ネガマイシン軟膏の調製 (第2報¹⁾) 安定性及び抗菌活性の改善について

桑原眞治,^a 不破 亨,^a 入江徹美,^b 上釜兼人,^{*,b} 鈴木啓太郎,^b
柴田元雄,^b 浜田 雅,^c 近藤信一,^c 竹内富雄,^c 梅沢浜夫^c
湧永製薬株式会社中央研究所,^a 熊本大学薬学部,^b
微生物化学研究所^c

Preparation of Negamycin Ointments. II.¹⁾ Improvement in Stability and Antimicrobial Activity

SHINJI KUWAHARA,^a TOHRU FUWA,^a TETSUMI IRIE,^b KANETO UEKAMA,^{*,b}
KEITARO SUZUKI,^b MOTOO SHIBATA,^b MASA HAMADA,^c SHINICHI KONDO,^c
TOMIO TAKEUCHI,^c and HAMAO UMEZAWA^c

Central Research Laboratories, Wakunaga Pharm. Co., Ltd.,^a 1624 Shimokoutachi,
Kouda-cho, Takada-gun, Hiroshima, 729-64, Japan, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kumamoto University,^b 5-1, Oe-honmachi, Kumamoto, 862,
Japan and Institute of Microbial Chemistry,^c 3-14-23,
Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, 141, Japan

(Received November 11, 1985)

To improve stability and antimicrobial activity of negamycin (NGM) in ointment preparation, chemical stability and *in vitro* release of NGM incorporated in ointment bases lacking water phase and the combination effect of NGM and other antibiotics were investigated. *In vitro* release of NGM from fatty alcohol and propylene glycol base was greater than that from plastibase 50 W and hydrophilic poloid. The release rate of NGM was further improved by modifying ingredients and compositions of FAPG base. The combinations of NGM and other antibiotics significantly improved antimicrobial activity against gram-positive bacterium, particularly the combination of NGM and tetracycline. The present data suggest the utility of FAPG base and the efficacy of the combination of NGM and tetracycline in the preparation of NGM ointment.

Keywords—negamycin; ointment; stability; *in vitro* release; combination effect; FAPG base; tetracycline

前報²⁾において、グラム陽性菌・陰性菌による一次膿皮症、二次感染症などの予防、治療を目的とするネガマイシン (NGM) の軟膏剤を調製する上で、基剤からの放出性の面ではゲル基剤 (ハイビスワコー No. 104) が最も優れていることを報告した。しかしながらこの処方について長期安定性試験を実施すると、ゲル基剤中の NGM の化学的安定性の確保は、実際製剤上不十分なことが判明し、また NGM の活性低下は、基剤中の水分による加水分解に起因するものと推察された。そこで本研究では水相を欠く軟膏基剤を用いて詳細な検討を加え、放出性及び安定性に優れる NGM の軟膏剤を設計することができた。さらに、NGM の抗菌活性^{3,4)}の向上に関しても興味ある知見が得られたので報告する。

実 験 の 部

試料及び溶媒 NGM は微生物化学研究所製原末を使用した。他の試薬及び溶媒はすべて市販特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水をさらに蒸留して使用した。

軟膏試料の調製 軟膏基剤には、プラスチックベース 50 W (日本スクイブ)、親水ポロイド (丸石製薬)、及び Table I に示す 4 種処方の主に脂肪族アルコール (fatty alcohol) とプロピレングリコール (propylene glycol) からなる基剤 (FAPG 基剤) を使用した。FAPG 基剤は以下の操作により調製した。プロピレングリコール及びポリエチレングリコール 400 を 90-95°C に加温し、その溶液に 80-85°C で混合、溶融した Table I 中の他の成分を添加後、この混合液を攪拌を続けながら室温まで冷却した。これらの基剤に NGM を均等に混合、研和して

被験試料とした。

放出試験 *In Vitro* による検討——放出装置は Sartorius 社製 SM16753 型軟膏放出シミュレーターを使用し、前報²⁾と同様な方法で8時間までの NGM の放出挙動を観察した。放出液中の NGM は、前報²⁾の high performance liquid chromatography (HPLC) 法に従い定量した。

カップ法による検討——培地には感性ディスク用培地 (日水製薬) を、検定用菌株には *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3923 を用い、前報²⁾と同様な方法で阻止円径を測定した。

抗菌力測定 希釈法⁵⁾——培地は Mueller-Hinton 培地 (Difco) を使用し、検定用菌株として、*Staphylococcus aureus* IFO 3060, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3923, *Proteus vulgaris* IFO 3167, *Serratia marcescens* IFO 3046 を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は前報²⁾と同じ方法で行った。

カップ法⁶⁾——培地は感性ディスク用培地 (日水製薬) を使用し、前報²⁾と同様な方法で阻止円径を測定した。

安定性試験 軟膏試料約 2 g をサンプル管に密封し、25°C の定温器に保存した。経時的に軟膏試料を採取し、軟膏中の NGM の残存量を前報²⁾の生物学的定量法に従い測定した。軟膏試料からの NGM の抽出は以下の操作により行った。軟膏試料 0.3 g を精秤し、クロロホルム 5 ml を加え軟膏基剤を溶解後、pH 6.8 リン酸緩衝液 10 ml を加え、30 分間激しく振とうした。遠心分離 (3000 r.p.m, 15 分間) 後、水相を抽出・希釈し、カップ法の試料とした。

結 果 と 考 察

I. 軟膏基剤からの NGM の放出挙動

軟膏放出試験器による検討 軟膏基剤 (NGM 含量 1 w/w%) からの NGM の放出挙動をセロファン膜を隔膜に用いて検討した。Fig. 1 に示すように、NGM の放出量を時間に対してプロットすると、FAPG 基剤 (処方 A, Table I) からの放出量が最も優れ、次いで親水ポリド、プラスチベース 50 W の順であった。次に、FAPG 基剤について、基剤の組成変化に伴う放出挙動の変化を検討した。Fig. 2 に示すように、処方 C の基剤からの NGM の放出量は、処方 A の基剤に比べて約 2 倍に増加し、前報²⁾のゲル基剤 (ハイビスワコー No. 104, 1.5 w/w%) の場合とほぼ同等の放出性を示すことが認められた。

カップ法による検討 軟膏基剤からの NGM の放出性をカップ法により比較した結果を Table II に示す。各阻止円径は、FAPG 基剤 > 親水ポリド > プラスチベース 50 W の順となり、FAPG 基剤からの放出性が最も優れていた。また、4 種の FAPG 基剤では、処方 A 及び B の阻止円径と処方 C 及び D の阻止円径に有意差が認められた ($p < 0.05$)。これらカップ法による結果は、前述の軟膏放出試験器による検討結果と良く一致している。

Fig. 1. Release Profiles of NGM from Various Ointment Bases at 34°C

■, FAPG A; ▲, hydrophilic poloid; ●, plastibase 50 W. Concn. of NGM in bases was 1.0 w/w%.

TABLE I. Formulae of FAPG Bases (w/w%)

Ingredient	Formula designation			
	A	B	C	D
Stearyl alcohol	25	25	25	25
Stearic acid	5	5	5	5
Polyethylene glycol 6000		5		5
1,2,6-Hexanetriol		5		5
Propylene glycol	70	60		40
Polyethylene glycol 400			70	20

Fig. 2. Release Profiles of NGM from FAPG Bases at 34°C

■, FAPG A; □, FAPG C. Concn. of NGM in bases was 1.0 w/w%.

II. NGM の抗菌活性

NGM 溶液の抗菌活性 4 種類のグラム陽性菌及び陰性菌に有効なゲンタマイシン、カナマイシンを対照として NGM の抗菌力を希釈法により比較検討した。Table III から明らかなように、NGM の抗菌力は *Staphylococcus aureus* IFO 3060 に対してやや劣っているが、3 種のグラム陰性菌に対してはゲンタマイシン及びカナマイシンとほぼ同等の抗菌力を示した。この結果は、NGM がグラム陰性菌感染症に対してゲンタマイシンやカナマイシンと同等の治療効果を示すものと推定される。

NGM 軟膏の抗菌活性 処方 C の FAPG 基剤を用いて調製した NGM、ゲンタマイシン、及びカナマイシンの軟膏試料について、4 種の試験菌に対する阻止円径をカップ法により測定し、その結果を Fig. 3 に示す。なお、ゲンタマイシン、カナマイシンの含量は、それぞれの標準添加量⁷⁾である 0.1 w/w %、2.0 w/w % とした。Fig. 3 から明らかなように、3 種グラム陰性菌に対する NGM 軟膏の阻止円径は、ゲンタマイシン軟膏、カナマイシン軟膏の阻止円径と顕著な差は認められなかった。しかしながら、*Staphylococcus aureus* IFO 3060 に対する阻止円径は小さく、グラム陽性菌に対する NGM 軟膏の抗菌力は不十分なものと考えられる。そこで、グラム陽性菌に対する抗菌力を増強させるため、軟膏基剤中の NGM 含量の増加、または、テトラサイクリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール等の他の抗生物質との併用効果について以下の検討を行った。Fig. 4 に示すように、軟膏基剤中の NGM 含量を増加すると、*Staphylococcus aureus* IFO 3060 に対する阻止円径は増大するが、1.5 w/w % 以上では阻止円径の増大は観察されなかった。一方、他種抗生物質との併用により阻止円径は顕著に増大し、特にテトラサイクリンとの併用が最も有効であることが示唆された。そこで、NGM と他種抗生物質との併用効果を希釈法により検討した。

TABLE II. Effects of Various Ointment Bases on the Inhibitory Zone Diameter^{a)} of NGM Ointments^{b)} for *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3923

Ointment base	Inhibitory zone diameter (mm)
FAPG A	31.5
FAPG B	31.3
FAPG C	32.5
FAPG D	32.3
Plastibase 50W	18.7
Hydrophilic poloid	19.2

a) Mean value of 5 experiments. b) NGM: 1.0 w/w %.

TABLE III. MIC Values of NGM, Gentamicin (GM), and Kanamycin (KM)

Test organisms	MIC (μ g/ml)		
	NGM	GM	KM
<i>St. aureus</i> IFO 3060	25—50	0.78—1.56	1.56—3.13
<i>Ps. aeruginosa</i> IFO 3923	6.25	3.13—6.25	50
<i>P. vulgaris</i> IFO 3167	3.13—6.25	0.78—1.56	1.56—3.13
<i>S. marcescens</i> IFO 3046	3.13—6.25	1.56	3.13

Fig. 3. Inhibitory Zone Diameters of NGM, GM, and KM in FAPG C Ointments
■, NGM (1.0 w/w %); □, GM (0.1 w/w %); ▨, KM (2.0 w/w %).

Fig. 4. Inhibitory Zone Diameters of NGM FAPG C Ointments Containing Some Antibiotics for *Staphylococcus aureus* IFO 3060

○, NGM alone; ▲, NGM (1.0 w/w %) + chloramphenicol; ■, NGM (1.0 w/w %) + erythromycin; ●, NGM (1.0 w/w %) + tetracycline.

TABLE IV. MIC Values of NGM Solutions Containing Some Antibiotics against *Staphylococcus aureus* IFO 3060

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
NGM	25—50
Tetracycline (TC)	0.39
Chloramphenicol (CP)	3.13
Erythromycin (EM)	0.20
NGM+TC (1:1) ^{a)}	0.39
NGM+CP (1:1) ^{a)}	3.13—6.25
NGM+EM (1:1) ^{a)}	0.39

a) Weight ratio.

TABLE V. Stability of NGM in Various Ointment Bases at 25°C

Ointment base	Remaining NGM (%)		
	30	60	90 (d)
FAPG	103.4 $\pm$ 3.24	102.0 $\pm$ 3.52	96.9 $\pm$ 2.67
Hydrophilic poloid	102.5 $\pm$ 9.76	94.1 $\pm$ 1.35	93.2 $\pm$ 1.46
Plastibase 50 W	99.9 $\pm$ 5.27	105.5 $\pm$ 6.79	99.6 $\pm$ 4.96

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 observations.

Table IV に示すように、*Staphylococcus aureus* IFO 3060 に対する MIC 値は顕著に減少し、前記軟膏試料の場合と同様に、テトラサイクリンとの併用が最も効果的であり、これは両者の協力的な作用により効力が増強したものと推察される。これらの知見は、グラム陽性菌及び陰性菌による一次膿皮症、二次感染症に対して、NGM と他種抗生物質を併用することにより優れた治療効果を期待させるものである。

III. 軟膏基剤中の NGM の安定性

FAPG 基剤、親水ポリド、及びプラスチック 50 W 中の NGM の安定性を、25°C で検討した結果を Table V に示す。NGM は、これらの軟膏基剤中で極めて安定であり、90 日後においても NGM の活性の低下はほとんど観察されなかった。この結果は、水相を欠く軟膏基剤を用いると NGM の安定性の確保が可能なことを示唆する。

総 括

本研究で得られた主な知見を以下に要約する。(1) 水相を欠く各種軟膏基剤からの NGM の放出性は、FAPG 基剤が最も優れており、FAPG 基剤の成分組成を変えることにより NGM の放出性はさらに向上し、前報²⁾ のゲル基剤の場合とはほぼ同等の放出性が得られた。(2) 他種抗生物質との併用により、NGM のグラム陽性菌に対する抗菌力は増強し、特にテトラサイクリンとの併用が最も効果的であった。(3) NGM は水相を欠く軟膏基剤中で安定性が高く、FAPG 基剤中でも極めて安定なことが確かめられた。これらの知見は、NGM の軟膏剤を設計する上で、FAPG 基剤の有用性と他種抗生物質との併用の有効性を示唆する。特に NGM とテトラサイクリンとの併用は、グラム陽性菌及び陰性菌感染症の予防・治療に優れた効果を期待させるものである。

引用文献及び注

- 1) 日本薬学会第105年会で発表, 金沢, 1985年4月.
- 2) 桑原眞治, 不破 亨, 小田切優樹, 上釜兼人, 鈴木啓太郎, 柴田元雄, 浜田 雅, 竹内富雄, 近藤信一, 梅沢浜夫, 薬誌, **106**, 313 (1986).
- 3) M. Hamada, T. Takeuchi, S. Kondo, Y. Ikeda, H. Naganawa, K. Maeda, Y. Okami, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **23**, 170 (1970).
- 4) S. Kondo, K. Iinuma, K. Yoshida, K. Yokose, Y. Ikeda, M. Shimazaki, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **29**, 208 (1976).
- 5) S. A. Waksman, H. C. Reilly, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 556 (1945).
- 6) 住木諭介, “抗生物質 (上),” 東京大学出版会, 東京, 1961, p. 122.
- 7) 高野正彦, “今日の皮膚外用剤,” 第1版, 南山堂, 東京, 1981, p. 377.