329. 立岡末雄**, 緒方浩一***, 森本 皎**, 樹下友治** : 抗生物質の研究 (第 9 報)
Anhydrotetracycline 体の生成と生物学的性質

Sueo Tatsuoka**, Koichi Ogata***, Akira Morimoto**, and Tomoharu
Kinoshita** : Studies on Antibiotics. IX. Formation of
Anhydrotetracyclines and their Biological Properties.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.,** and
Institute for Fermentation, Osaka***)

chlorotetracycline (I) を濃塩酸とともに 60° で 30 分間処理すると anhydrochlorotetracycline (II) が生成され, (I) または (II) にヨウ化水素を作用させると anhydrotetracycline (III) が生成し^{1,2)}, また (I) をパラジウムと水素とで還元して得られる tetracycline (IV) を塩酸で処理しても (III) が生成される^{2,3)} ことは Lederle の研究者により知られている. chlorotetracycline (I) の還元で得られる tetracycline (IV) をメタノール性塩酸で処理すると anhydrotetracycline (III) が生成され⁴⁾, chlorotetracycline (I) のメタノール性塩酸処理で anhydrochlorotetracycline (II) が生成される⁵⁾ ことは Pfizer の研究陣によつても発表されている.

chlorotetracycline (I) 並びに tetracycline (IV) を中心とする上記の変化にあたり脱水による芳香族化や脱塩素等が行われていることが知られ, 生成物質 (II) または (III) の構造式もそれぞれ確定されているが, その生物学的性質については僅かに Goodman 等の報告⁶⁾ を見るに過ぎない.

著者等は tetracycline を酸またはアルカリ処理に付し, その抗菌性の変化を検討していたところアルカリでは容易に抗菌性を失うが, 酸処理では抗菌性が残存していることを見た. この抗菌性の残存が原物質 tetracycline の部分的残存によるのか, あるいは抗菌性を持つ他の物質に変化しているからであるかは興味のある事項である. そこでこの酸処理液を検討したところ橙黄色の結晶 mp $210\sim 215^\circ$ が得られ, これが tetracycline とは理化学

* 第 75 回日本薬学会年会で発表 (1955).

** , *** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

- 1) Waller, Hutchings, Broschard, Goldman, Stein, Wolf, Williams : J. Am. Chem. Soc. **74**, 4981 (1952).
- 2) Boothe, Morson, Petisi, Wilkinson, Williams : Antibiotic Annual 46(1953~1954).
- 3) Boothe, Morton, Petisi, Wilkinson, Williams : J. Am. Chem. Soc. **75**, 4621(1953).
- 4) Conover, Moreland, English, Stephens, Pilgrim : J. Am. Chem. Soc. **75**, 4622(1953).
- 5) Stephens, Conover, Pasternack, Hochstein, Moreland, Regna, Pilgrim, Bruning, Woodward : J. Am. Chem. Soc. **76**, 3568(1954).
- 6) Goodman, Matrishin, Backus : J. Bacteriol. **69**, 70(1955).

的性質を異にし, しかも抗菌性を示した.

これとは別に tetracycline を造る目的で前記 Boothe 等の方法^{2,3)}に従い, chlorotetracycline (I) を接触還元し, 目的物 tetracycline·HCl を取った母液をさらに水浴上減圧下で濃縮したところ, この際にも橙黄色の結晶 mp 210~215° が得られ, 正しく前記酸処理の産物と同一であった.

これ等二つの事実から抗菌性を持つこの生成物は前記 Lederle および Pfizer の研究陣が得ている anhydro-tetracycline (III) であろうと考え, Conover 等の方法⁴⁾に従い (III) を造つて比較したところ全く一致した.

著者等が前記のようにたまたま anhydrotetracycline を得たのは, かなり緩和な条件下であることから見て tetracycline 系化合物の脱水芳香族化は必ずしも文献の如く濃厚な酸処理を必要としないことが想像される. しかもこの生成物が抗菌性を示すことは極めて興味あることである. そこで以下これ等の点について検討を加えた.

Anhydro 体の生成条件 i) anhydrotetracycline の生成: tetracycline を希薄な酸例えば 5% HCl と 5 分間加熱すると極めて容易に anhydro 体の塩酸塩が生成する. これをアルカリで処理すると遊離塩基が得られる.

ii) anhydrochlorotetracycline の生成: chlorotetracycline を希薄な鉍酸とともに加熱すると容易に anhydro 体が生成する. 高濃度の酸と室温で処理しても一部 anhydro 体となる. 著者等はこの anhydro 体の生成を濾紙クロマトグラフィーで確認した.

生物学的性質 1. 抗菌スペクトル i) anhydrotetracycline の抗菌力:

Test organism	Antibacterial Spectrum of Anhydrotetracycline									
	Concentration γ /cc.									
	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0
<i>St. aureus</i>	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++
<i>B. subtilis</i>	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++
<i>Sal. typhosa</i>	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++
<i>Sh. dysenteriae</i>	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++
<i>V. cholerae</i>	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++
<i>P. vulgaris</i>	—	—	—	—	±	+	++	++	++	++
<i>E. coli</i>	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++
<i>Ps. aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

The dotted line shows the antibacterial spectrum of chlorotetracycline.

Medium: Katsuo extract, 0.5%, polypeptone, NaCl 0.3%, agar 2.0%, pH 7.0.

Incubation: 37°, 18 hrs.

なお希釈法は検体を目的濃度よりも 10 倍濃く溶かし, その水溶液を 1/10 量ずつ前記培地に加えて固ため, それに試験菌を植えつける.

ii) anhydro 体と chlorotetracycline および tetracycline との比較抗菌像: 次表の如くで, 変形菌に対してはむしろ高い抗菌力を示す.

Test organism	Relative Bacterial Spectrum of Tetracyclines															
	Chloro-tetracycline				Tetracycline				Anhydrochloro-tetracycline				Anhydro-tetracycline			
	E	P	S	B	E	P	S	C	E	P	S	B	E	P	S	B
Concentration γ /cc.																
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	+	—	—	—	++	—	++	++	—	—	—	+	—	+	+
2	—	++	—	—	—	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1	—	++	—	—	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++
0.5	++	++	—	++	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++

E: *E. coli*, P: *P. vulgaris*, S: *St. aureus*, B: *B. subtilis*.

Method: Agar dilution, Medium: Bouillon agar, Incubation: 37°C, 18 hrs.

iii) 抗結核菌作用: anhydrotetracycline 体は鳥型結核菌を抑制するが人型結核菌に対する抗菌力は著しく低い。 a) 鳥型結核菌に対しては 5 γ /cc で抑制作用を示す。 b) 人型結核菌 (H₃₇Rv 株) に対する抗菌力。 検定に際し anhydro 体の 500 γ , 1000 γ は薬剤添加の場合培地を濁濁せしめ、その濁濁度は薬剤濃度に比例する。 また判定時には濁濁度に比例して沈澱を生じ菌の発育程度を判定することは困難であつた。

Antitubercular Activity of Anhydrotetracyclines

Concentration γ /cc.	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	31.25	62.5	125	250	500	1000
Substance	Control													
Anhydrotetracycline	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?
Anhydrochlorotetracycline	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?
Streptomycin	+	+	+	+	+	±	-	-						

Medium: Kirchner medium, Incubation: 37°, 14 days.

2. pH と抗菌像との関係 pH の変化による anhydrotetracycline の抗菌性の変動を知るため検定用培地の pH を HCl および NaOH で 6.0, 7.0, 8.0 に修正し試験した結果次の成績を得た。すなわち anhydro 体は chlorotetracycline や tetracycline と同様酸性側で高い抗菌性を示す。また細菌に対する specificity が低い。

Effect of pH in Test Medium on the Activity of Anhydrotetracycline

Concentration γ /cc.	pH 6.0					pH 7.0					pH 8.0				
Test organism	20	10	4	2	1	20	10	4	2	1	20	10	4	2	1
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>St. aureus</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

Method: Agar dilution, Medium: Bouillon agar, Incubation: 37°C, 18 hrs.

3. 抗生物質生産放射状菌の本物質に対する抵抗性 Goodman 等は anhydrochlorotetracycline が Aureomycin 生産株である *Streptomyces aureofaciens* に抑制的に作用することを報告している。

著者等は著者等の単離にかかる株すなわち chlorotetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol 等 8 種の抗生物質をそれぞれ生産する放射状菌株が anhydro 体に抵抗性を示すか否かを見た。同時に比較のため chlorotetracycline および tetracycline についても検討した。

Resistance of Various Antibiotic-producing Actinomycetes against Chlorotetracycline, Tetracycline, Anhydrochlorotetracycline, and Anhydrotetracycline

Strepto- myces No.	Antibiotic produced	Control 0	Chlorotetra- cycline γ /cc.					Tetracycline γ /cc.					Anhydrochloro- tetracycline γ /cc.					Anhydrotetra- cycline γ /cc.				
			100	50	25	10	5	100	50	25	10	5	100	50	25	10	5	100	50	25	10	5
A-64	Chlorotetracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	+	+	+
A-140	Oxytetracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	+	+	+	-	-	+	+	+
C-2009	Chloramphenicol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-	+	+	+
A-1404	Dextromycin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
A-330	Actinomycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A-1383	Actinomycin	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A-760	Streptothricin (a)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	±	+	+
A-342	Streptothricin (b)	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	±	+	+	+

Method: Dilution method, Medium: Glucose Bouillon agar, Incubation: 28°, 48 hrs.

この結果からこれ等 8 種の放射状菌の繁殖が anhydro 体によつて抑制されることが明らかである。従来抗生物質に対して当該抗生物質生産株が抵抗性を有することはしばしば認められたところであり、上表においても chlorotetracycline 生産株および oxytetracycline 生産株がそれぞれ当該抗生物質に対して抵抗性を示している。しかるに anhydrochlorotetracycline および anhydrotetracycline に対しては他の抗生物質生産株と同様に繁殖が抑制されている。このことから chlorotetracycline や oxytetracycline に抵抗する細菌類も anhydro 体には抵抗性を持たないのではないかと予想されるが、この点については将来機会を得て検討したい。

4. 毒性 マウスに対する毒性は原物質と比較し大差を認めない.

Acute Toxicities in Mice (LD_{50} mg./kg.)

	Chlorotetracycline	Tetracycline	Anhydrotetracycline
Intraperitoneal	192	330	293
Intravenous	155	170	125

以上の諸実験から次のように結論し得る.

1) chlorotetracycline および tetracycline は極めて緩和な鉱酸処理によつてその構造式中の C 環が容易に芳香族化され anhydro 体に変化する.

2) anhydrotetracycline 体は或る程度の抗菌性を保持し, その毒性は母体の tetracycline 体とほぼ同程度である.

3) anhydro 体が chlorotetracycline 生産株および oxytetracycline 生産株に対しても阻止力を持つことからその作用機構は chlorotetracycline および oxytetracycline とは異なることが考えられる.

本研究にあたり終始御鞭撻を賜つた研究所長桑田 智博士, 醸酵研究所長佐藤喜吉博士に謹謝する. なお病原細菌による生物試験を実施された荒木主任研究員, 元素分析および理化学的測定を実施された分析室ならびに理化学室の諸氏, 動物試験を実施された石川一郎氏に感謝する.

実 験 の 部

Anhydrotetracycline 塩酸塩の生成 i) chlorotetracycline から tetracycline を造る場合 anhydro 体の傍生 chlorotetracycline 塩酸塩 15 g を methylcellosolve 150 cc に懸濁, trimethylamine 4.5 cc を加えて溶解, 10% Pd-carbon 5 g を加え室温で接触還元, 反応母液を5倍量の水に投じて放置. 粗製の tetracycline が析出. 収量 5 g. 母液をさらに氷室中に放置しても tetracycline を析出しない. この母液を減圧濃縮, 飴状物質を得. これを butanol に溶解, 塩酸で pH 2.0 にして放置しても tetracycline 塩酸塩の結晶を得ない. 塩酸塩溶液をさらに 1/5 量まで水浴上で減圧濃縮すると mp 130° (decomp) の橙黄色結晶が析出. これを butanol で数回再結晶, mp $210\sim 215^{\circ}$ (decomp) の橙黄色結晶を得. 本品を Conover 等⁴⁾の方法で得た anhydrotetracycline と混融して融点降下せず.

ii) tetracycline を 5% HCl で処理する場合 chlorotetracycline 塩酸塩を接触還元して得た tetracycline base 1 g を 20 倍量の 5% 塩酸とともにアスベスト付金網上で5分間加熱後放冷, 結晶が析出. これを浮取りエーテルで洗浄後メタノールで再結晶, 橙黄色の羽毛状結晶を得. mp 214° (decomp). 収量 0.8~0.9 g (90~100%). $[\alpha]_D^{25}$: $-202\pm 10^{\circ}$ (0.5% in 0.1 N HCl). 赤外部吸収スペクトル $5\sim 6\mu$ に吸収は見られない. 紫外部吸収スペクトル 222, 273, 434 m μ .

Anhydrotetracycline base tetracycline base 1 g を 20 倍量の 5% 塩酸とともに加熱, 冷後析出する結晶を浮取. これを水に溶解, 炭酸ナトリウム水溶液で pH 7~8 とし酢酸エチルで再結晶, 橙黄色の羽毛状品, mp $221\sim 222^{\circ}$ (decomp), 収量 0.7 g (84%). 本品はメタノールに難溶, Cl の焰色反応は陰性. $C_{22}H_{22}O_7N_2$ 計算値 C 62.00, H 5.15, N 6.57, 実験値 C 62.10, H 5.46, N 6.79.

Anhydrochlorotetracycline base の生成 i) 希塩酸で処理する方法 chlorotetracycline base 1 g をメタノール 10 cc に溶解, 水 50 cc および濃塩酸 0.2 cc を加え水浴上で1時間加温, 更に5分間金網上で加熱後放冷, 樹脂様物質が析出, 間もなく固化. これを水に溶解, 10%炭酸ナトリウム水溶液で pH 8.0 とし酢酸エチルで抽出. 酢酸エチル溶液を濃縮すると橙黄色針状品を得. mp 220° (decomp). $C_{22}H_{21}O_7N_2Cl$ 計算値 C 57.32, H 4.56, N 6.08, 実験値 C 56.96, H 5.14, N 5.88.

ii) 希塩酸で処理する方法 chlorotetracycline 0.5 g を 5% 硫酸 10 cc に溶解, 金網上で5~10分間加熱後放冷, 寒天様に固化. これを水に溶解, 10%炭酸ナトリウム水溶液で pH 8.0 とし, 酢酸エチルで抽出. 酢酸エチル溶液を濃縮し橙黄色結晶を得. これを浮取, 酢酸エチル・メタノール混液で再結晶, mp 250° 以上 (220° 付近で黒変). $C_{22}H_{21}O_7N_2Cl$ 計算値 C 57.32, H 4.56, N 6.08, 実験値 C 57.37, H 4.50, N 5.87.

iii) 各種濃度の塩酸, 硫酸と chlorotetracycline との室温における反応 chlorotetracycline base 100 mg を各濃度の酸 10 cc と室温で時々振盪しながら反応させ約1時間後の反応液中の anhydro 体を上昇法による浮紙クロマトグラフィーで検べた. 固定相: Theorell buffer pH 3.0 ϕ . 移動層: 酢酸・ブタノール・水 (1:4:5). Rf: chlorotetracycline 0.63, anhydrochlorotetracycline 0.53 (Azumi filter paper No. 7 使用).

a) 塩酸の場合: 塩酸濃度が 35.0, 17.5% の時には anhydro 体は生成するが 8.5, 4.4, 2.2% の時には生成しない.

b) 硫酸の場合: 硫酸濃度が 95% の時には分解し黒変する. 47.5, 23.75, 11.87, 6.53, 3.0% の時には an-

hydro 体は生成するが、1.5%の時は生成せず。

武田薬品工業株式会社研究所
酸 酵 研 究 所

Summary

It has been found that the heating of chlorotetracycline or tetracycline in dilute hydrochloric acid resulted in the facile formation of the corresponding anhydrotetracycline compounds. These substances had already been prepared by Waller and others¹⁾ and by Conover and others²⁾ from the tetracycline compounds under drastic conditions such as by treatment with hydrogen iodide or with methanolic hydrochloric acid and their structures have already been elucidated. However, since no report has been made on their biological actions, this point was examined.

1) Antibacterial spectrum: Both showed approximately the same antibacterial action against the gram-positive and gram-negative bacteria. Antibacterial action against avian type tubercle bacilli was apparent but extremely small against human type bacilli.

2) Relationship between pH and antibacterial spectrum: High antibacterial power was shown in an acid medium.

3) Resistance of antibiotic-producing *Actinomyces* against these substances: *Actinomyces* which produce chlorotetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, dextromycin, actinomycin, and streptothricin do not show any resistance to the present substances.

These results suggest that the aromatization of the C-ring in the molecules of the tetracycline series compounds does not result in the loss of the antibacterial action and that such action mechanism is different from that of chlorotetracycline or oxytetracycline.

(Received June 29, 1955)