放射状菌に関する研究

Streptomyces albireticuli の生産する抗細菌物質

Enteromycin について (IV)

中 沢 鴻 一 (醸酵研究所)

昭和 30 年 5 月 9 日 受 理

Studies on Streptomycetes.

Enteromycin, an Antibiotic produced by *Streptomyces albireticuli* (IV)

By Kôiti NAKAZAWA (Institute for Fermentation, Osaka)

緒 言

Streptomyces albireticuli⁽¹⁾ の培養菌体から抗黴、抗酵母物質 Eurocidin⁽²⁾ が得られる事は前報に於て述べたところであるが、生菌抗菌像の上からも培養液中に抗細菌物質が生産されるであろう事は想像されるところである。事実、*St. albireticuli* は培養液中に抗細菌物質を生産し、然もその抗菌作用の面から見て、主としてグラム陰性細菌に作用する物質と、グラム陽性菌に主として作用する物質との 2 物質が生産される事を確かめたので、この両抗生物質を追究して見た。本報告に於てはその 1 つである主としてグラム陰性菌に作用する新抗生物質 Enteromycin について述べる。

実 験 の 部

1) 培 養 条 件

A) 振盪培養 Enteromycin は Eurocidin 生産培地、大豆粉葡萄糖培地ではほぼ 50 u/cc (*Proteus vulgaris* unit) の生産に過ぎない。Enteromycin の生産単位を高めるために次の 6 種の培地について培養条件を検討した結果、葡萄糖 1%，大豆粉 1%，ペプトン 0.5%，NaCl 0.5%，CaCO₃ 0.3% (D 培地) で約 4 倍、即ち 200 u/cc にその抗菌力を高め得た。

Culture media

- A. Glucose 1%, meat extr. 0.5%, peptone 0.5%, NaCl 0.5%
- B. Starch 1%, meat extr. 0.5%, peptone 0.5%, NaCl 0.5%
- C. Glucose 1%, Soy-bean meal 1%, peptone 0.5%, NaCl 0.5%
- D. " " " " " , CaCO₃ 0.3%
- E. Glucose 1%, corn steep liq. 2%, peptone 0.5%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.4%
- F. Glucose 1%, *Pen. mycelium* 10%, peptone 0.2%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.4%

Table 1. Production of Enteromycin on Various Media (shake culture)

pH	<i>E. coli</i> u/cc	<i>Pr. vulg.</i> u/cc	pH	<i>E. coli</i> u/cc	<i>Pr. vulg.</i> a/cc	pH	<i>E. coli</i> u/cc	<i>Pr. vulg.</i> u/cc
	2 days			3 days			4 days	
A. 7.6	0	20	6.6	0	<20	7.2	0	<20
B. 5.8	0	20	6.0	0	<20	7.8	0	<20
C. 5.4	<20	50	7.4	<20	60	3.2	<20	20
D. 6.0	20	60	7.4	60	150	7.8	60	200
E. 6.2	<20	<20	7.4	<20	20	8.0	<20	20
F. 7.0	<20	20	8.0	<20	20	8.6	<20	20

Table 2. Production of Enteromycin in Fermenter

hr.	0	24	36	48	60	66
I. { pH	7.0	7.4	7.6	7.6	7.8	7.8
u/cc	—	50	50	60	60	60
II. { pH		7.4	7.6	7.8	7.8	7.8
u/cc		60	150	300	200	200

B) タンク培養：内容 200 l，通気量 50 l/min，攪拌 160 r/min. のパイロットプラントに D 培地 100 l を仕込み，2 回行つた結果は次の通りである。検定菌は *Proteus vulgaris* である。

2) Enteromycin の抽出及び精製

前記 D 培地に 3~4 日培養し broth

の力価が 150~200 u/cc に達した時は菌体を濾別 (菌体は Eurocidin の抽出に使用)，濾液を pH 2.0 として酢酸エチルで抽出すると Enteromycin の殆んどが酢酸エチルに転溶する。これを Na₂CO₃ で Na 塩とし，更に H₂SO₄ で分解して酢酸エチルで抽出すると粗物質が得られる。これをアル

コールから再結すると針状晶を得る。

次にタンク培養に於ける抽出例を示すと，培養液より菌体を除去した濾液 600 l を HCl で pH 2.0 とし約 200 l の酢酸ブチルで 3 回抽出，抽出液 600 l を水洗後 Na₂CO₃ 液で有効物質を水層に転溶させ，後酢酸ブチル

を水洗，溶液及び水洗液をそれぞれ約 2.5 l を得た。これを H_2SO_4 で酸性 (pH 2.0) にすると淡褐色の沈澱を生ずる。両液からこの沈澱をこし取り，約 200 cc のアセトンで洗滌すると淡灰色の粗結晶 39 g を得る。これを多量の温メタノールに溶かし，活性炭で脱色後冷却すると淡黄色針状晶 28 g を得る。収率は 58% である。

Table 3. Antibacterial Activity of Enteromycin (pH 7.0)

Organism	γ/cc
<i>E. coli</i>	5
<i>Pr. vulgaris</i>	1.25
<i>Staph. aureus</i>	10
<i>B. subtilis</i>	>20
<i>Pseudomonas</i> sp.	5
<i>Candida albicans</i>	>20

3) Enteromycin の抗菌力

グラム陰性菌殊に *Proteus vulgaris* に対して特異的に作用する。陽性菌に対しては比較的活性は弱い。Candida, 黴, 酵母には作用しない。又従来の抗細菌物質の作用し難い *Pseudomonas*, *Serratia* 等に対しても有効である。pH 7.0 の bouillon agar に於ける完全発育阻止に要する最少量は Table 3. の通りである。

Enteromycin は検定培地の pH によつて著しく影響を受ける。検定培地が酸性側に於ける程その阻止力は強大であるが、アルカリ側に於てはその効力が著しく減弱する。

検定培地の pH の及ぼす抗菌力の差異は Table 4. の通りである。

Table 4. Antibacterial Activity of Enteromycin in Various pH

a) pH 5.0												d) pH 6.4											
Organism.	0.125	0.25	0.5	1.0	2	4	8	16	32	Control.		Organism	0.125	0.25	0.5	1.0	2	4	8	16	32	Control.	
<i>Staph. aureus</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++		<i>Staph. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—	++	
<i>Salmonella typhosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±		<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	++	
<i>E. coli</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++		<i>Salmonella typhosa</i>	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	—	++	
b) pH 5.6												Shigella											
Organism	0.125	0.25	0.5	1.0	2	4	8	16	32	Control.		<i>dysenteriae</i>	+++	++	++	++	—	—	—	—	—	++	
<i>Staph. aureus</i>	+++	+++	++	++	—	—	—	—	—	++		<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	±	—	—	—	—	—	—	+	
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	++	++	—	—	—	—	++		<i>Proteus vulgaris</i>	+++	+++	+++	+	—	—	—	—	—	++	
<i>Salmonella typhosa</i>	+++	+++	+	—	—	—	—	—	—	++		<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	—	++	
<i>Shigella dysenteriae</i>	++	—	—	—	—	—	—	—	—	++		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	++	
<i>Vibrio cholerae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		e) pH 7.0~7.2											
<i>Proteus vulgaris</i>	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	++		Organism	0.125	0.25	0.5	1.0	2	4	8	16	32	Control.	
<i>E. coli</i>	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	++		<i>Staph. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—	++	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	++	++	±	—	—	—	++		<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++	—	—	++	
c) pH 6.0												<i>Salmonella typhosa</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	++	
Organism	0.125	0.25	0.5	1.0	2	4	8	16	32	Control.		<i>Shigella dysenteriae</i>	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—	—	++	
<i>Staph. aureus</i>	+++	++	++	++	++	—	—	—	—	++		<i>Vibrio cholerae</i>	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—	++	
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—	—	++		<i>Proteus vulgaris</i>	++	++	++	++	±	—	—	—	—	++	
<i>Salmonella typhosa</i>	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—	++		<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—	++	
<i>Shigella dysenteriae</i>	+++	++	++	—	—	—	—	—	—	—		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	—	++	
<i>Vibrio cholerae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±		(— complete inhibition, ++ no inhibition)											
<i>Proteus vulgaris</i>	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	++													
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	++													
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—	—	++													

即ち大腸菌では pH 5.0 の培地に於ては 0.125 γ/cc 以下の濃度に於て発育が阻止されるが、pH 7.0~7.2 の培地に於ては完全発育阻止に 8 γ/cc を要する。

又 *Staph. aureus* では pH 5.0 培地に於ては 0.25 γ/cc であるが、pH 7.0~7.2 の培地では 32 γ/cc を要する。

又 *Proteus vulgaris* では pH 5.6 に於ては 0.5 γ/cc 、pH 7.0~7.2 に於ては 4 γ/cc を要する。

以上の如く Enteromycin は酸性側に於て細菌の発育を強力に阻止し、アルカリ側に於てはその抗菌力を著しく減弱する性質を有する。

4) Enteromycin の物理化学的性質

溶解度 難溶性で水、アルコール、エステル類に僅かに溶ける (メタノールには冷時 0.1% 以下)。デオキシサンには少量とける。

旋光度: $[\alpha]_D^{25} = \pm 0$ (メタノール)

元素分析 C 38.21%, H 4.62%, N 14.32%, 実験式として $C_6H_8O_5N_2$ が考えられる。

紫外線吸収スペクトル 300~320 $m\mu$ に強い吸収を示す。

融点: 160~162° (decomp.)

Enteromycin の毒性は 10 g のマウスを用い静脈注射で LD₅₀ をしらべた。

LD₅₀ = 1.375 mg/10 g.

要 約

1) *Streptomyces albireticuli* の培養液より、主としてグラム陰性細菌に作用する新抗生物質を結晶状にとり出し、これを Enteromycin と命名した。

2) Enteromycin は酸性側に於てグラム陰性細菌に対して強力に作用する。

終りに終始御指導賜つた醸酵研究所長佐藤喜吉博士、武田研究所長桑田博士並に立岡末雄博士に深謝すると共に協力された柴田元雄、田辺一雄、三宅彰氏に感謝する。

(本報告の要旨は昭和 28 年 7 月 24 日、抗生物質学術協議会第 72 回研究会に於て講演した)。

(1) 中沢鴻一: 農化, 29, 647 (1955).

(2) 中沢鴻一 農化, 29, 650 (1955).

Summary

1) The second new antibiotic produced by *Streptomyces albireticuli* was extracted from its cultural broth and named Enteromycin.

2) Enteromycin is remarkably active against Gram-negative bacteria in acidic media.

放射状菌に関する研究 *Streptomyces albireticuli* の生産する抗細菌物質 Carbomycin (V)

中沢 鴻 一, 柴 田 元 雄 (醸酵研究所)

三 宅 彰, 岩 崎 英 介 (武田研究所)

昭和 30 年 6 月 7 日 受 理

Studies on Streptomycetes.

Carbomycin, an Antibiotic produced by *Streptomyces albireticuli* (V)

By Kôiti NAKAZAWA, Motoo SHIBATA (Institute for Fermentation, Osaka)

Akira MIYAKE and Eisuke IWASAKI

(Research Laboratory attached to Takeda Pharmaceutical Industries Ltd.)

緒 言

Streptomyces albireticuli nov. sp.⁽¹⁾ が菌体中に抗黴物質 Eurocidin⁽²⁾ を、培養液中に抗グラム陰性菌物質 Enteromycin⁽³⁾ を生産することはすでに報告されたが、*Streptomyces albireticuli* の培養液中にはこのほかグラム陽性菌に作用する抗生物質があることは、予見されていた。今回本物質を追究し、これが Carbomycin⁽⁴⁾ であることを確認した。

Streptomyces albireticuli の 1 株から Eurocidin, Enteromycin, Carbomycin の如き、いずれも毒性が弱くしかもそれぞれ強力な抗菌力を有する抗生物質を、多種類生産することは甚だ興味のあるところである。

実 験 の 部

I) 菌 株

Streptomyces albireticuli はすでに *St. reticuli* group の 1 新種として報告した。Carbomycin 生産菌株としては *St. halstedii*⁽⁵⁾ と *St. hygroscopicus*⁽⁶⁾ の 2 株が報告されているが、*St. reticuli* group の菌株による Carbomycin の生産は未だ報告されていない。*St. reticuli* group の菌株が形態学的に他の菌株と判然と区別される特徴を有することはすでに報告した。

従つて Carbomycin そのものが *St. albireticuli*, *St. halstedii*, *St. hygroscopicus* の異なる 3 菌株のいずれによつても生産されることは明らかである。

II) 培 養