抗生物質の抗菌力に及ぼす各種金属イオンの影響(第1報)

氏 家 冬 深

東京大学医学部微生物学教室 (主任 秋葉朝一郎教授)

〔受付: 3月26日1955年〕

序

最近 (1954), 坂口 (千葉大学薬学部薬品分析教室) は, 溶血性連鎖球菌と脱線維馬血液寒天を使用し, 抗生物質の力価測定法である垂直拡散法 (重層法) を以て実験した成績において, 或種の金属塩を (FeCl_3 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$, $\text{Zr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ をオーレオマイシン (以下 AM と略す) の水溶液に加えると, その菌増殖阻止帯が著しく短縮し, 又この際 Ethylenediamine tetraacetic acid 以下 EDTA と略す) — この物質は適当な pH の溶液内で各種金属イオンと結合してそれぞれ安定なキレート化合物をつくる $1:1$ を予め添加しておけば之等金属塩による阻止帯短縮は起らぬことを認めた。私は此報告にもとづいて, AM を中心とするテトラサイクリン系抗生物質の抗菌力が或種の金属イオンの存在により相当に変化することを期待し, 田村 (東大薬品分析教室) の協力を得てベックマン分光光度計を用いた吸光スペクトルの変化から, AM は水溶液内で Fe, Al, Mg, Ca, U, Th, Zr 等の金属と結合し, Cu, Zn, Ni, Co 等とは結合し難い事実を知った。そこで普通の細菌用培地中に常任すると考えられる T 金属イオン 8 種 (Fe^{+++} , Fe^{++} , Al^{+++} , Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} 及び Mn^{++}) を選び, 拡散法と稀釈法の両者を以て実験し, 又同時に主要な他の抗生物質 5 種 (クロマイセチン, ストレプトマイシン, ペニシリン, コリスチン及びアイロタイシン) についても同様, 各種金属イオンの影響とその影響とその影響阻止の見地から EDTA の効果を比較検討した。その結果, 8 種の抗生物質に關して, 8 種の金属イオンの存在による力価変動の有無, その影響の強弱乃至時間的關係等につき多少の知見を得たので報告する。

II. 拡 散 法

1. 実験材料と方法

最初に予備実験として, 溶血性連鎖球菌と脱線維馬血液寒天, 又は黄色葡萄球菌と普通寒天とを使用し, 垂直拡散法 (重層法) 及び水平拡散法 (Cup 法) の両方法

により AM の力価に及ぼす各種金属イオン (Fe^{+++} , Al^{+++} , Mg^{++} , Ca^{++} 等) の影響をしらべたところ, いずれを用いた場合にもほぼ同様の結果を得た。それ故こゝでは説明の便宜から黄色葡萄球菌と普通寒天とを使用した Cup 法の成績を示す。

〔材料〕

菌株—*Staphylococcus aureus* 209P (教室保存株 B-33), *Escherichia coli communis* (同上 B-19) *Escherichia coli* N.I.H.J. (同上)。

培地—基底層は 2.0% 普通寒天 (ポリペプトン 10g, 肉エキス 5g, 食塩 2.5g, Aq. dest. 1000 ml, pH 6.5) の 20 ml, 菌層は 1.5% 同上寒天 10 ml に普通ブイヨン 18 時間培養の菌液 2 ml を混和したものゝ各 4 ml。但し N. I.H.J. 菌に対しては両層共 2.0% 寒天 (ポリペプトン 10g, 肉エキス 3g, 食塩 30g, Aq. dest. 1000 ml, pH 6.5)。

抗生物質—結晶塩酸オーレオマイシン (武田提供) 略号 AM, 結晶塩酸テラマイシン (田辺提供) 略号 TM, 結晶塩酸テトラサイクリン (田辺提供) 略号 TC, 結晶硫酸デヒドロストレプトマイシン (明治) 略号 SM, 結晶クロマイセチン (三共) 略号 CM, 結晶ペニシリン—G カリウム (明乳) 略号 P., 結晶アイロタイシン (塩之義提供) 略号 I., コリマイシン塩酸塩 (八洲化学) 略号 Col.,

EDTA—Disodium Salt of Ethylene diamine tetraacetic acid. (和光純薬工業)。

金属塩—東大薬品分析教室提供の純品。

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

円筒—不銹鋼 (外径 8.0 mm, 内径 6.0 mm, 高さ 10.0

UJIIE Huyumi: Influence of metal ions on the action of several antibiotics. I. Bacteriological Institute, Faculty of Medicine, Tokyo University.—Jap. J. of Bact., 10(9), 771~775, 1955.

第1表 カップ法の阻止円に及ぼす金属イオンと EDTA の効果 (pH 4~5.0)

金属 $5 \times 10^{-3} M$		Fe ⁺⁺⁺	Fe ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	Zn ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Cu ⁺⁺	対 照
抗生物質/ml										
AM 50 r	0	(8.0) ‡	10.5 ‡	12.0 ‡	26.0 —	26.5 —	26.0 +	25.0 —	26.5 —	26.0 —
	+ EDTA	24.5 +	20.5 +	22.0 +	25.5 —	27.0 —	26.0 —	25.5 26.0	26.0 —	26.0 —
TM 50 r	0	(8.0) ‡	11.0 ‡	11.5 ‡	25.0 —	25.0 —	25.5 +	24.0 —	25.0 —	25.0 —
	+ EDTA	22.5 +	17.5 +	20.0 +	25.0 —	25.5 —	25.0 —	24.0 —	25.5 —	24.5 —
TC 50 r	0	(8.0) ‡	12.0 ‡	12.0 ‡	25.0 —	25.5 —	24.0 +	24.0 —	25.0 —	24.5 —
	+ EDTA	21.5 +	18.5 +	21.0 +	24.0 —	25.0 —	24.5 +	24.5 —	25.5 —	25.0 —
CM 25 r		23.0 ‡	23.5 +	24.0 +	23.0 —	23.5 —	23.5 —	24.0 —	26.0 —	24.0 —
SM 50 r		25.0 ‡	25.0 +	24.5 +	25.0 —	26.0 —	25.0 +	26.0 —	25.5 —	26.0 —
P 2.0 U	0	(8.0) ‡	25.0 —	25.0 +	(8.0) +	25.5 —	25.0 +	24.5 —	(8.0) —	25.0 —
	+ EDTA	23.0 —	25.5 —	25.0 —	20.5 —	26.0 —	25.5 —	24.0 —	22.0 —	25.0 —
I 5 r	0	(8.0) ‡	24.5 —	12.0 ‡	24.0 —	25.0 —	26.0 —	26.0 —	25.5 —	24.5 —
	+ EDTA	19.0 —	25.0 —	18.5 —	23.5 —	25.5 —	25.5 —	26.0 —	25.5 —	24.0 —
Col 2500 U	0	11.5 ‡	11.0 ‡	14.0 ‡	14.0 +	17.0 —	16.5 —	14.0 —	13.5 —	14.0 —
	+ EDTA	14.0 +	14.0 +	14.0 +	14.0 —	13.5 —	14.0 —	14.0 —	14.0 —	14.0 —

表の数字は阻止円径 (mm) +, — は寒天面上の沈澱量 () は阻止円の不鮮明なることを示す。

mm)。

【方法】

各金属塩 (又は金属塩+EDTA) 溶液についてその自体では阻止帯を生じない $5 \times 10^{-3} M$ 濃度の水溶液をつくり、10ポンド10分間加熱滅菌 (但し Fe⁺⁺ 溶液のみは Seitzfilter で濾過滅菌) して、之に各抗生物質水溶液を無菌的に添加、それぞれ所要濃度の金属—抗生物質 (又は金属—EDTA—抗生物質) 溶液をつくつた。而して各溶

液の pH (酸性) を対照液の pH と等しく 4.0~5.0 に修正し、予め用意の寒天平板 (SM に対しては *E. coli communis*, Col. には N.I.H.J. その他には 209 P 株の菌層を使用した) のカップに分注し、氷室 (5°C) 内に約20時間放置拡散させた後、37°C の孵卵器で16時間培養し生じた菌発育阻止円の直径を 0.5 mm まで測定して平均した。

2. 成績並びに考按

第2表 EDTA 添加 (等モル) による金属イオンの影響阻止効果

金 属		Fe ⁺⁺⁺	Fe ⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	Zn ⁺⁺	Cu ⁺⁺	対 照
抗生物質/ml	時間						
AM	0	24.5	24.0	24.5			25.0
	24	23.5	23.0	22.0			25.0
	50r	22.0	18.5	22.0			22.5
TM	0	23.0	20.0	22.0			24.0
	24	22.5	17.0	20.5			24.0
	50r	20.5	17.0	19.0			24.0
TC	0	23.0	21.0	22.5			23.0
	24	22.0	20.0	21.5			23.0
	50r	21.5	18.0	20.0			23.0
P	0	35.0			37.5	36.5	39.0
	3	10.0			23.0	(9.0)	39.0
	5 U	(8.0)			(8.0)	(8.0)	38.0
I	0	19.0		26.0			31.0
	3	11.5		22.5			31.0
	6	(8.0)		18.0			30.5
	24			10.0			30.0
	48			(8.0)			30.0

表の数字は阻止円径 (mm) ()は阻止円の不鮮明を示す

第3表 金属-抗生物質溶液の4% NaOH
による沈澱物と濾液の抗菌性の比較

抗生物質/ml	金属	Fe ⁺⁺⁺		Fe ⁺⁺		Al ⁺⁺⁺	
		pH	阻止円 mm	pH	阻止円 mm	pH	阻止円 mm
AM 50r	濾液	3.2	14.0	3.2	(8.0)	3.2	(10.0)
	沈澱		20.5		13.5		20.0
TM 50r	濾液	3.2	13.5	3.2	(8.0)	3.2	(9.0)
	沈澱		19.0		12.0		22.0
TC 50r	濾液	3.2	18.0	3.2	(8.0)	3.2	(8.0)
	沈澱		15.0		12.0		15.0

() は阻止円の不鮮明を示す

表(1)は各抗生物質に関して、それぞれの阻止円の大きさに対する各種金属イオン及び EDTA 添加の影響と拡散後の寒天面上に見られる沈澱物量の関係をまとめたものである。表(1)の成績から次の如き事実が観察された。

イ、テトラサイクリン系物質 (AM, TM, TC) に対し Fe⁺⁺⁺, Fe⁺⁺, Al⁺⁺⁺ の添加はすべてその阻止円を著しく縮小せしめる。作用の強さは大体 Fe⁺⁺⁺ > Fe⁺⁺ > Al⁺⁺⁺ の順であり、この際 EDTA を各金属と

等モルに加えておくと此縮小は相当に回復して対照に近づく。而して回復の程度は各金属イオンと EDTA のつくる Complex の安定度の関係と平行していると考えられる。(Schwarzenbach et al の報告^{1)~7)} によれば、金属-EDTA の Complex の安定度は Fe⁺⁺⁺ > Cu⁺⁺ > Zn⁺⁺ > Fe⁺⁺ > Mn⁺⁺ > Ca⁺⁺ > Mg⁺⁺ の順序である。Al⁺⁺⁺ に関しては確実ではないが Fe⁺⁺⁺ と Fe⁺⁺ の中間に位置するらしい)。又、他の5金属の添加では著しい影響が見られない。

ロ、CM 及び SM の阻止円は8種の金属イオンによつてすべて著しい変化を受けない。

ハ、P に対し Fe⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ の添加はそれぞれその阻止円を殆んど消失せしめる。EDTA を各金属と等モルに加えておけば此縮小はいずれも相当に回復される。又、他の5金属の添加では著しい変化が見られない。

ニ、I. は Fe⁺⁺⁺ 添加でその阻止円は殆んど消失し、Al⁺⁺⁺ の添加でも著しく縮小する。EDTA の等モル添加により可成り回復される。又、他の6金属イオンは著しい影響を示さない。

ホ、Col. は拡散不充分のため確実なことは云えない

が、 Fe^{+++} 及び Fe^{++} の添加で阻止円はやゝ縮小し、 Mg^{++} 、 Mn^{++} の添加で逆にやゝ増大する傾向が見られる。EDTA を等モル加えておくといずれも対照に近づく。又、他の4金属では著しい影響が現れない。

以上の如くである。EDTA の等モル量添加による回復効果が完全でないのは、pH 4~5 の範囲では各金属—EDTA Complex の安定度が未だ完全でなく遊離の金属イオンが残存しているためであろう。さて之等の影響イオン中で、P に及ぼす金属イオンの作用に関しては既に Abraham et al (1942)⁶⁾ が、 Zn^{++} 、 Cd^{++} 及び Pb^{++} が強力に P の効力を失わせることを報告し、又 Clayton et al (1944)⁷⁾ は、P は Fe^{++} や Ag^{+} では影響されないが、 Fe^{+++} の存在で不活性化される事実を認めている。そこで上記の EDTA の効果を利用し、P に対する Fe^{+++} 、 Zn^{+++} 、 Cu^{++} 等の分解作用と、テトラサイクリン系物質(AM, TM, TC)に及ぼす Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} の影響、又、I に及ぼす Fe^{+++} 、 Al^{+++} の影響を時間的に比較した成績が表(2)である。即ち

各金属 ($5 \times 10^{-3}\text{M}$) と各抗生物質の両者をそれぞれ適当な濃度の水溶液 (pH 4.0~4.5) として氷室 (5°C) 内で接触させ、接触直後 (0)~3~6~24~48 時間後の各時期に金属と等モルの EDTA を添加、pH を 5.5 に修正、而して前記同様用意の寒天平板上 Cup に分注し拡散培養後、各阻止円の直径 (mm) を測定比較した。

表(2)の結果から次の如く考えられる。

I、テトラサイクリン系物質に対する Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} の作用は可成り緩慢で 48 時間接触させても各阻止円の縮小は余り著しくない。若し EDTA 添加で各金属イオンを完全に除去出来るならば、対照との差は更に小さくなるだろう。前述の如く、吸光スペクトルの変化から AM と Fe^{+++} 、 Al^{+++} 等との結合が知られるので、構造類似のテトラサイクリン系物質は一般に Fe^{+++} 、 Al^{+++} 、(Fe^{++}) 等と結合して各々 Complex を生じ得ると考えられる。フェロチアンカリを試薬として調べてみると Fe^{+++} (FeCl_3 水溶液) は種々の濃度に関し殆んど拡散しない。それ故、 Fe^{+++} と抗生物質の各 Complex も恐らく同様に拡散し難いものであろう。結局、拡散法においてテトラサイクリン系物質の力価に及ぼす Fe^{+++} (Fe^{++} 、 Al^{+++}) 等の影響は主として両者が結合して拡散困難なる Complex を生ずるためと推察される。但し AM, TM, TC の3者共すべて金属イオンとの接触時間が増すに従いその力価は少し宛減弱してゆき且つその傾向は明らかに対照より早いから、各金属イオンによる緩徐な分解促進の因子も之に加わっているもの

と思われる。

ロ、P の抗菌価は Fe^{+++} 、 Zn^{++} 、 Cu^{++} 等とそれぞれ約 3~6 時間接触させるともはや殆んど回復されない。

ハ、I は Fe^{+++} と約 6 時間、 Al^{+++} とは約 48 時間接触させるとその抗菌価は殆んど回復されない。

以上の如くである。

次に表(1)の成績から拡散後の沈澱物生成に関してテトラサイクリン系物質の阻止円を縮小せしめる Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} はすべて相当量の沈澱物を生じ、又、等モルの EDTA がこの際共存すると沈澱物量はいつも著しく減少している。即ち、抗生物質+金属の酸性溶液が pH 6.5 の寒天中へ滲透拡散してゆく場合、金属は水酸化物として沈澱を生ずると思われるが、同時に抗生物質も金属と結合したまゝ沈澱することも考えられる。この関係を確めるため次の如き実験を行つた。

AM, TM, TC の3者と Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} の各金属 ($5 \times 10^{-3}\text{M}$) の各水溶液 (pH 1.4~3.5) 10ml に 4% NaOH を滴下し pH を中性に近づけると約 4.5 附近で沈澱を生じ始め 6.0~7.0 で極大量に達した。そこで之を濾過して濾過液と沈澱物 (蒸留水で2回洗滌後、10%醋酸数滴に溶解し 10ml の水溶液とする)。溶液と両者のもつ抗菌力を再び Cup 法で比較した。分別沈澱により最初の沈澱物に最も抗菌性の大きいことを知り、pH 4.5 附近の沈澱を採集し (3) 表の如き成績を得た。

さて表(3)の成績から、AM, TM, TC それぞれの各沈澱物溶液は程度の差はあるがいづれもはつきりした抗菌性(阻止円)を示し、且つその大多数において濾過液の抗菌性より大きいことが判つた。しかし実際に寒天中へ拡散してゆく場合と NaOH 液を加えて沈澱を生ぜしめる上記の如き場合とは条件が同一ではないので此成績だけから確実なことは云えないが、拡散の際に Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} 等の金属がテトラサイクリン系物質と結合し、それぞれ AM 塩、TM 塩、TC 塩等の形で沈澱物中に含まれている可能性は充分考えられる。

小 括

適当な濃度の弱酸水溶液内において、抗生物質 8 種の各抗菌力に及ぼす Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} 、 Zn^{++} 、 Mg^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、 Cu^{++} 等 8 種の金属イオン (各 $5 \times 10^{-3}\text{M}$) の影響を拡散法 (Cup 法) で検討し次の如き成績を得た。

I、テトラサイクリン系物質 (AM, TM, TC 各 50r/ml) の力価は Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Al^{+++} が存在するとそれぞれ著しく減弱する。而してその主因は之等 3 物質が各金属イオンと結合して拡散困難なる Complex を

形成するためであり、副因は各金属イオンの存在で徐々に分解を促進されるためと考えられる。

ロ, CM (25r/ml) 及び SM (50r/ml) の力価は著しい影響を受けない。

ハ, P (U/ml) の力価は Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} の存在でそれぞれ消失する。即ち, 5°C で 3~6 時間接触させるとその大部分が分解されると考えられる。

ニ, I (r/ml) の力価は Fe^{+++} の存在で殆んど消失し, Al^{+++} の存在で著しく減弱する。即ち, 5°C で Fe^{+++} と 3~6 時間, Al^{+++} と約 24~48 時間接触させるとその抗菌力を殆んど失うと思われる。

ホ, Col (2500U/ml) の力価に関しては、拡散が充分行われなかつたが Fe^{+++} , Fe^{++} の存在でそれぞれ減弱し, Mg^{++} , Mn^{++} の存在で逆にそれぞれ増大する傾向が認められた。

以上、各項において特に記載しない金属は凡て著しい影響を示さなかつた。又、いずれの場合においても各溶液に予め金属と等モル量 ($5 \times 10^{-3}\text{M}$) の EDTA を添加すれば、各金属イオンの作用は EDTA と結合してつくる Complex の安定度に応じ著しく軽減された。

(文献は第 2 報に記載する)。