

抗生物質、殊にテトラサイクリン系物質と 金属イオンによる沈澱形成

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

矢 部 芳 郎
林 生
中 山 五 郎
大 西 弘 之

〔昭和33年5月27日受稿〕

緒 言

抗生物質の抗菌力に及ぼす金属イオンの影響に関しては Clayton 等¹⁾ はペニシリン (以下 P) は Sn^{++} , Zn^{++} , Pb^{++} , Fe^{+++} 及び Cu^{++} により強く不活性化されるが、一方 Fe^{++} 及び Ag^+ では影響されない事を報告している。又氏家²⁾³⁾ はテトラサイクリン系抗生物質に Fe^{++} , Fe^{+++} 及び Al^{+++} を添加した場合、その菌発育阻止率は著しく縮小されるが、クロロマイセチン (以下 CM) 及びストレプトマイシン (以下 SM) は諸種金属イオンにより余り著明な影響を受けないこと、更にテトラサイクリン系抗生物質に Fe^{++} , Fe^{+++} 及び Al^{+++} を添加し、その pH を中性に近づけると著明に沈澱を生ずる事を報告している。然し近時、テトラサイクリン系抗生物質と Mg^{++} との関係は、 Fe^{++} 又は Fe^{+++} 等との関係以上に重視され、その間に拮抗の関係がある事も報告されている⁴⁾⁵⁾。

著者等はオーレオマイシン (以下 AM) に対する細菌の耐性実験を行つている時、偶々 Mg^{++} 含有合成培地に AM を添加した際極めて著明に沈澱が形成される事を認めた。この点に興味を抱き、抗生物質と金属イオンとの共存する場合に於ける沈澱形成及びその抗菌力との関係を検討し次の如き知見を得た。

実験材料及び方法

抗生物質: 結晶塩酸オーレオマイシン末 (日本レダグリー製造、武田薬品販売) 略号 AM, 結晶塩酸テトラマイシン末 (台糖ファイザー株式会社製造) 略号 TM, クロロマイセチン末 (三共株式会社製造) 略号 CM, 硫酸シドロストレプトマイシン (武田薬

品製造販売) 略号 SM 及び結晶ペニシリン G カリウム (武田薬品製造販売) 略号 P。

尚結晶塩酸テトラマイシン末は蒸留水に極めてよく (10^{-2}M 以上) 溶解するが、少時放置すれば著明に結晶を析出して来る為、溶液調製後速かに実験に供した。結晶塩酸オーレオマイシンにはかかる現象は認められなかつた。然しテトラマイシン以外の薬剤もテトラマイシンと同様溶液調製後出来る限り速かに実験に供した。

阻害剤: 2:4 Dinitrophenol (メルク) 略号 DNP。

金属塩: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の何れも市販の一等至特級品。

供試細菌: 教室保存の *Escherichia coli* 及び *Micrococcus pyogenes var. aureus* (寺島)。

観察方法: M/5 磷酸緩衝液 0.6ml と蒸留水 1.8 ml の混液に金属塩水溶液 0.3 ml を添加し沈澱形成を観察し、その混和液に更に抗生物質液 0.3 ml を静かに重層してその境界面を観察、2 時間後更に観察、混和放置し、18 時間後再び観察した。

沈澱の抗菌力試験: 実験結果の項に記述。

実験結果

第1節 抗生物質と二価金属イオンによる沈澱形成

前述した如く、AM の抗菌作用が金属イオンと何等かの関係にあることが知られている。著者等は AM, TM 及びその他の諸種抗生物質、更に AM と同様酸化的磷酸化に対する阻害剤として知られている DNP を Fe^{++} , Mg^{++} 及び Mn^{++} に添加し (pH 7.0 磷酸緩衝液中に於て) その際起る変化を観察した (方法: 実験方法の項参照)。

表 1 に示した如く、 10^{-3}M の Fe^{++} 及び Mn^{++}

表 1 各種抗生物質と金属

金属イオン種類	薬剤種類 濃度	経過時間* 濃度	オーレオマイシン (AM)									テラマイシン (TM)					
			10 ⁻³ M			10 ⁻⁴ M			10 ⁻⁵ M			10 ⁻³ M			10 ⁻⁴ M		
			0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe ⁺⁺	10 ⁻³		卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg ⁺⁺	10 ⁻²		-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	+	-
	10 ⁻³		-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn ⁺⁺	10 ⁻³		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	±	-
	10 ⁻⁴		-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	±	-
	10 ⁻⁵		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M/5 磷酸緩衝液 (pH7.0) 0.6ml, 蒸溜水1.8ml, 各金属イオン水溶液0.3ml,

* 薬剤水溶液を重層後2時間目に混和し, 更に18時間目に観察す。

は pH 7.0 の磷酸緩衝液中に於てそれ自体著明に白色沈澱を形成するのが認められた (この沈澱は一応無視する)。更にこれら各種濃度の二価金属イオンを含有する磷酸緩衝液に各種濃度の抗生物質及び DNP を実験方法の項に記述した如くして添加し観察した。

10⁻²M Mg⁺⁺ 存在下に AM 10⁻³M 及び 10⁻⁴M の濃度に於て添加直後にその接触面に著明な黄色沈澱を生じ, 10⁻³M Mg⁺⁺ 存在下には 10⁻³M AM は添加直後に, 10⁻⁴M AM は添加後少時して黄色沈澱を生じた。又10⁻³M Mn⁺⁺ が存在する場合にも, 10⁻³ 及び 10⁻⁴M AM は夫々添加直後及び少時後に黄色沈澱を生じた。

又 TM も AM 同様 Mg⁺⁺ が存在する場合黄色沈澱を生じたが, これは Mg⁺⁺ が 10⁻²M の場合に於てのみ, 而も添加後少時経過して生じ, その程度も AM の場合に比して極めて軽度であつた。又 Mn⁺⁺ (10⁻³ 及び 10⁻⁴M) が存在する場合にも, 極く軽度ではあるが, 重層面に於て沈澱を形成するかの如くみえた。

AM 及び TM 以外のもの, 即ち CM, SM, P 及び DNP は試みた範囲内の何れの濃度に於ても, 又何れの金属イオン存在下にも認むべき沈澱を形成しなかつた。

更に, 表 2 に示した如く, Mg⁺⁺ が存在する場合の AM の沈澱形成は 6.5 以上の pH に於て観察さ

れ, そして pH の上昇とともにその沈澱形成は著明となつた。尚磷酸塩が存在しない場合でも (即ち蒸溜水中でも), その pH を NaOH で徐々に上げてゆくと黄色沈澱が形成された。

表 2 オーレオマイシンと Mg⁺⁺ による沈澱形成と pH との関係

		pH				
		5.5	6.1	6.5	7.0	7.8
黄色沈澱	0時間	-	-	卅	卅	卅
	8 "	-	-	卅	卅	卅
	18 〃*	-	-	+	卅	卅

各pHのM/5磷酸緩衝液0.6ml, 蒸溜水1.8ml, 10⁻²M MgSO₄0.3ml, 10⁻²M オーレオマイシン 0.3ml. * 8 時間後混和し, 更に18時間目に観察す。

又 AM 及び TM ともに Fe⁺⁺ が存在する場合速かに褐色に色調の変化を来すのが認められた。

第 2 節 オーレオマイシンと Mg⁺⁺ とで形成される沈澱の抗菌作用

pH 7.0 に於て 10⁻³M Mg⁺⁺ に AM (終濃度 10⁻³M) を添加して形成される黄色沈澱を遠心分離すると, その上清の黄色調 (AM による) は Mg⁺⁺ を添加していない (従つて沈澱を形成していない) 対照の AM 液に比してかなり稀薄であつた。この

イオンによる沈澱形成

クロロマイセチン (C M)			ストレプトマイシン (S M)			ペニシリン (P)						2,4-ジニトロフエノール (DNP)														
10 ⁻⁴ M			10 ⁻⁵ M			10 ⁻³ M			10 ⁻⁴ M			2000u/ml			200u/ml			10 ⁻⁴ M			10 ⁻⁵ M					
0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18	0	2	18
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

各薬剤水溶液0.3ml, 蒸溜水を適宜追加し総量3.0mlとす。

上清を出来る限りのぞいた後、M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 及び IN HCl 数滴を加えて沈澱を溶解させた後、これを凝固直前迄冷却した融解普通寒天 (pH 7.0) に加え混和後、その平板を調製した (この際の寒天培地中に於ける AM の濃度は、一応最初に添加した AM の全部が沈澱したものとみなして、AM 終濃度 10⁻⁴M となる様に調製した)。

この寒天平板上に E. coli 及び M. pyogenes var. aureus (寺島) を塗抹し、37°C, 18~48時間培養し観察したが、何れの菌の発育も完全に阻止された。

総括及び考按

金属イオンが抗生物質に及ぼす影響に関しては、緒言に於て記述した如く、かなり多くの人が検討し報告している。それらの中、氏家²⁾³⁾は8種の抗生物質に対して8種の金属イオンを添加し、その抗菌力に及ぼす影響を広く研究し検討している。その報告に於て、テトラサイクリン系物質 50γ/ml¹⁰=10⁻⁴M (液の pH は 4.0~5.0) に対する Fe⁺⁺⁺, Fe⁺⁺, Al⁺⁺⁺ (総べて5×10⁻³M) の添加は、すべてその発育阻止円 (pH 6.5 の普通寒天に抗生物質と金属イオンの混和液を浸透さす) を著しく縮小せしめること、そしてこの現象はこれらの金属が水酸化物として沈澱を生じ、同時に抗生物質も金属と結合した儘沈澱することによると推論している。更に稀釈金

属塩液 (2.5×10⁻⁵M Fe⁺⁺⁺ 及び Fe⁺⁺, 10⁻³M Mg⁺⁺ 等) を使用した実験に於て、Fe⁺⁺⁺, Fe⁺⁺ 及び Mg⁺⁺ がテトラサイクリン系物質の抗菌力を可成り著明に低下する事、但し Mg⁺⁺ の添加により生ずる抗菌力減弱は Mg⁺⁺ により供試菌 (E. coli) が旺盛に増殖する為抗生物質の抗菌力は自然減弱する結果ともいえ、抗生物質に及ぼす直接的影響としては認め難いと報告している。

一方、赤沢⁴⁾は Mg⁺⁺ の細菌に対する呼吸促進作用が AM により拮抗される事を報告し、又三浦⁵⁾はテトラサイクリンの作用が Mg⁺⁺ との結合によるものではなからうかと云っている。

著者等の実験に於て、Fe⁺⁺ (10⁻³M) 及び Mn⁺⁺ (10⁻³M) は pH 7.0 の磷酸緩衝液に添加した場合、それ自体で強く沈澱 (水酸化物) を形成した。従つて、氏家の云う如く、これらの金属イオンの水酸化物が沈澱してゆく時抗生物質を何等かの形に於て吸着して沈澱してゆく事は容易に想像される処である。

又一方、Mg⁺⁺ (10⁻², 10⁻³M) 及び Mn⁺⁺ (10⁻⁴M) は pH 7.0 磷酸緩衝液に添加した際認むべき沈澱を全く形成しなかつたが、これに更に AM (10⁻³, 10⁻⁴M) 又は TM (10⁻³M) を添加した際著明な黄色沈澱を生じた。そしてこの黄色沈澱は pH 6.5 以上に於て形成され、pH の上昇とともに著明となり、pH 7.0 以上即ち最も生理的な pH 域に於て極めて著明であつた、更にこの黄色沈澱は Fe⁺⁺ の場合

と異り、金属イオンそれ自体では認むべき沈澱は形成されず、AM 乃至 TM を添加した場合にのみ生じた。更に、又この沈澱の酸性溶解液は強い抗菌作用を示した。これらの事実より、AM 乃至 TM が Mg^{++} 又は Mn^{++} と極めて強い結合を形成し、それが一定の pH 及び濃度の状態に於て沈澱となつて析出する事、そしてこの沈澱物は Fe^{++} の場合の単なる水酸化物形成によるものとは異なるものである事が考えられる。

以上より、氏家が AM 又は TM に対する Mg^{++} 乃至 Mn^{++} の強い結合を沈澱の形で証明出来なかつたのはその使用液及び培地の pH が極めて低い寧ろ非生理的ともいふべきものであつた事に由来するものと考えられる。更に氏家は前記の如く Mg^{++} の添加による抗菌力減弱は Mg^{++} の抗生物質に及ぼす直接的影響としては認め難いと報告しているが、著者等の実験から考えて、少くとも AM 乃至 TM に関する限り Mg^{++} は直接的影響を及ぼすものであると考えられる。そしてこの AM 又は TM と Mg^{++} 或は Mn^{++} との直接的作用の事実は、近時テトラサイクリンの主作用として考えられている Mg^{++} との関係に就いて、その直接的結合の証明を与えるものと考えられる。

更に供試諸種抗生物質中 AM 及び TM のみが Mg^{++} 又は Mn^{++} と認むべき沈澱を形成した事は、AM 及び TM が強力に呼吸を阻害する唯一ともいふべき抗生物質である事⁶⁾、又 AM が TM より遙かに強く沈澱を形成した事は AM が TM より強く呼吸を阻害する事⁸⁾ と考え併せて夫々極めて興味

ある知見であると考えられる。

尚、前記の如く AM 及び TM が Mg^{++} 乃至 Mn^{++} と強く沈澱を形成する事実は生理学的実験、殊に呼吸に関する実験に於て、AM 又は TM を金属イオンと同時に使用する場合、殊に高濃度のものを使用する場合に常に留意すべき事であると考ええる。

結 論

1. 10^{-2} ~ $10^{-3}M$ Mg^{++} に 10^{-3} ~ $10^{-4}M$ オーレオマイシンを添加した場合、著明に黄色沈澱が形成された。
2. $10^{-3}M$ Mn^{++} に 10^{-3} ~ $10^{-4}M$ オーレオマイシンを、又 $10^{-4}M$ Mn^{++} に $10^{-3}M$ オーレオマイシンを夫々添加した場合黄色沈澱が形成された。
3. テラマイシンもオーレオマイシンと同様に、 Mg^{++} 又は Mn^{++} 含有液中で黄色沈澱を形成したが、その程度はオーレオマイシンに比して極めて軽度であつた。
4. Mg^{++} にオーレオマイシンを添加した場合の沈澱形成は pH 6.5 以上に於て起り、pH の上昇とともに著明となつた。
5. オーレオマイシンと Mg^{++} とで形成された黄色沈澱の酸性溶解液は強い抗菌作用を示した。

終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師村上栄教授に深甚なる謝意を表し、併せて御協力下さつた徳永君に感謝致します。

文 献

- 1) Clayton, J. C., Hems, B. A., Robinson, F. A., Andrews, R. D. and Hunwicke, R. F.: Biochem. J., **38**, 452, 1944.
- 2) 氏家・日本細菌学雑誌, **10**, 771, 1955.
- 3) 氏家 同上, **10**, 823, 1955.
- 4) 赤沢 岡山医学会雑誌, **66**, 1023, 1954.
- 5) 三浦・第31回日本細菌学会総会特別講演要旨.
- 6) 秋田 岡山医学会雑誌, **69**, 549, 1957.
- 7) 矢部, 秋田, 秋田 岡山医学会雑誌, **69**, 2505, 1957.
- 8) 矢部, 中山, 林, 橋本, 小野: 岡山医学会雑誌, 印刷中.

Precipitate Formation by Metal Ions and Antibiotics,
Particularly Tetracycline Substances

By

Yoshiro Yabe

Sei Hayashi

Goro Nakayama

Hiroyuki Ohnishi

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

Many investigators have reported on the influence of various metal ions on antibiotics. The direct evidence for binding of metal ions with antibiotics is, however, very rare. The authors happened to find the precipitate formation by Mg^{++} ion and aureomycin, and studied this phenomenon on various sorts of metal ions and antibiotics. The results are summarized as follows:

1) A marked yellow precipitate was formed by 10^{-2} — 10^{-3} M Mg^{++} and 10^{-3} — 10^{-4} M aureomycin.

2) A yellow precipitate was formed by 10^{-3} M Mn^{++} and 10^{-3} — 10^{-4} M aureomycin, and was also formed by 10^{-4} M Mn^{++} and 10^{-3} M aureomycin.

3) Just like aureomycin, terramycin formed a yellow precipitate in the presence of Mg^{++} or Mn^{++} . The degree of precipitate formation was, however, very weak as compared with aureomycin.

4) The precipitate formation between Mg^{++} and aureomycin appeared at the pHs over 6.5 and became more marked with the rise of pH.

5) The acid solution of the yellow precipitate formed by Mg^{++} and aureomycin showed a strong antibacterial action.
