

Propionylmaridomycin とその代謝物の分別定量法

畚野 剛・喜多八洲男・前田憲一

武田薬品工業株式会社中央研究所

醸酵生産物研究所

Maridomycin は *Streptomyces hygroscopicus* No. B-5050 により生産される新マクロライド抗生物質である^{1, 2)}。Maridomycin の各種 acyl 誘導体を合成し、動物実験による血中濃度、治療効果および毒性を比較した結果、最もすぐれたものとして propionylmaridomycin (PMDM) が選出された³⁾。

一般にマクロライド抗生物質は生体内において速やかに代謝されて、その一部は抗菌力のある代謝物に変換される⁴⁾。マクロライド抗生物質の代謝生成物の検索のために thin layer chromatography-bioautography (TLC-bioauto.) を応用した例としては、大團ら⁵⁾の JM に関する研究が見られるが、この例においても定性的な表現にとどまっております、代謝物の分別定量法としては確立されていない。

本報においては PMDM およびその代謝物のカップ法による全力価の定量法、体液からの抽出法、TLC-bioauto. による分別定量法を検討し、あわせて人体液中の代謝物の分別定量を行なった結果を報告する。

実験材料および実験方法

1. 標準試料

Propionylmaridomycin (PMDM) およびその代謝物⁶⁾ [4''-deacyl-propionylmaridomycin (PMDM-M), maridomycin (MDM), 4''-deacyl-maridomycin (MDM-M)] の標準試料はいずれも当研究所において調製されたものを用いた。

2. PMDM およびその代謝物の分別定量法

i) カップ法による全力価の定量法 血漿、胆汁、尿などの体液検体中の全抗菌力価の定量にはカップ法を用いた。カップ法は基本的には日本抗生物質基準力価試験法(標準曲線法)に準じ、これを薄層法に改変したもので、Table 1 に示した設定条件により実施した。

なお検体と標準曲線(倍数希釈系列)の希釈は次のようにした。血漿検体は無希釈とし、それに対する標準は血漿で希釈した。尿検体とそれに対する標準は 0.1M リン酸塩緩衝液(pH 8.0)で希釈した。胆汁検体はリン酸塩緩衝液で10倍に希釈し、それに対する標準は胆汁・リン酸塩緩衝液(1:9)で希釈した。

ii) 体液からの抽出法 体液検体(全力価 10~50 mcg 相当量)をリン酸塩緩衝液で希釈して pH 8.0 に調整したのち、等量の酢酸エチルで3回抽出した。抽出液は減圧濃縮により乾固したのち、残留物をメタノール 50~100 μ l に溶かし TLC-bioauto. による分別定量に供した。

iii) Thin layer chromatography (TLC)⁶⁾ 東京化成製シリカゲルプレート“Spotfilm”(20×20 cm)に検体(前項のメタノール溶液)2~10 μ l, 約 2mcg 全力価相当量をスポットした。また対照の標準試料としては PMDM, 代謝物:PMDM-M, MDM, MDM-M の各々について 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mcg (メタノール溶液として各 5 μ l)をマイクロピペットで定量的にスポットした。

Table 1 Microbiological assay of PMDM

Type	cup-plate method
Test organism	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341
Inoculum	cell suspension (OD 660 m μ =0.8), 0.1 ml/100ml medium
Medium	peptone 0.6%, yeast extract 0.3%, meat extract 0.15%, glucose 0.1%, agar 1.2%, pH 8.0 (10 ml/plate)
Initial solution of standard	1 mg/ml (MeOH)
Diluent for further dilution	0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) or human body fluids
Final concentration of standard curve	PMDM-III : 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 mcg/ml
Incubation	34°C

展開溶媒は $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{NH}_4\text{OH}$ (40 : 3 : 20) の下層液を用い、室温で約 2 時間 (約 16 cm 上昇) 展開したのち風乾した。

iv) Bioautography 検定菌株および検定培地は Table 1 に示したカップ法と同一のものを用いた。いわしや製 bioauto. 罐 (底面ガラス張, 24×34 cm) を滅菌したのちに、検定菌懸濁液 (OD 660 $m\mu$ = 0.8) 1 ml を混ぜた検定培地 200 ml を流しこみ、水平に保つて固化させた。これに前項にしたがい展開させた TLC-プレート を各検体毎に短冊型 (幅 15 mm) に切つたものを適当な間隔 (約 15 mm) をおいて張り付け、約 20 分間拡散させたのち、プレートを取り除き、37°C で 16~18 時間培養した。

v) 阻止帯の測定と力価計算 藤井ら⁷⁾の方法に準じ発育阻止スポットの大きさは展開方向に直角方向の最大径 (横径) を測定した。同時に展開した標準試料の力価とスポットの大きさより検量 (標準) 曲線を作製し、各検体の同一 Rf を示すスポット毎に各標品相当の力価を計算した。

3. 人体液中の代謝物の定量

i) 健康男子 3 名 (A-C) に PMDM (200 mg カプセル各 5 個) を早期空腹時に投与したのち、ヘパリン化血漿 (2 時間目) および尿 (0~6 時間) を採取し、全抗菌力価および代謝物を前項の方法によつて定量した。

ii) 肝機能正常であるが開腹手術を要した患者、男 (D) 女 (E) 各 1 名に PMDM を 600 mg 投与したのち、血清、尿および胆嚢内胆汁を採取 (国立泉北病院) し、全抗菌力価および代謝物の定量に供した。

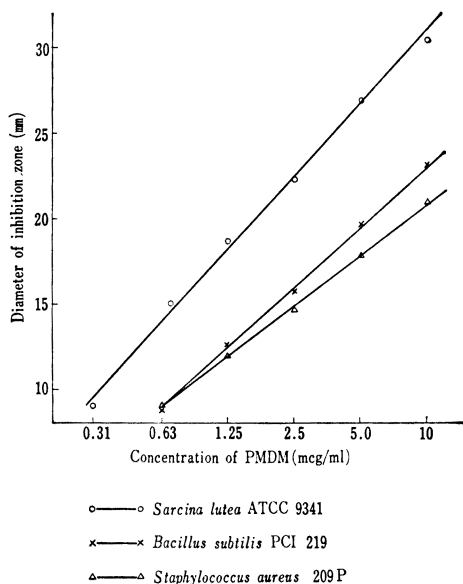
実験結果

1. カップ法による全力価の定量

i) 検定菌株 当室保管の検定菌株 8 株に対する PMDM および代謝物 PMDM-M の抗菌力 (寒天平板

法) は Table 2 に示したとおりである。最も感受性の高いのは *Sarcina lutea* ATCC 9341 株であつた。そのうち 3 株についてカップ法により比較した結果を Fig. 1 に示した。やはり *S. lutea* が最も感度が良く、阻止円周縁も鮮明であつた。本菌株について以下の実験を行なつた。

Fig. 1 Standard curves of PMDM by cup-plate method : three test organisms



ii) 接種菌量 検定培地への接種菌量は Table 1 に示した量を標準 (最適) としたが、標準量×1/3 の場合は阻止円周縁がやや不鮮明になつた。また標準量×3 の場合は阻止円径が 1 mm 程度小さくなつた。

iii) 検定培地 検定培地の pH は塩基性マクロライド抗生物質の通性として阻止円が大きくなる塩基性側 (pH 8) を選んだ。培地組成は Table 1 のものが最も

阻止円大きく、周縁も鮮明であつた。市販培地のうちでトリプトソイ寒天 (栄研) も阻止円周縁は鮮明であつたが、標準曲線の傾斜がやや小さかつた。

iv) 培養温度 培養温度を 34°C にした場合阻止円径は 37°C より 1~2 mm 大きかつた。したがつて定量感度 0.3 mcg/ml を確保するため 34°C を採用した。

v) 希釈溶媒 Table 1 に示した設定条件において得られた標準曲線 (緩衝液希釈、人血漿希釈および胆汁希釈) を Fig. 2 に例示した。

Table 2 Antimicrobial activity of PMDM and PMDM-M

Test organism	Sample pH	PMDM		PMDM-M	
		7	8	7	8
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P		1*	0.5*	5*	2*
<i>S. aureus</i> Heatley		1	0.5	5	5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228		2	1	10	5
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219		1	0.5	2	0.5
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341		0.1	0.05	0.5	0.2
<i>S. subflava</i> ATCC 7468		0.5	0.2	1	0.5
<i>S. variabilis</i> IFO 3067		0.2	0.2	0.5	0.5
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240		0.5	0.2	0.5	0.2

* MIC (mcg/ml), agar dilution method

Fig. 2 Standard curves of PMDM and its metabolites by cup-plate method : *S. lutea*

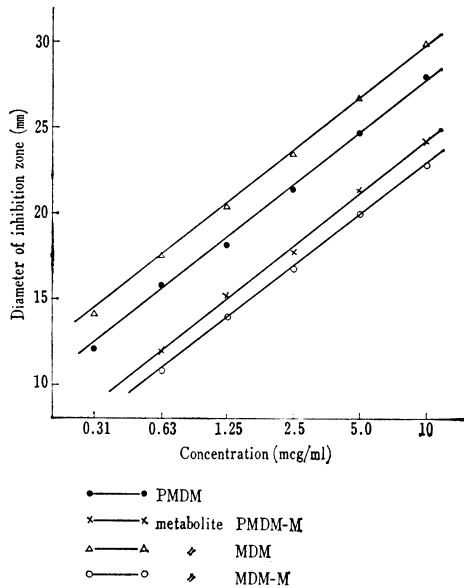
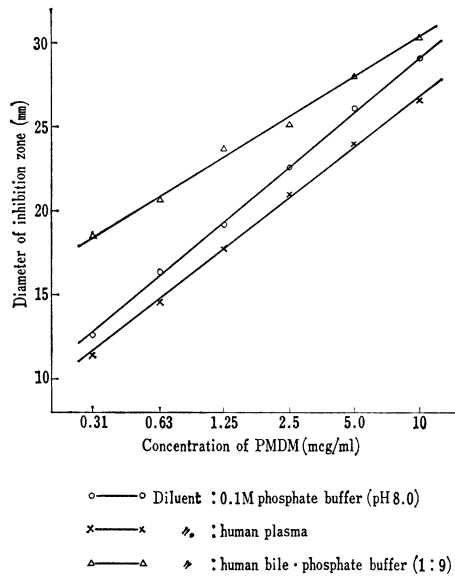


Fig. 3 Standard curves of PMDM by cup-plate method : effect of human body fluids



vi) 力価の標準 PMDM とその代謝物についてのカップ法による標準曲線は Fig. 3 に例示したようになり、阻止円の大きさは MDM>PMDM>PMDM-M>MDM-M の順で、各標準曲線はほとんど平行になった。なお他の菌株についても同一条件で検討を加えたが各代謝物に対して同一の阻止円径を示す株、または特定の代謝物に特に感度の高い株は見出されなかつた。したがって全力価は原体 PMDM の主成分である PMDM-Ⅲ を標準として算出し^{注)}、代謝物個々についてはさらに分別定量を行なうこととした。

2. 体液検体からの代謝物の抽出

ラットの血漿および尿に代謝物 PMDM-M の標品を添加し、各種溶媒による抽出(回収率)を比較した結果、

Table 3 に示したように酢酸エチルが良好であつた。ま

Table 3 Effect of solvents on extraction PMDM-M from plasma and urine of rat

Solvent	Recovery rate as PMDM-M	
	Plasma	Urine
Ethyl acetate	90(%)	95(%)
Ether	85	80
n-Butanol	43	—

PMDM-M added : 10 mcg/ml in plasma, 50 mcg/ml in urine.

Extraction was repeated 3 times with one volume of solvent for the material.

注) PMDM-Ⅲは PMDM の主成分であり、また各成分のカップ法による相対的な抗菌力価は下表のようになり、Ⅲが何れの菌に対しても最も抗菌力が強かつた。したがって全力価は PMDM-Ⅲ 力価であらわすことにした。

Component of PMDM	Relative activity (cup-plate method)		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sarcina lutea</i>
	PCI 219	209 P	ATCC 9341
I	91 %	95 %	71 %
II	97	99	84
III	100	100	100
IV	90	95	92
V	64	54	57
VI	58	44	57

Assay conditions were similar to Table 1, except that three test organisms were used and final concentration of each component was 10 mcg/ml.

Fig.4 TLC of PMDM and its metabolites : effect of reuse of the solvent on Rf values

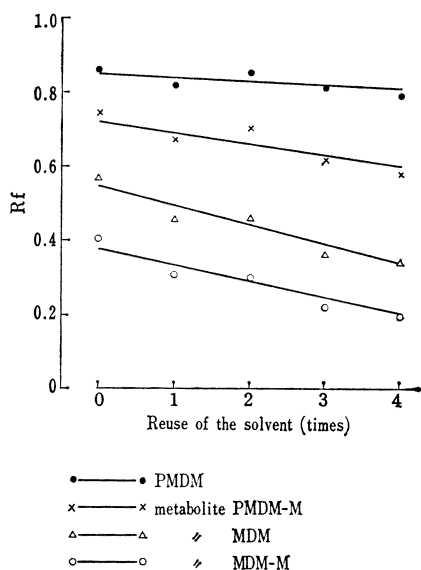
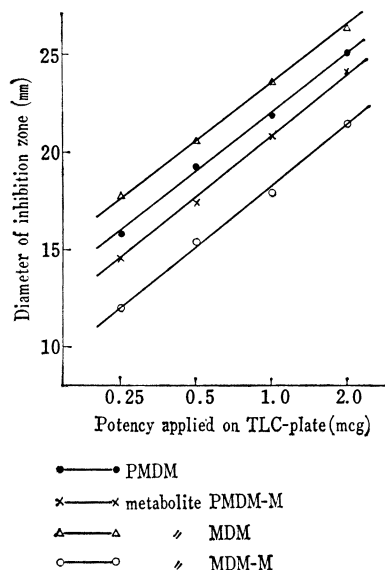


Fig.5 Standard curves of PMDM and its metabolites by TLC-bioautography
TLC-plate : SiO₂, "Spotfilm"
Solvent : CHCl₃·MeOH·NH₄OH
(40 : 3 : 20)
Test organism : *S. lutea*



た, より親水性の強い代謝物 MDM-M についても検討したが同様の結果が得られた。

3. TLC-bioauto. 法による分別定量

i) TLC 系の検討 体液からの抽出液について代謝物を分別定量するため, 標品として原体 PMDM および原体からの 4' 位または (および) 9 位の脱エステル反応により得られる代謝物 (PMDM-M, MDM, MDM-

M) を用い, それらの分離が最も良い溶媒系を選んで TLC を行なった⁶⁾。

本溶媒系調製後の使用回数が代謝物の Rf に及ぼす影響は Fig. 4 に示すようになりに著しかった。回数の増加

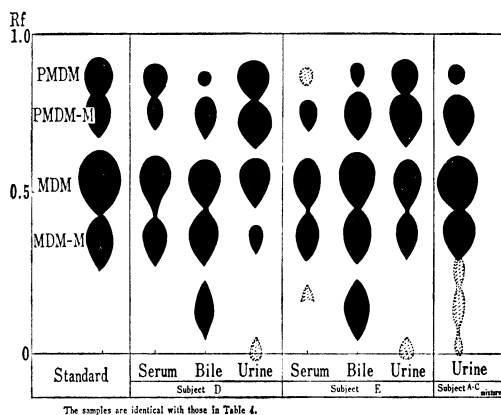
Table 4 PMDM and its metabolites in human body fluids after oral administration of PMDM

Subject	Sex	Age	Disease	Dose	Body fluid	Time after admin. (h)	Total activity as PMDM-III (mcg/ml)	Active metabolites in body fluids			
								PMDM (mcg/ml)	PMDM-M (mcg/ml)	MDM (mcg/ml)	MDM-M (mcg/ml)
A	♂	49	Healthy	1 g	P*	2	0.8	—	0.17	0.18	0.54
					U	0~4	22.0	1.9	15.7	6.8	10.9
B	♂	40	volunteers	1 g	P	2	2.1	±	0.28	0.42	1.25
					U	0~4	53.0	4.9	39.6	7.7	26.7
C	♂	40	Healthy	1 g	P	2	0.8	—	0.03	0.18	0.72
					U	0~4	23.5	1.2	11.9	6.2	8.6
D	♂	57	Gallstone disease	600 mg	S	2	n.d.	0.18	0.06	0.18	0.48
					U	0~4	n.d.	7.0	7.5	1.1	2.3
					B	~4	63.0	1.5	13.3	6.7	46.7
E	♀	59	Gastric cancer	600 mg	S	2	<0.3	—	0.01	0.02	0.03
					U	0~4	30.0	1.6	5.6	1.2	1.6
					B	~3.2	440	20	100	60	280

* P : plasma, S : serum, U : urine, B : bile

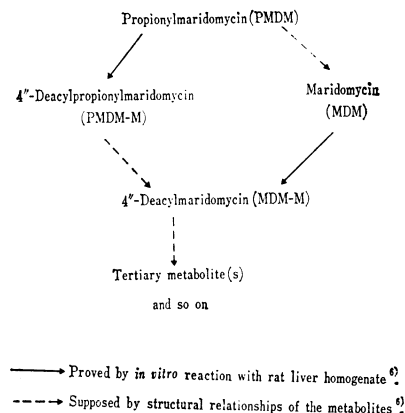
にしたがつて一般に Rf が低下し、特に代謝物 MDM-M と原点との間がせばめられる。後述のように体液中には代謝物 MDM-M よりも低 Rf 値の代謝物も存在する故、溶媒系は再使用せず、すべて新しく調製したものをを用いた。

Fig. 6 Bioautogram of human body fluids after oral administration of PMDM



またシリカゲルプレートの活性は製造元により著しい差があり、本研究では東京化成製“Spotfilm”を用いて好結果を得たが、たとえば Eastman-Kodak 製“Chromagram”では本溶媒系では一般に Rf が大きくなりすぎて代謝物の分離は不良であつた。

Fig. 7 Proposed metabolic pathway of PMDM



ii) Bioauto. 法による力価算出 展開した TLC について *S. lutea* による bioauto. を行ない各代謝物標品のスポットを検出した。阻止スポットの横径と力価の対数との間に直線関係が成立つことを認めた。このようにして得られた TLC-bioauto. 法の標準曲線の例を Fig. 5

に示す。体液検体からの抽出液についても標品と同一のシリカゲルプレート上で同時に展開すれば、Rf の比較による検体中の各代謝物の同定およびそれぞれのスポットの横径からの力価の算出が可能となる。この場合検体抽出液のスポット量は全力価として約 2mcg が適量である。

ラット血漿に代謝物 PMDM-M を添加し前述の方法で抽出濃縮して得られたメタノール液を本 TLC-bioauto. 法により定量した。その結果メタノール液からの回収率は約 95%、変動係数は約 11% というかなり良好な成績が得られたので、分別定量法として充分に使用できることが認められた。

4. 人体液中の代謝物

以上の検討により設定した定量法の応用例として、PMDM を人に経口投与した時の健康人の血漿および尿、また開腹手術を受けた患者の血清、尿および胆汁についての定量成績を Table 4 および Fig. 6 に示した。この場合いずれにおいても原体 PMDM、原体からの第 1 次代謝物 (PMDM-M, MDM), 第 2 次代謝物 (MDM-M), さらに Rf がより小さい第 3 次以降の代謝物と思われるものが認められた。これらの代謝物間相互の構造的関係およびラット肝ホモジネートにおける代謝の成績⁶⁾をも勘案して代謝経路を推定すると Fig. 7 のようになる。

また原体の残存量が比較的多い例 (D 症例) も認められた。なお健康人 3 例の血漿および尿中の全力価および代謝物は検体採取後 1 週間冷蔵保存によつても変化を認めなかつた。

考 察

TLC-bioauto. 法による代謝物の分離は 1 次元展開法によつたため、同一 Rf を示すスポットは必ずしも均一とは限らないであろうが、少なくとも人の場合尿から PMDM, 代謝物 PMDM-M, MDM および MDM-M が分離同定⁶⁾されているので、それぞれの標品を標準として力価計算する方式を採つた。また代謝過程が進むにしたがい、例えば水酸基数の増加により、順次親水性を増した代謝物となり一般的に Rf がより小さくなるので、bioautogram の pattern を見くらべることにより代謝の進行をある程度比較することができる。

排泄経路により代謝物組成に差が生じる現象は、マクロライド抗生物質の場合に動物実験においてすでに認められている (mydecamycin⁸⁾, PMDM⁹⁾)。本報においても人の場合同一人からの尿と胆汁を分析して、その代謝物組成に差があり、胆汁のほうがより親水性の強い区分の多いことが認められた。

また健康人と患者の尿の bioautogram の pattern

(Fig. 6)を比較すると、原体は患者のほうが多く、逆に第2次以降の代謝物は健康人のほうが多い傾向があるが、本実験のデザイン (Table 4)において年齢、健康状態、開腹手術の有無等の要因が交絡していたので、いずれの要因が有意の影響を与えているのか決定はできなかった。

本剤は生体内で速やかに代謝されるが、生成する代謝物の臓器内濃度は高く⁹⁾、すくなくとも第1次ないし第2次代謝物は *in vitro* のみならず *in vivo* 実験においても高い活性を持ち、これらが治療効果に関与していると考えられる。事実個々の代謝物を *S. aureus* 感染マウスに投与した場合強い治療効果のあることが報告されている^{10,11)}。

結 論

Propionylmaridomycin (PMDM) とその代謝物の定量法を検討して以下の結果を得た。

1. 体液中の全力価定量のためには *Sarcina lutea* ATCC 9341 を試験菌とする薄層カップ法 (Table 1) が適していた。本法の定量感度は人血漿中において約 0.3 mcg/ml である。

2. 体液からの代謝物の抽出には酢酸エチルが最も抽出率 (90%以上) が良かった。

3. 代謝物の分別定量のため TLC-bioauto. 法を設定した。シリカゲルプレートは東京化成製 "Spotfilm", 溶媒系は $\text{CHCl}_3 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{NH}_4\text{OH} (40 : 3 : 20)$ の下層液, bioautography の試験菌は *Sarcina lutea* ATCC 9341 を用いた。

4. 分別定量法の応用例として人の血漿 (血清), 尿および胆汁中の propionylmaridomycin およびその代謝物について分析し, 若干の考察を加えた。

謝 辞

貴重な臨床材料を分与下さいました国立泉北病院 河盛勇造院長に深く感謝致します。

文 献

- 1) ONO, H.; T. HASEGAWA, E. HIGASHIDE & M. SHIBATA: Maridomycin, a new macrolide antibiotic. I. Taxonomy and fermentation. J. Antibiotics 26 : 191~198, 1973
- 2) MUROI, M.; M. IZAWA, M. ASAI, T. KISHI & K. MIZUNO: Maridomycin, a new macrolide antibiotic. II. Isolation and characterization. J. Antibiotics 26 : 199~205, 1973
- 3) HARADA, S.; M. MUROI, M. KONDO, K. TSUCHIYA T. MATSUZAWA, T. FUGONO T. KISHI & J. UEYANAGI: Maridomycin, a new macrolide antibiotic. IV. Chemical modification of maridomycin. Antimicrob. Ag. Chemother. (in press)
- 4) 清水喜八郎: 抗生物質の現況—特性と問題点を中心として—マクロライド系抗生物質。総合臨床 21 : 2817, 1972
- 5) 大藪 卓, 矢野邦一郎, 宮本文雄, 渡辺俊一, 石田仁, 長谷川嘉朗, 曾根崎 巖, 佐藤紀久, 高橋勇夫: ジョサマイシンの研究, 第3報. 吸収, 排泄, 臓器内分布, 生体内動向. Jap. J. Antibiotics 22 : 159, 1969
- 6) MUROI, M.; M. IZAWA & T. KISHI: Maridomycin, a new macrolide antibiotic. III. Isolation and structure of metabolites of propionylmaridomycin. J. Antibiotics (in preparation)
- 7) 藤井良知, 紺野昌俊, 岡田一穂, 能谷道彦, 吉田昭雄, 松崎明紀: Aminobenzyl-Penicillin, Methylphenyl isoxazolyl-Penicillin 合剤の分離定量法に関する研究. Chemotherapy 17 : 1620, 1969
- 8) 梅村甲子郎: "SF-837 シンボジウム", 2, 特別発言, 代謝. 第18回日本化学療法学会東日本支部総会, 昭46年11月 (東京)
- 9) 松沢 兌: "Propionylmaridomycin シンボジウム" II. Macrolide antibiotics の吸収, 排泄, 体内分布, 代謝, 2) propionylmaridomycin, a) 動物. 第20回日本化学療法学会総会, 昭47年6月 (大阪)
- 10) 中沢昭三: "Propionylmaridomycin シンボジウム" III. Propionylmaridomycin および代謝物の生物活性. 第20回日本化学療法学会総会, 昭和47年6月 (大阪)
- 11) 近藤正熙, 大石登喜子, 石藤 潔, 土屋皖司: 4''-Deacyl-9-propionylmaridomycin および 4''-deacyl-maridomycin の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. 第20回日本化学療法学会西日本支部総会, 昭和47年12月 (福岡)

DIFFERENTIAL ASSAY METHOD FOR PROPIONYLMARIDOMYCIN (PMDM) AND ITS METABOLITES

TAKESHI FUGONO, YASUO KITA and KEN'ICHI MAEDA

Microbiological Research Laboratories,

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

Assay methods for propionylmaridomycin and its metabolites were studied.

1. For determination of total activity, a cup-plate method, using *Sarcina lutea* ATCC 9341 as test organism, was established (Table 1). Sensitivity by this method for propionylmaridomycin in human plasma was 0.3 mcg/ml.
2. For extraction of the metabolites from body fluids, extraction with ethyl acetate resulted the highest recovery rate (90% or more).
3. For differential assay of the metabolites, a thin layer chromatography-bioautography system was devised with best results under following conditions:
 - i) Silica gel plate: "Spotfilm" (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
 - ii) Developing solvent system: CHCl_3 •MeOH• NH_4OH (40:3:20)
 - iii) Test organism: *Sarcina lutea* ATCC 9341.
 - iv) Assay range: 0.2~2.0 mcg (Fig 5).
4. As example for application of the differential assay method, propionylmaridomycin and its metabolites in human body fluids (plasma, urine and bile) after oral administration were analyzed.