と比較して推計学的にも有意差 ( $p=0.05$ ) が認められた。

#### 文 献

- 1) 河部 靖, 金政泰弘, 金沢 保, 山本伸郎, 滝本義一, 宮本淳子, 池田友久, 大熊晴男: 新化学療法剤 Thiophenicol の基礎的検討。Chemotherapy 14: 421, 1966
- 2) 日本化学療法学会効果判定基準研究会 MIC 小委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法の標準化について。Chemotherapy 16: 98, 1968
- 3) 金沢 保, 河部 靖, 佐藤 勝, 藤田 孟, 山本

伸郎, 金政泰弘: Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討, 第2報。Thiamphenicol glycinate hydrochloride から Thiamphenicol への解離。Chemotherapy: 投稿中

4) LANZA, P.: L'idrolisi alcalina di esteri basici del tiofenicolo. Farmaco (Ed. Prat.) 16: 196, 1961

## BASIC STUDIES ON THIAMPHENICOL GLYCINATE HYDROCHLORIDE (I)

*In vitro* antimicrobial activities and effects on infected animals of  
thiamphenicol glycinate hydrochloride

YASUHIRO KANEMASA and TIEKO YOSHIOKA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

TAMOTSU KANAZAWA, KIYOSHI KAWABE, MASARU SATO,

TAKESHI FUJITA and SHINRO YAMAMOTO

Department of Pharmacology, Eisai Research Laboratories

A study was made on thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G), a new chemotherapeutic, as to the effect on *in vitro* bacterial growth as well as the therapeutic effect on the mice infected with pathogenic bacteria. The results were summarized as follows.

1) It has been found that TP-G has same *in vitro* activities as thiamphenicol (TP). And it is assumed that antimicrobial activity of TP-G is elicited because it readily undergoes hydrolysis and is converted to TP.

2) The therapeutic effects of TP-G have been proven to be even superior to those of chloramphenicol succinate (CP-S) on the mice infected with various pathogenic bacteria and rickettsia, when administrated subcutaneously.