

## Penicillin 系抗生剤と Aminoglycoside 系抗生剤の 相互作用に関する研究 II

試験管内における両剤間の反応

川 島 士 郎

新潟大学医学部第二内科

(昭和 50 年 2 月 28 日受付)

### 1. はじめに

Carbenicillin(CBPC) による gentamicin (GM) の不活化が報告されてから、penicillin 系抗生剤(PC 系抗生剤)と aminoglycoside 系抗生剤(A系抗生剤)の物理化学的反応によると思われる相互作用が注目されるようになり、作用機序について論議されている。著者は試験管内における両剤間の反応について、若干の検討と考察を行なった。

### 2. 実験材料および方法

**実験 1** Thin layer chromatography (TLC) による A系抗生剤の主要成分の変化の観察

CBPC による GM, 3', 4'-dideoxykanamycin B(DKB), tobramycin (TBM), amikacin, kanamycin (KM), aminodeoxykanamycin(AKM), lividomycin(LVDM), ribostamycin(RSM) の主要成分の変化、および sulbenicillin(SBPC) による GM, TBM, amikacin, LVDM の主要成分の変化をみるために、pH 7.8 の 1/15 M 燐酸緩衝液(1/15 M-PBS)を溶媒として、10 mg/ml の PC 系抗生剤と 10 mg/ml の A系抗生剤の等容混合液、対照として 5 mg/ml の A系抗生剤単独溶液を作製し、37°C で 48 時間保温したものと保温しないものについて、それぞれの 20 ml をシリカゲル薄層板(Wakogel B-5, 厚さ 0.25 mm)にスポットし、クロロホルム、メタノール、17% アンモニアが 2 対 1 対 1 の展開溶媒で展開し、風乾後にニンヒドリンで発色させた。

**実験 2** TLC による PC 系抗生剤の主要成分の変化の観察

GM, DKB, TBM, amikacin, KM, AKM, LVDM, RSM, streptomycin(SM) による CBPC の主要成分の変化と、GM, TBM, amikacin, LVDM による SBPC の主要成分の変化、さらに、DKB による CBPC 以外の PC 系抗生剤、すなわち penicillin G(PCG), ampicillin(ABPC), SBPC, cloxacillin(MCIPC) の主要成分の変化をみるために、pH 6.6 の 1/15 M-PBS を溶媒として 10 mg/ml の PC 系抗生剤と 10 mg/ml の A系抗生剤の等容混合液、対照として 5 mg/ml の PC 系抗生剤単独溶液を作

製し、37°C で 48 時間保温したものと保温しないものについて、それぞれの 20 ml をシリカゲル薄層板にスポットし、*n*-ブタノール、酢酸、水が 12 対 3 対 5 の展開溶媒で展開し、風乾後にヨウ素蒸気で発色させた。

**実験 3** CBPC と DKB を保温した時の反応生成物の抗菌活性検定

蒸留水で 20 mg/ml の CBPC と 20 mg/ml の DKB の等容混合液を作製し、37°C で 48 時間保温したのち実験 1, 2 で用いた 2 つの展開系列で CBPC および DKB の単独成分をとり除き、ニンヒドリンとヨウ素蒸気の両方で発色される部分を分離し、その成分について *Bacillus subtilis* PCI-219 株を混合した普通寒天平板を用いて bioautography とかき取り法を行ない、抗菌活性を検定した。

**実験 4** 赤外線吸収試験<sup>3)</sup>

蒸留水で 20 mg/ml の CBPC と 6 mg/ml の DKB および LVDM の等容混合液と、対照として 10 mg/ml の CBPC, 3 mg/ml の DKB, 3 mg/ml の LVDM の各溶液を作製し、37°C で 24 時間保温したものと保温しないものを凍結乾燥し、KBr 法による赤外線吸収試験を行なった。

**実験 5** DKB に対する penicilloic acid の影響

Penicillinase(*Bacillus cereus* 由来, CALBIOCHEM) で CBPC から penicilloic acid を作り、pH 7.8 の 1/15 M-PBS を溶媒として 1,000  $\mu$ g/ml の penicilloic acid と 10  $\mu$ g/ml の DKB の等容混合液と、対照として 5  $\mu$ g/ml の DKB 単独溶液、および 1,000  $\mu$ g/ml の CBPC と 10  $\mu$ g/ml の DKB の等容混合液を作製し、37°C で 24 時間保温したのち、薄層カップ法を用いて DKB の活性残存率を測定した。検定菌は MIC(minimal inhibitory concentration) が CBPC で 1,000  $\mu$ g/ml 以上、DKB で 0.78  $\mu$ g/ml を示す臨床分離の *Klebsiella pneumoniae* 竹内株を用いた。

**実験 6** Penicilloic acid の iodometric assay<sup>3,4)</sup>

pH 6.6 の 1/15 M-PBS を溶媒として、1,000 mcM の CBPC と 250, 500, 1,000 mcM の DKB の等容混

Fig. 1-A Thin layer chromatography of aminoglycoside antibiotics changed by carbenicillin adsorbent : Wakogel B-5  
solvent : chloroform : methanol : 17% ammonium=2 : 1 : 1  
detection : ninhydrine spray

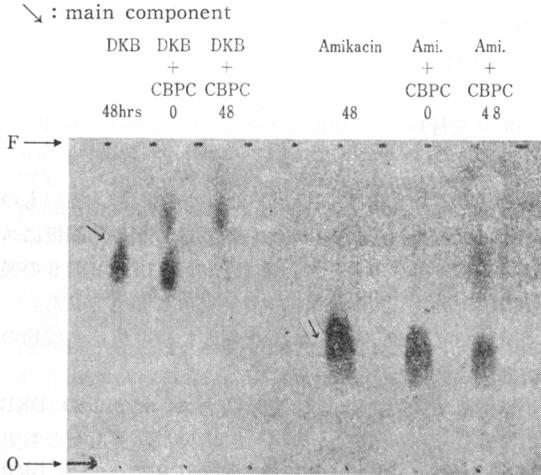


Fig. 1-B

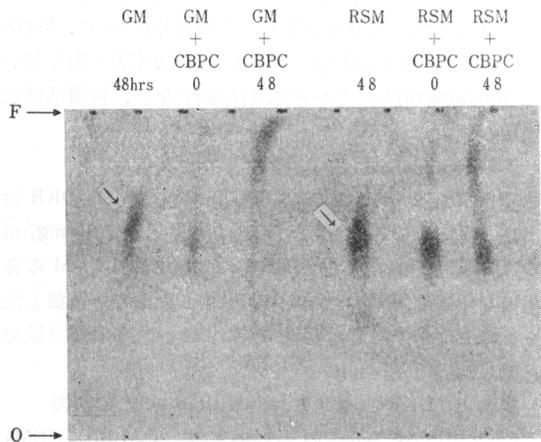


Fig. 1-C

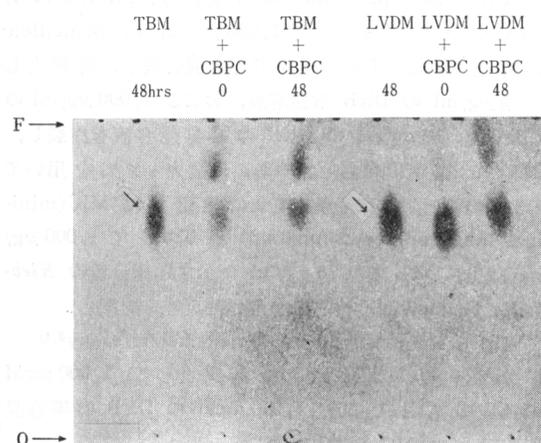


Fig. 1-D

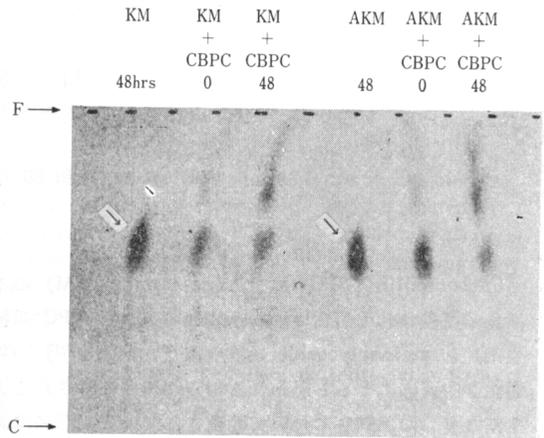


Fig. 2-A Thin layer chromatography of aminoglycoside antibiotics changed by sulbenicillin

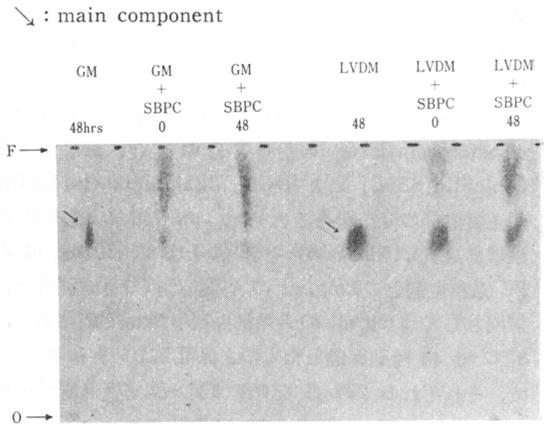


Fig. 2-B

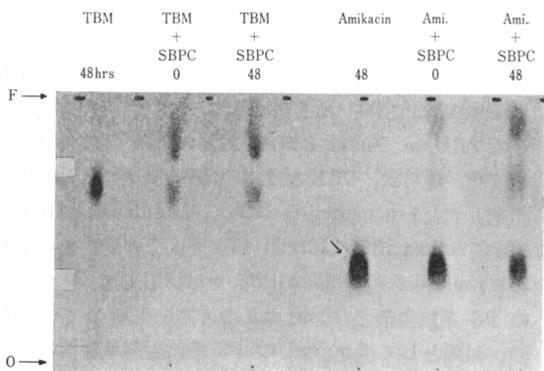


Fig. 3 Thin layer chromatography of carbenicillin changed by each aminoglycoside antibiotic adsorbent : Wakogel B-5 solvent : *n*-butanol : acetic acid : water=12 : 3 : 5 detection : iodine vapour  
↘ : main component

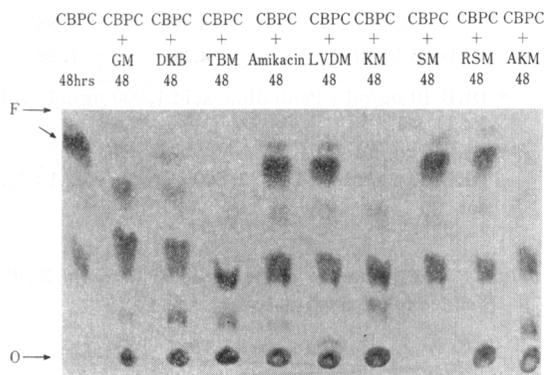
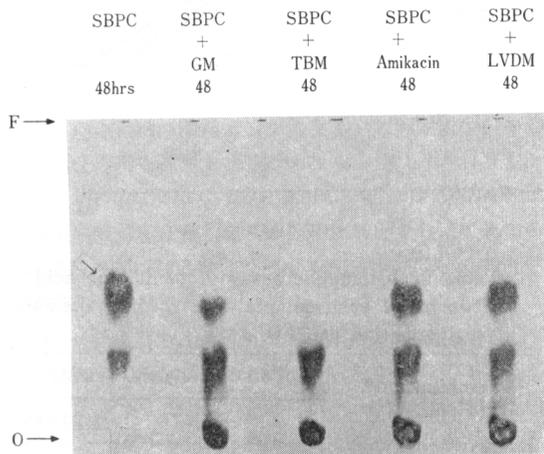


Fig. 4 Thin layer chromatography of sulbenicillin changed by each aminoglycoside antibiotic  
↘ : main component

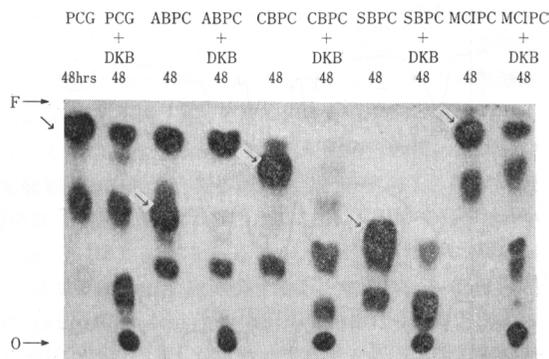


合液、および対照として 500 mcM の CBPC 単独溶液を作製し、37°C で 24 時間まで経時的に保温し、それぞれの溶液 2 ml 中に産生された penicilloic acid を定量した。

3. 実験成績

実験 1 Fig. 1 の A~D に CBPC による各種 A 系抗生剤の主要成分 (↘印) の変化を示した。すなわち、CBPC による DKB, GM, TBM, KM, AKM の主要成分の変化は大きく、amikacin, RSM, LVDM の主要成分の変化は小さかった。Fig. 2 の A, B に SBPC による GM, LVDM, TBM, amikacin の主要成分の変化を示した

Fig. 5 Thin layer chromatography of penicillins changed by 3',4'-dideoxykanamycin B  
↘ : main component



が、GM, TBM では変化が大であるが、LVDM, amikacin では変化が小で、CBPC の場合と同様の傾向を示した。

実験 2 GM, DKB, TBM, KM, AKM による CBPC の主要成分 (↘印) の変化は大きく、amikacin, LVDM, SM, RSM による CBPC の主要成分の変化は小さかった (Fig. 3)。また、GM, TBM による SBPC の主要成分の変化は大きく、amikacin, LVDM による変化は小で、CBPC の場合と同様の傾向を示した (Fig. 4)。さらに、DKB は CBPC 以外の PC 系抗生剤、すなわち PCG, ABPC, SBPC, MCIPC も CBPC と同じように主要成分を大きく変化させた (Fig. 5)。

実験 3 CBPC と DKB の組み合わせから TLC により分離したニンヒドリンとヨウ素蒸気の両方で発色される成分は、bioautography およびかき取り法の結果、阻止円を作らなかった。

実験 4 Fig. 6 の A, B に結果を示したが、CBPC 単独では、37°C に保温しないものと 24 時間保温したものの吸収スペクトルで β-lactam ring は 1780 の吸収帯にあり、強度にほとんど差はなかった。CBPC と DKB、および CBPC と LVDM の組み合わせでは、それぞれ保温しないものよりも 24 時間保温したほうが 1780 の吸収帯の強度は減少していて、減少の程度は CBPC と DKB の組み合わせのほうが大きかった。DKB および LVDM 単独では、保温しないものと保温したものとで吸収スペクトルの変化はほとんどみられなかった。

実験 5 DKB に対する penicilloic acid の影響は認められなかった (Table 1, Fig. 7)。CBPC と DKB の組み合わせでは DKB の活性残存率は 24 時間保温後に 36.2% であったが、penicilloic acid と DKB の組み合わせでは、DKB 単独と同様に、DKB の活性低下は 24 時間保温後も認められなかった。

Fig. 6-A Infrared absorption spectra

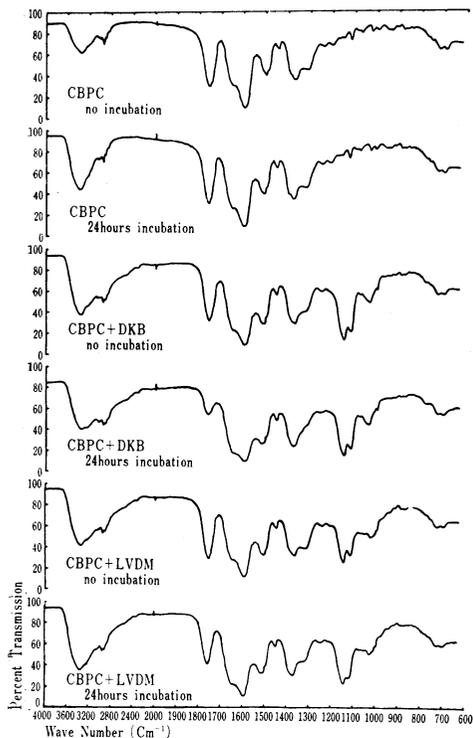
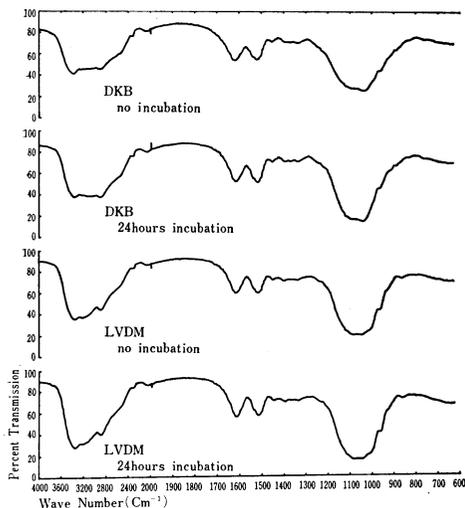


Fig. 6-B



実験 6 Penicilloic acid の産生の経時的变化をみると、1,000 mcM の CBPC と 1,000 mcM の DKB の等容混合液では保温後 1, 4, 24 時間で、それぞれ 0.06, 0.09, 0.30 mcM となり、保温時間が長くなると産生量が増加した。DKB の濃度による影響をみると、24 時間

Table 1 The influence of penicilloic acid on 3',4'-dideoxykanamycin B

Combination* and control**	DKB activity after incubation at 37°C(μg/ml)	
	0	24 hrs
DKB+Penicilloic acid	4.45	4.47
DKB	5.02	4.88
DKB+CBPC	4.36	1.58

\* DKB 10 μg/ml+Penicilloic acid 1,000 μg/ml (vol. 1 : 1) sol.

\*\* DKB 5 μg/ml sol.

DKB 10 μg/ml +CBPC 1,000 μg/ml (vol. 1 : 1). sol.

Fig. 7 The influence of penicilloic acid on 3',4'-dideoxykanamycin B

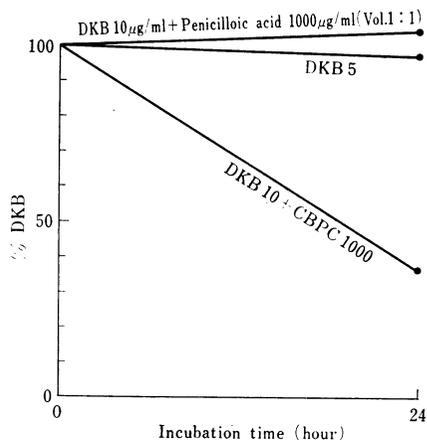


Table 2 Iodometric assay of penicilloic acid Two ml of each sample were used for the assay after incubation at 37°C.

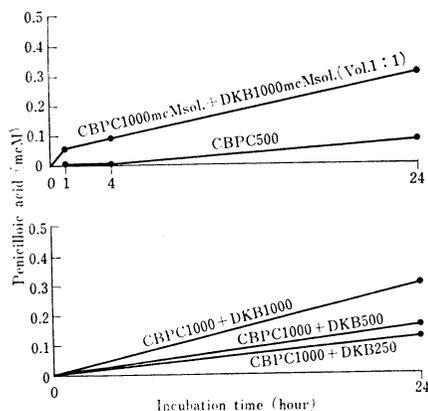
Combination* and control**	Penicilloic acid (mcM)		
	1	4	24 hrs
CBPC+DKB 250			0.12
CBPC+DKB 500			0.16
CBPC+DKB 1,000	0.06	0.09	0.30
CBPC	<0.01	0.01	0.08

\* CBPC 1,000 mcM sol.+DKB 250, 500, 1,000 mcM sol. (vol. 1 : 1)

\*\* CBPC 500 mcM sol.

保温後の penicilloic acid の産生は、DKB の 250, 500, 1,000 mcM 溶液を使用したとき、それぞれ 0.12, 0.16, 0.30 mcM となり、DKB の濃度が高いほど産生量が増した。なお、500 mcM の CBPC 単独溶液の場合では、24 時間保温後の penicilloic acid の産生量はわ

Fig. 8 Iodometric assay of penicilloic acid  
Two ml of each sample were used for the assay after incubation at 37°C.



ずかで、0.08 mcM であった (Table 2, Fig. 8)。

#### 4. 総括ならびに考按

TLC を用いた実験 1, 2 の結果から, A系抗生剤には CBPC, あるいは SBPC の作用を受け易いものと, 受け難いものがあり, 逆に CBPC や SBPC に対する作用の大きいものと, 小さいものがあることを知った。すなわち, A系抗生剤は CBPC, あるいは SBPC との相互作用が強い群 (GM, DKB, TBM, KM, AKM) と弱い群 (amikacin, LVDM, RSM, SM) の 2 群に分けられた。なお, このことは, 薄層カップ法を用いて両系抗生剤の相互不活化作用を検討した結果とも一致した<sup>5)</sup>。また, CBPC 以外に, SBPC, PCG, ABPC, MCIPC の DKB による主要成分の変化も著明に認めたことから, これらの PC 系抗生剤は前者の群に属する A系抗生剤との相互作用が強いと推測される。

PC 系抗生剤と A系抗生剤の相互作用の機序には, PC 系抗生剤の  $\beta$ -lactam ring と A系抗生剤のアミノ基が関与していると思われ, NOONE<sup>6)</sup> らは penicillinase を加えると CBPC による GM の不活化がおこらなかったことから, GM の不活化が生ずるためには  $\beta$ -lactam ring は intact であるはずだといひ, WEITZ<sup>7)</sup> らはアミノ基による  $\beta$ -lactam ring の nucleophilic opening を推定し, RIFF<sup>8)</sup> らは  $\beta$ -lactam ring とアミノ基の conjugation により相互に抗菌活性を失うといっている。また, RIFF らは CBPC と GM の組合わせで, 還元剤を添加すると GM 活性が復活しうると述べている。

CBPC と DKB の組合わせにおける著者の実験でも同様のことが推測された。実験 3 では, ニンヒドリンとヨウ素蒸気の両方で発色される部分が分離でき, その部に抗菌活性を認めなかったことから, 両剤は反応することによってなんらかの結合体を形成し, 相互に抗菌活性を

低下させるものと推測された。 $\beta$ -Lactam ring に関する実験 4, 5 では, 赤外線吸収試験で  $\beta$ -lactam ring の吸収帯に変化がみられたこと, penicillinase で分解した CBPC は DKB を不活化しなかったことなどから, 両剤の相互作用には  $\beta$ -lactam ring が関係していることが認められた。実験 6 からは, 両剤が反応する際には, 遊離の penicilloic acid の産生も伴うことが推測され, 保温時間の経過とともに, また DKB の濃度が高まるとともに, 産生量が増すことが認められた。これらの実験結果から相互作用の機序を推測すると, CBPC と DKB を混合し保温することにより, CBPC の  $\beta$ -lactam ring と DKB のおそらくアミノ基がゆるやかに反応して  $\beta$ -lactam ring は開裂するが, この時, 一部は遊離の penicilloic acid となり, そのほかは DKB となんらかの結合体を作り, 相互に抗菌活性を低下させるものと思われる。

NOONE<sup>9)</sup> らの報告では, 血清中で GM と PC 系抗生剤を混合して保温すると, GM は CBPC で最も著明に不活化され, ABPC, methicillin (DMPPC), PCG, MCIPC では弱く, 生理的食塩水や 5% ブドウ糖液などでは GM は CBPC, ABPC で著明に不活化され, DMPPC, PCG, MCIPC では弱かった。著者の薄層カップ法を用いた実験では, CBPC は SBPC に比較して GM, TBM の不活化速度が早かった<sup>5)</sup>。さらに, 実験 1, 2 では, A系抗生剤は CBPC, あるいは SBPC との相互作用が強い群と, 弱い群に分けられた。このように, 両系抗生剤間に反応の強いものと弱いものがみられるのは, 1 つにはそれぞれの抗生剤の分子構造の差異によるものと思われる。アミノ基に関しては, 相互作用の強い群に属する GM, DKB, TBM, KM, AKM に共通して存在する  $1-NH_2$  が相互作用に大きく関与していると推定される。

#### 5. ま と め

PC 系抗生剤と A系抗生剤の相互作用について TLC, 赤外線吸収試験などを用いて *in vitro* で検討し, 次の結果を得た。

(1) CBPC は GM, DKB, TBM, KM, AKM と, 互いに主要成分を変化させる相互作用が強く, amikacin, LVDM, RSM, SM とでは弱かった。SBPC の場合も CBPC と同じ傾向を示した。また, DKB は CBPC, SBPC, PCG, ABPC, MCIPC の主要成分を著明に変化させたことから, これらの PC 系抗生剤は GM, DKB, TBM, KM, AKM との相互作用は強いと推測された。

(2) 相互作用の強い両系抗生剤を混合し, 保温することにより, penicillin の  $\beta$ -lactam ring と aminoglycoside のアミノ基がゆるやかに反応して  $\beta$ -lactam ring は開裂するが, この時, 一部は遊離の penicilloic

acid となり、そのほかは aminoglycoside となんらかの結合体を作り、相互に抗菌活性を低下させるものと推測された。

(3) A系抗生剤には CBPC, あるいは SBPC との反応が強いものと弱いものがみられたが、これは、抗生剤の分子構造の差異が1つの要因となっていると思われる、アミノ基に関しては、相互作用の強い群に属する GM, DKB, TBM, KM, AKM に共通して存在する 1-NH<sub>2</sub> が相互作用に大きく関与していると推定された。

本論文の要旨は第 20 回日本化学療法学会東日本支部総会、および第 21 回、第 22 回日本化学療法学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) MC LAUGHLIN, J. E. & D. S. REEVES : Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin. *Lancet* 1 : 261~264, 1971
- 2) 宮村定男, 落合 宏 : Cefazolin の細菌学的検討—特に細菌の産生する不活化酵素について。

*Chemotherapy* 18 : 505~511, 1970

- 3) NOVICK, R. P. : Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83 : 236~240, 1962
- 4) ALICINO, J. F. : Iodometric method for the assay of penicillin preparations. *Ind. & Eng. Chem.* 18 : 619~620, 1946
- 5) 川島士郎 : Penicillin系抗生剤とAminoglycoside系抗生剤の相互作用に関する研究. I-抗菌力の不活性化について。 *Chemotherapy* 23(12) : 3767~3774, 1975
- 6) NOONE, P. & J. R. PATTISON : Therapeutic implications of interaction and penicillins. *Lancet* 2 : 575~578, 1971
- 7) WAITZ, J. A.; C. G. DRUBE, E. L. MOSS, Jr., E. M. ODEN, J. V. BAILEY, G. H. WAGMAN & M. J. WEINSTEIN : Biological aspects of the interaction between gentamicin and carbenicillin. *J. Antibiotics* 25 : 219~225, 1972
- 8) RIFF, L. J. & G. G. JACKSON : Laboratory and clinical conditions for gentamicin inactivation by carbenicillin. *Arch. Intern. Med.* 130 : 887~891, 1972

## THE INTERACTION OF PENICILLINS AND AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS. II

The Chemical Reaction of the Drugs *in Vitro*

SHIRO KAWASHIMA

The Second Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine

The interaction of penicillins—carbenicillin and sulbenicillin—and various aminoglycoside antibiotics was studied *in vitro*. The mixture of each penicillin and an aminoglycoside drug was incubated at 37°C for up to 48 hours and tested qualitatively by thin layer chromatography. In this procedure these penicillins and some aminoglycosides—gentamicin, 3',4'-dideoxykanamycin B, tobramycin, kanamycin and aminodeoxykanamycin—were chemically changed. The pairing of the penicillin and amikacin, lividomycin, ribostamycin or streptomycin did not show chemically remarkable change.

Since the change of each penicillin—carbenicillin, sulbenicillin, penicillin G, ampicillin or cloxacillin—by 3',4'-dideoxykanamycin B is remarkable, the interaction of these penicillins and aminoglycosides such as gentamicin, 3',4'-dideoxykanamycin B, tobramycin, kanamycin and aminodeoxykanamycin would be similarly significant.

The mechanism of the interaction of penicillin and aminoglycoside is speculated that  $\beta$ -lactam ring would react slowly to amino group, and penicillin-aminoglycoside complex would be formed with falling of antimicrobial activity. Some molecules of penicillin would turn to penicilloic acid. The degree of interaction may depend on various structures of antibiotic molecules.