

Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride の基礎的検討 第2報

Thiamphenicol glycinate hydrochloride から Thiamphenicol への解離

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

金 政 泰 弘

岡山大学医学部微生物学教室

(昭和 44 年 4 月 17 日受付)

Thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) は Thiamphenicol (TP) の glycine ester 塩酸塩で水に対する溶解性がすぐれ注射剤として好適である。しかも著者ら^{1,2)}が *in vitro* 抗菌性を検討した際、TP-G にも TP 同様に強い抗菌力を有することが明らかとなった。しかし、この *in vitro* 抗菌力は TP-G 自体の化学構造によるものか、また試験時の条件では容易に加水分解をうけ TP に解離するため抗菌力を発現するのか、文献的にも詳細に検討したものは見られない。

従がつて著者らは本報でこの点に関し精査を行なった。

I. Buffer 中における TP-G の変化

LANZA³⁾ は TP-G が水溶液の状態では容易に加水分解をうけ TP に変化することを各 pH における加水分解速度を測定して証明している。著者らはこの事実を明らかにする手段として試料を一定温度下に保存したものを経時的に薄層クロマトグラフィー (TLC) にかけたのち発色試薬で確認することにより鮮明に加水分解の経過を捕捉することができた。

まず TP-G 水溶液中の水解物としては TP のほかに glycine, さらに少量と予想はされるが TP より脱アシルした型の amine (TP-NH₂) が考えられる。従がつて TLC におけるこれら標品の R_f 値を確認するためそれぞれ単独ならびに 4 者を混合して TLC を行なった結果を、図 1 に示した。

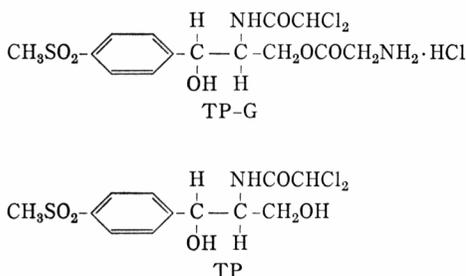
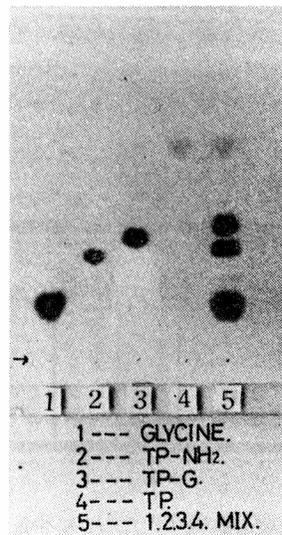
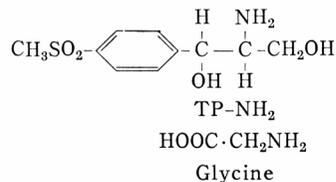


図 1 TP-G, TP, TP-NH₂ および Glycine の R_f 値



	R _f 値
Glycine	0.25
TP-NH ₂	0.39
TP-G	0.45
TP	0.80

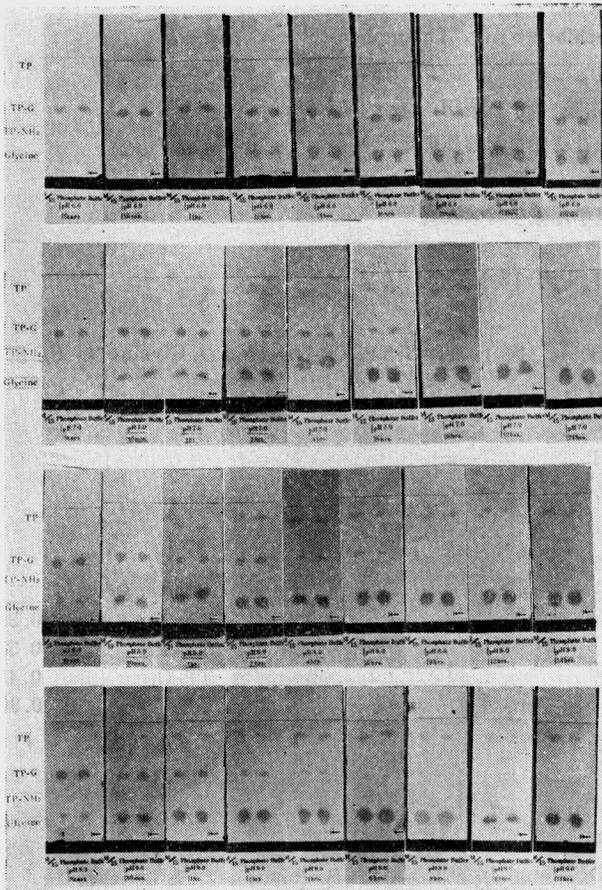
矢印は原点を示す



TLC の実験条件としては M/15 phosphate buffer (pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) に TP-G を溶解させ 5 mg/ml の溶液をつくる。これを 37°C に保存し 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 12 および 24 時間後に 0.01 ml (50 mcg) ずつそれぞれ薄層板にスポットした (原点)。吸着板は Kieselgel G (厚さ 0.25 mm), 展開溶媒は酢酸 : n-ブタノール : 水 (1 : 4 : 5) 混液, 発色試薬は 0.5% ニンヒドリン-ブタノール溶液を使用した。各 pH のそれぞれの時間における TP-G の加水分解過程を、図 2 に示した。

図 2 の諸成績から、TP-G は 37°C で比較的容易に加

図 2 各 pH の M/15 Phosphate Buffer 中における TP-G の変化



水分解をうけて glycine を遊離し TP ならびに少量の TP-NH₂ を生じ、この傾向は pH がアルカリ側に傾くにつれて顕著になることが明らかとなった。

II. 培地中における TP-G の変化

著者ら^{1,2)}が TP-G の抗菌力を検討した際、TP-G は TP とほとんど同等の *in vitro* 抗菌性を示したが、これは TP-G が培地中で簡単に加水分解を受けた結果 TP を生じ、そのために抗菌性を示したのではないかと考えられる。この点を検討する目的をもって著者らは TP-G の Heart Infusion Broth (Difco) (pH をそれぞれ 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に補正) 中における加水分解の経過を bioautography で追跡した。実験方法は前記各 pH の broth に TP-G を 5 mg/ml となるように溶解し 37°C に保存、0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 12 および 24 時間後に 0.01 ml (50 mcg) ずつ薄層板にスポットして TLC を行ない、展開溶媒を完全に除去したのちに bioautography の操作に移した。吸着板は Kieselgel G (厚さ 0.25 mm)、展開溶媒は酢酸 : n-ブタノール : 水 (1 : 4 : 5) 混液を使

用した。

いつぼう、bioautography には 24×32×2 cm の平板容器を使用し、この中に *Bacillus subtilis* PCI 219 の孢子懸濁液 1.5% を含有した培地(L-アスパラギン 0.4%, クエン酸 0.2%, クエン酸第二アンモニウム 0.005%, ブドウ糖 0.8%, 第一リン酸カリウム 0.05%, 硫酸マグネシウム 0.7 H₂O 0.05%, 寒天 1.8%, アンモニア水で pH 7.0 に補正)200 ml を迅速に流して試験平板をつくり 3~5 時間 4°C に放置する。前記の TLC を行なつた薄層板を試験板上の滅菌ガーゼの上のせ、4°C に 3 時間拡散させたのちガーゼと共に薄層板を除去し、試験平板を 37°C に 16 時間培養する。培養が終れば 0.3% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride を加え、20 分間 37°C に保つて阻止円を明瞭にさせた。なお、あらかじめ bioautography で TP-G および TP 標品による阻止円の Rf 値の確認を行なつたものを、図 3 に、Heart Infusion Broth の pH がそれぞれ 6.0, 7.0, 8.0 および 9.0 において 37°C に保存した場合の TP-G の変化を、図 4 に示した。

この bioautography の成績からも TP-G を培地中で 37°C に保つたときは短時間で TP に変化することがわかり、この傾向は pH 7.0 以上のアルカリ側では、いつそう顕著で buffer の場合と同じ結果になることが判明した。

著者ら²⁾が第 1 報に報告した各 pH における抗菌力の成績ではアルカリ側に移行するにつれて TP-G と TP の *in vitro* 抗菌力が等しくなってくるということであつた。従がつてこれらの成績を対比して

図 3 TP-G および TP 阻止円の Rf 値 (Bioautography)

	Rf 値
TP-G	0.45
TP	0.80

Bacillus subtilis PCI 219 に対する阻止円で示す

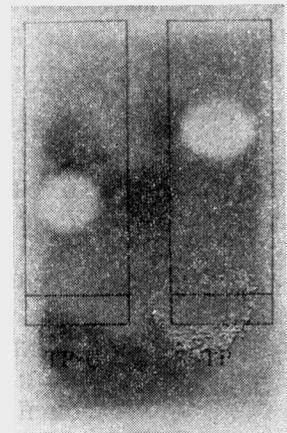
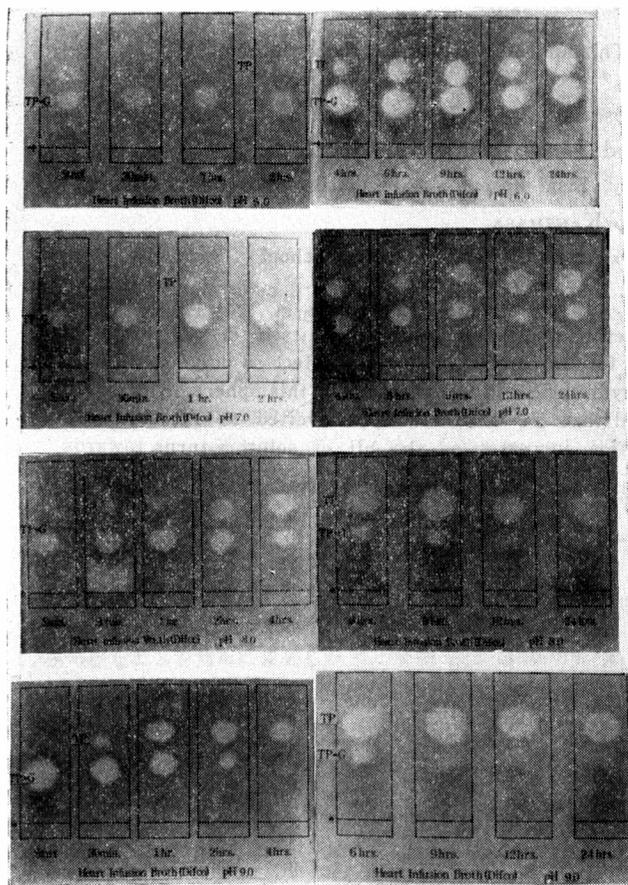


図4 各 pH の Heart Infusion Broth 中における TP-G の変化
(Bioautography)



考えると TP-G そのものには抗菌力がないが、37°C に長時間保たれている間に加水分解をうけて TP となり抗菌性を発現するものと推察できる。

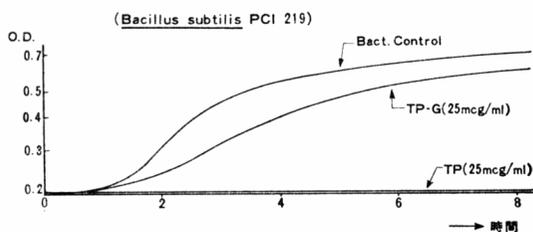
III. 細菌の発育曲線におよぼす TP-G の影響

TP-G そのものの *in vitro* 抗菌力を精査する場合、細菌増殖の対数期に TP-G および TP を添加して発育曲線におよぼす影響を比較するとき、短時間で、すなわち TP-G が TP に変化しないうちにある程度の明確な結果を得られる可能性があると考え、以下のような実験を行なった。

Bacillus subtilis PCI 219 株の胞子懸濁液 (1.2×10^7 cells/ml) を Heart Infusion Broth (pH 6.0) を加え全量 8 ml (1.5×10^5 cells/ml) とし 37°C に Biophotometer (Jouan 製) で培養し対数期の菌を使用した。

薬剤含有 (TP-G, TP それぞれ 200 mcg/ml) の Heart Infusion Broth (Difco, pH 6.0 に補正) 1.0 ml, 前記試験菌液 0.1 ml, Heart Infusion Broth 6.9 ml を加えて全量を 8.0 ml とし Biophotometer を使用して発育

図5 TP-GおよびTPの細菌発育曲線におよぼす影響



曲線を求めた。

いつぼう、菌対照としては Heart Infusion Broth 7.9 ml に試験菌液 0.1 ml を接種したものを用いた。この実験成績を図5に示す。

図5の成績から、TP-G を含有した培養液は菌対照と比較すると発育曲線に若干の抑制は見られてもほとんど対照と変りないといえる。

これに対し TP を含有した培養液は全く発育を示さなかつた。このことから TP-G は培地中 (pH 6.0, 37°C) でわずかに加水分解をうけて TP を遊離したのか、また菌の産生するエステラーゼの影響をうけ一部加水分解して TP となりわずかに抑制の影響が出たのかは断定はむづかしいが、いずれにせよ TP-G そのものは抗菌力はほとんどないと結論できる。

IV. 結 語

著者ら²⁾が第1報で示したように、TP-G には *in vitro* でも TP と同等の抗菌力が見られた。これは TP-G 自体に抗菌力があるのか、または抗菌試験時に TP-G が加水分解をうけて TP となるため抗菌力を発揮したのか明らかでない。従がつて phosphate buffer 中、さらに培地中における TP-G の加水分解の経過を追跡した。また枯草菌を用いて発育曲線におよぼす TP-G の影響を TP と比較検討した。

これらの結果を総合すると、TP-G そのものには抗菌力はほとんどないが溶液では容易に加水分解をうけて TP となるため TP と同等の *in vitro* 抗菌力を示すものと結論できる。

文 献

- 1) 河部 靖, 金政泰弘, 山本伸郎, 金沢 保, 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) 金政泰弘, 吉岡智子, 金沢 保, 河部 靖, 佐藤勝, 藤田 孟, 山本伸郎: 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。Chemotherapy 18(6): 922~926, 1970
- 3) LANZA, P.: L'idrolisi alcalina di esteri basici del tiofenicolo. Farmaco (Ed. Prat.) 16: 196, 1961

BASIC STUDIES ON THIAMPHENICOL GLYCINATE
HYDROCHLORIDE (II)

Liberation to Thiamphenicol from Thiamphenicol Glycinate Hydrochloride

TAMOTSU KANAZAWA, KIYOSHI KAWABE, MASARU SATO,
TAKESHI FUJITA and SHINRO YAMAMOTO

Department of Pharmacology, Eisai Research Laboratories

YASUHIRO KANEMASA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

An attempt was made to solve the question whether the chemical structure itself of thiamphenicol glycinate hydrochloride (TP-G) can be accounted for its potent antibacterial effect *in vitro* or whether such an effect appears because TP-G undergoes hydrolysis and is converted to thiamphenicol (TP).

As a result of this study, it has been confirmed that TP-G is readily converted to TP either in buffer solution or in the medium, and the liberation increases as the pH of solution turns towards alkaline.