タイロシンの安定性および抗菌力に及ぼす 金属イオンの影響—Ⅲ.

金属イオンの存在下で起るタイロシンの加熱失活の
機作および、その生成物について

河端俊治・渋谷公代・鈴木 健

(1965 年 8 月 30 日受理)

EFFECT OF METAL IONS UPON THE HEAT STABILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TYLOSIN—III. MECHANISM OF THE HEAT INACTIVATION OF TYLOSIN BY THE ACTION OF CERTAIN METAL IONS AND IDENTIFICATION OF THE DEGRADATION PRODUCT.

Toshiharu KAWABATA, Kimiyo SHIBUYA and Takeshi SUZUKI*

Tylosin, a macrolide class antibiotic, has been reported to be a fairly heat stable substance. In the previous papers¹⁾, the antibacterial activity of tylosin was found to be lowered by heating with Fe^{+++} , Al^{+++} or Sn^{++} at low acid pH. The present work aimed to elucidate the mechanism of inactivation of tylosin by the action of such metal ions as Fe^{+++} , Al^{+++} and Sn^{++} at elevated temperature at low pH, and the identification of a degradation product of tylosin was carried out.

Results obtained may be summarized as follows:

1. Inactivation caused by different metal ions ceased at respective constant level after being heated between 15 minutes and 3 hours at 100°C with each 300 ppm of test metal ions (Table 1).

2. With a lower metal concentration, the rate of inactivation of tylosin ran parallel with the increase in concentration, however, beyond a certain limit, the rate of inactivation kept at a constant level. The maximum level of inactivation of tylosin were 60% with Fe^{+++} , 46% with Al^{+++} and 41% with Sn^{++} , respectively (see Tables 2 and 3).

The inactivation of tylosin caused by metal ions depended much upon the pH value of test solution. When the pH value of test solution containing Fe^{+++} was adjusted to 2.5, there occurred no marked change in the rate of inactivation nevertheless the presence of 1.6 to 100 fold amount of Fe^{+++} against tylosin in terms of molecular weight (Table 5). The antibacterial activity of an acid degradation product with Fe^{+++} was found to correspond with that of O-mycaminosyl tylosin (O.M.T.), a degradation product of tylosin (Table 6 and Fig. 5).

3. No appreciable change in the antibacterial activity of O.M.T. was noted when it was heated at 100°C for 1 hour in the presence of each 300 ppm of Fe^{+++} , Al^{+++} or Sn^{++} (Table 4).

4. The products obtained from tylosin, desmycosin or O.M.T. by heating with equimol amount of Fe^{+++} in acid condition were found to correspond to O.M.T. by the thin layer

* 国立予防衛生研究所食品衛生部 (Department of Food Research, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan)

chromatography (Figs. 1 and 2). The melting point of this degradation product of tylosin with Fe^{+++} was found to be 117°C which coincided with that of standard O.M.T., in addition, no appreciable change in the melting point was noted when both of the product and standard O.M.T. were mixed together. The pattern of infrared spectrum of this product was coincident to that of O.M.T.

The aforementioned facts might indicate that the product is O.M.T.

5. The mechanism of decreasing in the tylosin activity by heating with such metal ions as Fe^{+++} , Al^{+++} or Sn^{++} would be the following; firstly, tylosin will convert into desmycosin by liberating mycarose (at pH less than 5), and secondly, the resultant desmycosin will lose mycinoose to convert into O.M.T. by the action of metal ions, especially at pH less than 3.

ま え が き

前報¹⁾において macrolide 系抗生物質の1種であるタイロシン (Tl) の加熱安定性に対する pH の影響, 各種金属イオンの存在下で Tl を加熱したときの抗菌力の変化について報告した。その結果 Tl は pH 7~8 においては金属塩の存在下で加熱しても (100°C , 1時間), ほとんど失活は見られなかったが, pH 6 の磷酸塩緩衝液および nutrient broth 中では各 300ppm の Fe^{+++} および Al^{+++} が存在すると抗菌力の低下がみられ, また蒸留水中では上記2種の金属のほか Sn^{++} によつても抗菌力の低下がみられた。Tl は pH 5 以下の酸性では分子を構成している mycarose を失い, デスマイコシン (Dm) に変化することが知られている²⁾。pH 6 の緩衝液や broth, また蒸留水中に前記金属塩を加えると pH は著明に低下する。金属イオンの存在下で Tl の失活が起るのは, 先づ Tl が Dm に変わり, さらに金属塩の影響で分解が進むものと推定されたので, 今回の実験では, 金属イオン (Al^{+++} , Fe^{+++} , Sn^{++}) の濃度, 加熱時間の影響を通じ, Tl の分解形式を追求し, さらにその分解生成物の同定を行なった。

実 験

実験 1. Al^{+++} , Fe^{+++} , Sn^{++} 存在下における Tl の不活性化に及ぼす加熱時間の影響

実験材料および方法:

Tl 溶液 (タイロシン乳酸塩, ELI LILLY and Co. 製, Lot No. 294-172 AD-262 F)……40ppm

金属塩溶液…… $\text{Al}^{+++}(\text{AlCl}_3)$, $\text{Fe}^{+++}(\text{FeCl}_3)$, $\text{Sn}^{++}(\text{SnCl}_2)$ ……それぞれのイオンとして 300ppm の水溶液。

Table 1. Effect of Heating Period on the Inactivation of Tylosin in the Presence of Various Metal Ions.

Test solution: A mixture of 1ml of tylosin at 40ppm and 1ml of metal solution at each 300 ppm as Fe^{+++} , Al^{+++} or Sn^{++} .

Heating temperature; at 100°C .

Heating period	Change in ID_{50} in ppm		
	Fe^{+++}	Al^{+++}	Sn^{++}
15 min.	0.34	0.28	0.26
30 "	0.34	0.28	0.26
1 hr.	0.34	0.28	0.26
2 "	0.34	0.28	0.26
3 "	0.34	0.28	0.26
Control (unheated)	0.20	0.18	0.16

上記 Tl および金属塩溶液の 1ml ずつを目盛付共栓試験管に入れ, 沸騰水浴中で 15 分から 3 時間まで加熱した。加熱後の抗菌力は前報¹⁾同様 *Staphylococcus aureus* H と倍濃度 DIFCO nutrient broth (pH 7.0) を用いる比濁法により 50% 発育阻止濃度 (ID_{50}) を求め, Tl の ppm 数にて示した。

結果: 得られた結果は Table 1 に示す通りで, 失活の程度は $\text{Fe}^{+++} > \text{Sn}^{++} > \text{Al}^{+++}$ であったが, 加熱時間による影響は全く見られなかった。

実験 2. Tl の加熱不活性化に及ぼす Fe^{+++} 濃度および被検液 pH の影響

前報¹⁾にて検討した金属イオン濃度は 300ppm と一定であったので, ここでは種々濃度の Fe^{+++} について Tl の加熱不活性化に対する影響を調べた。なお蒸留水中では Fe^{+++} 濃度によつて pH が変わってくるので, 被検液の pH を 2.5 に修正したとき

の実験も併せて行なつた。

実験材料および方法：

Tl 溶液（実験 1 と同じ）……40ppm

Fe⁺⁺⁺(FeCl₃)……450ppm 溶液を出発に倍数希釈を行ない、3.5ppm までの 8 段階の濃度の Fe⁺⁺⁺ 水溶液を作製した。

別に 900ppm から 7.0ppm までの 8 段階の Fe⁺⁺⁺ 希釈液を作り、それぞれ BECKMAN G 型 pH 計を用い、稀 HCl を加えながら pH 2.5 に修正し、水を加えて始めの溶液の倍量にした。これにより pH 2.5 に調整した 450ppm から 3.5ppm までの Fe⁺⁺⁺ 溶液ができたことになる。

被検液は同量の Tl と Fe⁺⁺⁺ 溶液を加えた共栓試験管中を沸騰水浴液中で 1 時間加熱した。なお 450ppm から 3.5ppm の Fe⁺⁺⁺ は 40ppm の Tl に対するモル濃度で 200 倍から 1.6 倍に相当する。また上記被検液と同一条件で作製し、加熱した Tl-Fe⁺⁺⁺ 混合液の pH 値を BECKMAN G 型 pH 計で測定した。また加熱後の被検液中の Tl 力価は実験 1 と同様に測定した。

結果：

得られた結果は Table 2 に示してある。同表には対照 Tl の ID₅₀ 値との比から不活性化率を示した。これからわかるように pH を修正しない場合、Fe⁺⁺⁺ の濃度の高まるにつれ、不活性化が高まる傾向を示したが、不活性化は 63~67% でプラトーを示した。これに対し pH を 2.5 に修正した場合、Tl に対しモル濃度で 1.6~100 倍までの Fe⁺⁺⁺ では不活性化は一定であつた。ここで測定誤差を考慮すれば pH を修正しない時に一定レベルで留まつた不活性化率は pH 2.5 の場合とほぼ同じで約 60% あると考えられる。なお Fe⁺⁺⁺ が 450ppm (Tl に対するモル比で 200) ではやや高い不活性化率を示した。

実験 3. Tl の加熱不活性化に及ぼす Al⁺⁺⁺ および Sn⁺⁺ 濃度の影響

実験材料および方法：

Tl 溶液（実験 1 と同じ）……40ppm

Al⁺⁺⁺ 溶液 (AlCl₃)……Al⁺⁺⁺ として 1.2, 2.4, 6, 12, 60, 120ppm (40ppm の Tl に対し、モル濃度で 1, 2, 5, 10, 50, 100 倍に相当)

Table 2. Effect of Concentration of Fe⁺⁺⁺ on the Heat Inactivation of Tylosin.

Test solution: A mixture of 1ml of 40ppm of tylosin and 1ml of metal solution of varying concentration.

Heating; at 100°C for 1 hour.

Conc. of Fe ⁺⁺⁺ ppm (Mol. weight ratio)		pH of test solution was not adjusted.			pH of test solution was adjusted to 2.5		
		pH value after heating	ID ₅₀ in ppm	Rate of inactivation, %	pH value after heating	ID ₅₀ in ppm	Rate of inactivation, %
3.5	(× 1.6)	4.48	0.25	44	2.87	0.43	60
7	(× 3.1)	4.03	0.34	59	2.90	0.44	61
14	(× 6.3)	3.68	0.38	63	2.95	0.43	60
28	(× 12.5)	3.31	0.40	65	2.85	0.44	61
56	(× 25)	3.00	0.45	67	2.71	0.41	61
113	(× 50)	2.68	0.45	67	2.55	0.40	60
225	(× 100)	2.37	0.48	69	2.32	0.46	65
450	(× 200)	2.09	0.55	73	2.13	0.50	68
Control Tl			0.15			0.16	
" Dm			0.22			0.23	
(unheated)							

Table 3. Effect of Concentration of Al⁺⁺⁺ or Sn⁺⁺ on the Heat Inactivation of Tylosin.

Test solution: A mixture of 1ml of tylosin at 40 ppm
and 1ml of metal solution.

Heating; at 100°C for 1 hour.

Conc. of Al ⁺⁺⁺ ppm (Mol. ratio)	Al ⁺⁺⁺			Conc. of Sn ⁺⁺ ppm (Mol. ratio)	Sn ⁺⁺		
	pH value after heating	ID ₅₀ in ppm	Rate of inactivation, %		pH value after heating	ID ₅₀ in ppm	Rate of inactivation, %
1.2 (× 1)	5.21	0.16	6	5 (× 1)	4.43	0.21	19
2.4 (× 2)		0.16	6	10 (× 2)		0.20	15
6 (× 5)		0.28	46	25 (× 5)		0.24	29
12 (× 10)	3.60	0.28	46	50 (× 10)	3.21	0.29	41
60 (× 50)		0.28	46	250 (× 50)		0.29	41
120 (× 100)	3.36	0.28	46	500 (× 100)	2.61	0.29	41
Control Tl (unheated)		0.15		Control Tl (unheated)		0.17	

Sn⁺⁺ 溶液 (SnCl₂)····Sn⁺⁺ として 5, 10, 25, 50, 250, 500ppm (Tl に対するモル濃度は Al⁺⁺⁺ の場合と同様)

被検液は同量の Tl と金属塩溶液を混じたもので、pH はとくに修正しなかつた。被検液は沸騰水浴中で 1 時間加熱後、実験 1 と同様に ID₅₀ を測定した。なお被検液と同一組成の Tl-金属塩混合液について、加熱後の pH 値を BECKMAN G 型 pH 計にて測定した。

結果:

得られた結果は Table 3 に示した。この表からわかるように Tl に対し 5 倍モル以上の Al⁺⁺⁺ では 46%, 10 倍モル以上の Sn⁺⁺ では 41% と、失活の程度はそれぞれ一定レベルで留まつた。

実験 4. O. M. T. の加熱安定性に及ぼす金属イオンの影響

O. M. T. は Tl の関連物質の 1 つである。Tl 分子から mycarose のとれた物質がデスマイコシン (Dm) であり、Dm から mycinose がとれた物質を O-mycaminosyl tylosin (O. M. T.) と名付けられている⁴⁾。Dm も O. M. T. も依然として抗菌力を有している (Table 6 参照)。今までの実験では Tl が pH 5 以下の酸性側で加熱されると Dm になり、さらに Fe⁺⁺⁺, Sn⁺⁺, Al⁺⁺⁺ の存在下で加熱されると失活が起ることを明らかにした。

しかしこの失活はあるレベルで停止することも明らかであるので、ここでは上記金属イオンの存在下での分解生成物が O. M. T. ではないかという想定の下に (その理由については考察に述べる), O. M. T. の加熱安定性に対する Al⁺⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Sn⁺⁺ の影響を調べた。

実験材料および方法:

O. M. T. 溶液: ELI LILLY and Co. 製 Lot. No. 644-591-190-2, 1,000 ppm 水溶液を作り, 5 ml ずつ分注しフリーザー中にて保存。用時融解し, 40ppm の溶液を作成。

金属塩溶液: Al⁺⁺⁺(AlCl₃), Fe⁺⁺⁺(FeCl₃), Sn⁺⁺(SnCl₂) イオンとして各 300ppm

(1) 加熱時間の影響

1ml の O. M. T. (40ppm) と各 1ml の金属塩溶液を混合したものを被検液とし, 実験 1 と同様, 沸騰水浴中にて 15 分から 3 時間まで加熱した。加熱後の O. M. T. の力価の測定は実験 1 と同様に行なつた。

(2) 金属イオン濃度の影響

Table 5 (1) に示した濃度の Fe⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺ または Sn⁺⁺ 各 1ml と, 40ppm の O. M. T. 溶液 1ml を混合した被検液を 100°C で 1 時間加熱し, O. M. T. の力価は実験 1 と同様に測定した。なお使用した

Table 4. Effect of Heating Period on the Inactivation of O.M.T. in the Presence of Metal Ions.

Test solution: A mixture of 1ml of tylosin at 40ppm and 1ml of metal solution each at 300 ppm as Fe⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺ or Sn⁺⁺.

Heating temperature; at 100°C.

Heating period	Change in ID ₅₀ in ppm		
	Fe ⁺⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	Sn ⁺⁺
15 min.	0.21	0.19	0.21
30 "	0.21	0.18	0.23
1 hr.	0.23	0.18	0.23
2 "	0.23	0.18	0.23
3 "	0.27	0.18	0.23
Control O. M. T. (unheated)	0.19	0.18	0.21

金属イオンの濃度は 40ppm の Tl に対し、モル濃度で 1, 10, または 100 倍に相当する。

結果:

加熱時間の影響は Table 4 に、金属イオン濃度の影響は Table 5 に示した。O.M.T. の

安定性は金属イオンの濃度および加熱時間にほとんど影響されなかつたが、300 ppm の Fe⁺⁺⁺ の存在下で 3 時間加熱したときにはやや抗菌力の低下が認められた。

実験 5. Tl およびその関連物質の Fe⁺⁺⁺ の存在下での加熱分解生成物の薄層クロマトグラフィー

Tl と Dm はペーパークロマトグラフィーにより容易に分離できるといわれているが、追試してみると記載の条件では必ずしも良好な結果が得られなかつた。さらに 10 数種の溶媒系について検討したが望ましい結果が得られなかつた。そこで薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離を試みたところ、よい結果が得られたので、この方法により、Tl とその関連化合物、構成糖類および Fe⁺⁺⁺ の存在下で加熱した際生成する物質の確認を行なつた。

実験材料および方法:

薄層: シリカライダー (第 1 化学製) 厚さ 0.25mm

展開溶媒: メタノール・クロロホルム・水 (2:1:1.5) または酢酸エチル・メタノール (1:1)

発色法: 1) ヨード

2) ベンチジン溶液 (5% ベンチジン, 氷酢酸溶液, 40% トリクロル酢酸, エタノール; 1:1:8)。噴霧後 110°C で数分加温する。

3) 20% H₂SO₄ 噴霧後黒いスポットの生ずるまで加温する。

スポットの抗菌力の測定: ヨードガスで現われたスポット部分のシリカライダーをスパーテルにてかきとり、50% エタノールにて抽出後、抽出液のエタノールを減圧にて除去し、残留液を第 1 報¹⁾にて記載したシリンダー・プレート法にて測定した。

Tl, Tl 関連物質および構成糖の標品についての TLC:

Table 5. Effect of Concentration of Metal Ions on the Heat Inactivation of O.M.T.

Test solution: A mixture of each 1ml of O. M. T. at 40 ppm and 1ml of metal solution.

Heating; at 100°C for 1 hour.

(1) Concentration of test metal solutions:

	Metal ions in ppm		
	Fe ⁺⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	Sn ⁺⁺
Equi-mol to 40 γ of O. M. T.	4	2	8
× 10 mol	40	20	80
× 100 mol	400	200	800

Note: A 40γ of O.M.T. corresponds to 3.9γ of Fe⁺⁺⁺, 1.9γ of Al⁺⁺⁺ or 8.4γ of Sn⁺⁺, respectively.

(2) Results:

Metal ions	ID ₅₀ in ppm			
	Equi-mol	× 10mol	× 100mol	Control O.M.T.
Fe ⁺⁺⁺	0.19	0.22	0.22	0.21
Al ⁺⁺⁺	0.19	0.19	0.19	0.21
Sn ⁺⁺	0.21	0.21	0.21	0.21

Tl : ELI LILLY and Co. 製 Lot. No. 294-172 AD-262 F

Dm: 同 上 " " 361-370 B-126-6

タイロシン C(Tl-C)*: 同 上

タイロシン D(Tl-D)**: 同 上 373-537-142 B

O. M. T.: 同 上 " " 644-591-190-2

mycarose: 同 上 " " 373-537-202 B

mycinose: 同 上 " " 373-537-202 A

mycaminose: 同 上 " " 373-537-202 C

上記各 1,000ppm の水溶液を調製, ただし Tl は乳酸塩として, mycaminose は塩酸塩として, なお Tl-C および Tl-D は参考品として供試した。上記水溶液を 0.01 ml ずつ原点につけ, 同一条件で3枚の薄層を展開した。展開後, 1枚はヨードにて発色後, 抗菌力測定に, 他はベンチジンおよび H_2SO_4 による発色を行なった。

Tl, Dm, O. M. T. を Fe^{+++} と共に加熱したものもの TLC:

1,000 ppm と 10,000 ppm の Tl, 1,000ppm と 10,000ppm の Dm および 1,000ppm の O. M. T. 水溶液各 1ml に, それぞれ等モルに当る $\text{Fe}^{+++}(\text{FeCl}_3)$ 1ml ずつ加え, 沸騰水浴中にて1時間加熱したものを試料とした。これら試料液の各 0.01 ml を原点につけ, 薄層を展開した。なお対照として各 1,000ppm の Tl, Dm および O. M. T. 標品溶液について同一条件で展開した。溶媒および発色法は前記の通りである。

Fig. 1. A Thin Layer Chromatogram of Tylosin and its Related Compounds.

Adsorbent:

Silica Rider (Daiichi Kagaku and Co.)

0.25mm

Solvent:

Ethylacetate-Ethanol (1 : 1)

Coloring reagent:

Benzidine-trichloroacetic acid soln.

Fig. 2. A Thin Layer Chromatogram of Tylosin, Desmycosin and O.M.T., and their Products treated with Fe^{+++} in Acid Condition.

Adsorbent, developing solvent and coloring reagent are same as shown in Fig. 1.

* タイロシン C: Tl 分子中の mycinose の $-\text{OCH}_3$ が $-\text{OH}$ にて置換したもの。ただし使用した標品中には 20~30% の Tl-D が夾雑していた。

** タイロシン D: Tl のマクロライド分子中の $-\text{CHO}$ が $-\text{CH}_2\text{OH}$ にて置換したもの。

Fig. 3. Preparation of the Heat Degradation Product of Tylosin in the Presence of Ferric Ions.

結果:

Fig. 1 および Fig. 2 には酢酸エチル-エタノールを溶媒としたときのクロマトグラムを示した。Fig. 1 からわかるように、Tl と Dm は Rf 値からも明確に区別できるが、Dm と O. M. T. とは同一 Rf 値を示し、Tl-C は 2 成分、Tl-D はベンチジンにて発色しなかつた。mycarose と mycinose はほぼ同一 Rf 値を示したが、前者はベンチジンで黒褐色、後者は黄色を呈することにより容易に区別できることがわかつた。mycaminose は他の 2 種の糖より Rf 値が小さく、かつ黄色に発色した。

Fig. 2 に示したように、Tl, Dm, O. M. T. にそれぞれ等モル量の Fe^{+++} を加えて加熱したときの生成物の Rf 値は同じであつた。被検液として 1,000ppm の Tl, Dm, O. M. T. を使用したときには、原点には 5 γ に相当する量が付着したことになるが、この量では分離した糖の確認はできなかつた。しかし 10,000ppm の場合 (原抗生物質として 50 γ に相当)、明確に遊離した糖が検出された。すなわち、Tl から黒褐色のスポット (mycarose) が、Dm からは黄色スポット (mycinose) が遊離することがわかつた。一方 O. M. T. からは遊離糖は検出されなかつた。Tl はすでに述べたように、酸性側で容易に mycarose を失つて Dm に変化する。Tl の Fe^{+++} による分解は酸性側でのみ起こることから、この場合必ず Dm を経るにちがいない。つまり酸性における Fe^{+++} の影響は Tl がまず Dm となり、さらに Dm が

分解されるものと考えられる。事実 Dm からは図に示したように mycinose が遊離し、生成物は O.M.T. に相当するものが生成した。ただ Tl の分解物についてみると黒褐色のスポットのみが検出されたが、mycarose と mycinose は Fig. 1 に示したように同じ Rf 値であるので、これが重なつて、mycinose の黄色が、mycarose の暗褐色のスポットによつてマスクされたと考えられる。

実験 6. Tl とその関連化合物および Tl を Fe^{+++} とともに加熱したときの生成物の赤外線吸収スペクトル

実験材料および方法:

Tl (タイロシン乳酸塩): 実験 5 と同一品

Dm : 同上

O. M. T. : 同上

Tl を Fe^{+++} の存在下で加熱したときの生成物試料:

Fig. 3 に示した方法で調製した。なお生成物は実験 5 と同じ条件で TLC を行なつたが、その結果は Fig. 2 に示したクロマトグラムのパターンと一致した。

赤外線吸収測定: 日本分光製 DS-301 型赤外線分光器を使用。なお測定には KBr を使用した。

結果:

得られたスペクトルは Fig. 4 に示してある。現在までには Tl, Dm, O. M. T. のスペクトルの解析は十分に行なわれていないので³⁾、これについては別に検討中であるが、吸収パターンからみて調製した試料と O. M. T. とほぼ一致すると考えてよいであろう。

考 察

Tl は pH 6~8 においては加熱に対し極めて安定な物質である。しかし pH 5 以下では mycarose を失つて Dm に変化する。Tl の加熱安定性に対する金属イオンの影響についてはすでに第 1 報, 第 2 報¹⁾で報告したように、pH 7 および 8 の磷酸塩緩衝液や broth 中では全く失活効果を示さなかったが、蒸留水中では各 300ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} , および Sn^{++} が、そして pH 6 の磷酸塩緩衝液や broth 中では Fe^{+++}

Fig. 4. Infrared Spectra of Tylosin and its Degradation Products.

と Al^{+++} の存在がある程度の失活を起した。つぎに、水溶液中の Tl の加熱失活に対する Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} の濃度と、加熱時間の影響を調べてみると、金属塩の影響はある濃度までは、その濃度が高まるにつれ失活が増大するが、それ以上では一定レベルにとまつた。また加熱時間は調べた範囲ではほとんど関係しなかつた。ところで、金属イオン濃度の高まるということは必然的に被検液の pH の低下を招来する。そこで始めに Tl-金属液混液の pH を 2.5 と一定にしておくと、ほとんど金属塩濃度に無関係に Tl の失活が起り、しかもあるレベルでそれが停止することがわかつた。すなわち Fe^{+++} の存在下ではもとの Tl の力価の 60%, Al^{+++} では 46%, そして Sn^{++} では 41% のレベルで一定値となつた。

次に Tl, Dm, O. M. T. について得た *Staph. aureus* に対する ID_{50} の 5 回の測定値の平均値について、抗菌力と分子量の関係を比較してみると次の Table 6 のようになる。

Table 6. Relative Antibacterial Activities of Tylosin and its Related Compounds.

Test organism: *Staphylococcus aureus* H
 Assay medium: Double strength Difco nutrient broth of pH 7.0.
 Assay method: Turbidimetric, according to TREFFERS.
 Incubation temperature: At 37°C.

Name of compound	Molecular formula	Molecular weight	Relative mol. weight (as tylosin lactate is 1)	ID ₅₀ in ppm	Relative activity (based on same conc.)	Relative activity (based on mol. weight)
Tylosin A* (free)	C ₄₅ H ₇₇ NO ₁₇	904				
Tylosin A (lactate)	C ₄₅ H ₈₃ NO ₂₀	994	1	0.17	1	1
Tylosin B (desmycosin)	C ₃₈ H ₆₅ NO ₁₄	759	0.82	0.25	0.68	0.56
Tylosin C**				0.16	1	
Tylosin D***				0.62	0.25	
O. M. T.****	C ₃₀ H ₄₉ NO ₉	567	0.60	0.25	0.68	0.41

Note: * Tylosin A; synonym of tylosin. Tylosin B; synonym of desmycosin.

** Tylosin C; mycinose in Tylosin (-OCH₃ → -OH), contains 20-30% of Tl-D.

*** Tylosin D; tylosin (-CHO → -CH₂OH).

**** O. M. T.; desmycosin molecule minus mycinose.

この表からわかるように、Tl (乳酸塩) 1 分子当りの抗菌力を 1 とすると、Dm は 0.56, O.M.T. は 0.41 という値が得られた。つまり O. M. T. 分子の抗菌力は Tl の 40% の力価に相当することになる。この数値は Fe⁺⁺⁺ の存在下で Tl を加熱したときの残存抗菌力に相当する。Al⁺⁺⁺ と Sn⁺⁺ は Fe⁺⁺⁺ にくらべ不活性化の程度は低かった。

Tl とその関連化合物の薄層クロマトグラフィーについては、種々な溶媒について検討したが、実験 5 に示したメタノール・クロロホルム・水 (2:1:1.5) または酢酸エチル・エタノール (1:1) が分離能がよかった。とくに後者はスポットが比較的小さく、かつ明瞭であつたので、Fig. 1 および 2 には後者のみを示した。すでに述べたように、Tl は酸性側で加熱すると、mycarose を失つて Dm になり、この Dm が金属イオンの存在下でさらに mycinose を失つて O.M.T. になることが Fig. 2 のクロマトグラムで確認することができた。Tl の構造式は最終的に決定されていないのであるが、現在までに提唱されているものを示すと次のようになる⁴⁾。

Fig. 5. Tylosin and its Degradation Products

次に Tl に Fe^{+++} を加えて加熱生成した物質 (製法は第 3 図に示した) について常法により融点を測定してみると、

O. M. T. 標品	118~120°C
試料	117°C
O. M. T. と試料	117°C

上記のような混融試験の結果からも生成物は O. M. T. と一致するものと考えられる。

また, Tl, Dm, O. M. T. と上記生成物試料の赤外線吸収パターンは Fig. 4 に示したが試料は O. M. T. とほぼ一致した。

以上のように抗菌力, 薄層クロマトグラム, 融点および赤外線吸収スペクトルのパターンからみて, Tl が Fe^{+++} の存在下で加熱生成される物質は O. M. T. と考えて差支えあるまい。

Tl からの O. M. T. の生成機構は pH 5 以下の酸性側で, まず mycaminose-mycarose の結合部分の加水分解が起こり, mycarose がとれて Dm となり, さらに pH 3 以下の酸性で Fe^{+++} などの金属イオンの存在で加熱すると一恐らくこれが触媒的に働くものと推定するが—加水分解により mycinose が遊離し O. M. T. となるものと考えられる。Tl 自体の抗菌力はいうまでもなく O. M. T. 部分の抗菌力によるものであつて, mycaminose が分離されるような条件下では抗菌力は失われるといわれている。Tl およびその糖を失った分解産物の抗菌力は, あたかも分子量に逆比例するという現象は興味があるが, その理由については明らかではない。恐らく, 分子の解離に関係があるのではなからうか。すでに第 1 報, 第 2 報¹⁾でも述べたように Tl, Dm は塩基性物質で, ともに酸性側では抗菌力が弱く, 微アルカリ性で抗菌力は強大になる。とくに pH 8 においては Dm は Tl より大きな抗菌力を示した。いずれにせよ Tl や類似化合物は非解離状態で大きな抗菌力を示すと考えられる。因に, 66% ジメチルホルムアミド中での Tl の pKa 値は 7.1 であり, Dm は 8.0³⁾ といわれている。なお O. M. T. についての pKa 値は報告されていない。

総 括

Tl を Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} の存在下で加熱したときに起る抗菌力の低下様式および, その分解生成物を追求し次のような結果を得た。

1. Tl を各 300ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} の存在下で 100°C で加熱すると, ある程度の不活性化が起るが, 15 分から 3 時間までの加熱では一定であつた。
2. 金属塩の濃度が高まると不活性化は増大するが, これはある一定レベルで停止する。Tl に対する Fe^{+++} の不活性化率は 60%, Al^{+++} のそれは 46%, Sn^{++} では 41% であつた。pH 2.5 に修正すると Fe^{+++} の濃度の影響はほとんどみられなくなり, Tl に対する不活性化は約 60% の一定のレベルであつた。この抗菌力は Tl 分子から mycarose, mycinose のとれた O. M. T. と一致した。
3. O. M. T. は 300ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} または Sn^{++} と 100°C 1 時間加熱しても, 抗菌力に変化はみられなかつた。
4. Tl, Dm, O. M. T. にそれぞれ等モル量の Fe^{+++} を加え, 加熱したときの生成物についてシリカライダーを支持体とする薄層クロマトグラフィー, 融点および赤外線吸収パターンを調べたが, Tl の Fe^{+++} の存在下で生成される物質は O. M. T. と同定された。
5. 以上のことから, Tl の金属イオンの存在下で加熱したときの抗菌力の低下の機構は, まず酸性 (pH 5 以下) で mycarose を失つて Dm になり, さらに Dm が pH 3 以下の酸性で Fe^{+++} などの存在によつて mycinose を失つて O. M. T. に変化する現象であると考えられる。

本実験を行なうに当り, 試料の提供その他種々便宜を与えられた ELI LILLY and Co. および塩野義製薬 K.K. に謝意を表わす。また赤外線分析には予研化学部 竹森栄子さんの協力を得た, ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 河端俊治・渋谷公代・鈴木 健: 本誌 31, 357 (1965); 31, 350 (1965).
- 2) ELI LILLY and Co.: Report, 1962, Tylosin in Food Technology.
- 3) R.L. HAMILL, M.E. HANEY, Jr., M. STAMPER and P.F. WILEY: Antibiotics and Chemotherapy, XI, 328 (1961).
- 4) M. GORMAN: Personal communication.