313. 立岡末雄, 濱田義雄, 井上道隆, 藤井繁弘, 徳井安雄: 抗生物質の研究 (第7報*)

Amicetin と抗カビ, 抗原虫物質との拮抗性について

Sueo Tatsuoka,** Yoshio Hamada,*** Michitaka Inoue,** Shigehiro Fujii,***
and Yasuo Tokui***: Studies on Antibiotics. VII. Antagonistic
Properties of Amicetin with Antifungal-Antiprotozoal Antibiotics *in vitro*.

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

抗生物質の拮抗物質ないし拮抗現象については現在までにかなりの報告がみられる。例えば Acidomycin と biotin との拮抗現象^{1,2,3,4)} が知られており, 前者が生体内で無効 (通常の投与法による) な原因はその現象に関連するのではないかと考えられている。また Foster等⁵⁾ は Aureomycin 抑制菌に対して riboflavine が代謝賦活作用を及ぼすと報告している。放射状菌が産生するこれらの抗生物質とビタミンとの間のこのような拮抗には関与する物質の化学構造が大きな関連性を持つと考えられている。他方抗生物質相互の間にも拮抗現象が知られ, 抗生物質の協力作用とともに多大の関心をもつて観察されている^{5,6,7,8,9)}。例えば Aureomycin と Penicillin^{10,11)} のように作用量または作用時期によつて拮抗し, または拮抗しないことがわかつて来た。Erythromycin と Penicillin についても同様なことが観察され, この現象は特に培地の pH が 7 以下の時に強く現われる。西村等¹²⁾ は Erythromycin が Penicillin よりも先に被検菌に働くときにのみ拮抗現象があると報告した。これらの現象を完全に説明しつくすことは困難であるが, そうした事象を通じ抗生物質の作用機序が論じられ, その説明が試みられている。

著者等¹³⁾ がさきに一放射状菌 (*Streptomyces sindenensis nov. sp.*) の代謝産物として分離した抗生物質 Allomycin は, その後の研究¹⁴⁾ で Hinman 等の Amicetin と区別され得ないことが判つた。本品は *in vitro* で結核菌に対し特に強い抗菌力を示す (1.6 γ /cc) のに反し, *in vivo* では余り顕著な作用が認められない。著者

Amicetin (Allomycin)

* 第 84 回日本抗生物質協議会発表 (1954 年 9 月). 日本薬学会近畿支部例会発表 (1954 年 11 月). 第 6 報, 武田年報 **13**, 41(1954).

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

- 1) M. Kawashima et al.: Pharm. Bull. (Japan) **1**, 94(1953).
- 2) Y. Hamada et al.: J. Antibiotics (Japan) A **1**, 158(1953).
- 3) W. E. Grundy et al.: Antibiotics & Chemotherapy **2**, 399(1952).
- 4) 梅沢等: 第 64 回日本抗生物質協議会発表 (1952 年 11 月).
- 5) J. W. Foster et al.: J. Bacteriol. **66**, 478(1953).
- 6) J. B. Gunnison: Symposium(Roma, 1953).
- 7) F. S. Barr et al.: Antibiotics & Chemotherapy **4**, 818(1954).
- 8) J. B. Gunnison et al.: J. Gen. Microbiol. **16**, 191(1954).
- 9) H. F. Zipf et al.: Arzneimittelforsch. **4**, 463(1954).
- 10) 宮原: 第 27 回日本細菌学会 (1954 年 4 月). 11) 木村他: 第 27 回日本細菌学会 (1954 年 4 月).
- 12) 西村他: J. Antibiotics (Japan) B **7**, 192(1954).
- 13) 中沢他: Ibid. B **7**, 168(1954).
- 14) 立岡他: 本誌 **75**, 1206(1955).

等はその原因の 1 つが強い拮抗物質の存在によるのではないかと考え, その検索を行うことにした。

著者等は amicetin の構造式のうちに cytosine があることからピリミジン系化合物, 葉酸および核酸を, また α -methylserine と PABA の存在から諸種のアミノ酸とビタミンとを対象に考え, 総数 74 種の化合物 (Table I) について拮抗の有無を検討するとともに, 更に 12 種の既知抗生物質 (Table III) について amicetin との拮抗を検討した。

Table I. Amino Acids, Vitamins, and Pyrimidine Series Compounds
Tested for Antagonism against Amicetin

1. L-Glutamic acid	40. 5-Acetamino-2,6-dimethyl-4-hydroxy-pyrimidine
2. L-Aspartic acid	41. 5-Acetamino-2-amino-4-hydroxy-6-methylpyrimidine
3. L-Proline	42. 5-Amino-6-methylpyrimidine
4. Glucosamine·HCl	43. 5-Acetamino-2,4-dihydroxy-6-methylpyrimidine acetate
5. DL-Alanine	44. Ethyl (2,4-diethoxy-5-aminopyrimidyl-6)-pyruvate
6. L-Tryptophan	45. 5-Acetamino-4-hydroxy-6-methylpyrimidine
7. DL-Threonine	46. 2,4,6-Triaminopyrimidine sulfate
8. L-Hydroxyproline	47. 2,4,6-Triamino-5-nitrosopyrimidine
9. DL-Methionine	48. 2,5-Diamino-4,6-dimethylpyrimidine
10. L-Histidine	49. 5-Acetamino-2-amino-4,6-dimethylpyrimidine
11. DL-Serine	50. 2-Ethoxy-4-amino-5-nitro-6-methylpyrimidine
12. L-Tyrosine	51. Uracil-6-acetic acid
13. L-Arginine·HCl	52. Ethyl uracil-6-acetate
14. L-Lysine·HCl	53. 5-Nitrouracil
15. DL-Phenylalanine	54. Orotic acid
16. DL-Isoleucine	55. Aminopterin
17. L-Leucine	56. 6-Hydroxymethyluracil
18. L-Valine	57. 2,5-Dimethyl-7-hydroxy-4,6-diazaindole
19. L-Cystine·HCl	58. 2,5-Dimethyl-7-amino-4,6-diazaindole
20. Thymidine	59. 2,5-Dimethyl-4,6-diazaindole
21. Hypoxanthine	60. 5,7-Diethoxy-4,6-diazaindole-2-carboxylic acid
22. Xanthine	61. Choline
23. Cytosine	62. Nicotinamide
24. Uridylic acid	63. Pyridoxine
25. Cytidylic acid	64. Thiamine
26. Adenosine	65. Pyridoxamine
27. Uridine	66. Pyridoxal
28. Guanosine	67. Riboflavin
29. Desoxyribonucleic acid	68. Folic acid
30. Ribonucleic acid	69. Ca Pantothenate
31. Cytidine	70. <i>p</i> -Aminobenzoic acid
32. Glucose 1-phosphate	71. Nicotinic acid
33. 2-Methylthio-4-hydroxy-6-methylpyrimidine	72. Biotin
34. 2,4-Dihydroxy-6-methylpyrimidine	73. B ₁₂
35. 2,4-Dihydroxy-5-nitro-6-methylpyrimidine	74. Inositol
36. 2,4-Dihydroxy-5-amino-6-methylpyrimidine	
37. 2-Chloro-4-amino-5-nitro-6-methylpyrimidine	
38. 2,4-Diamino-5-nitro-6-methylpyrimidine	
39. 2,4,5-Triamino-6-methylpyrimidine	

Table II. Bacterial Spectrum of Amicetin

<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	6.2 γ /cc
<i>Bac. subtilis</i>	"
<i>Mycob. tuberculosis</i>	1.2
<i>Mycob. avium</i>	"
<i>Mycob. phlei</i>	0.2
<i>E. coli</i>	100.0
<i>Candida albicans</i>	"
<i>Coryneb. diphtheriae</i>	"
<i>Salmonella paratyphi</i>	"
<i>Sarcina lutea</i>	"
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	1.6
<i>Micrococcus flavus</i>	0.4

Table III. Interaction of the Antibiotic Activity of Amicetin and Other Antibiotics in 24-hr-old Culture of *Microc. flavus*

Chloramphenicol	50 γ /cc.	—
Aureomycin	"	—
Dextromycin ¹⁵⁾	25	—
Acidomycin ¹⁶⁾	50	—
Streptomycin	"	—
Enteromycin ¹⁷⁾	"	++
Candimycin ¹⁸⁾	"	++
Trichomycin	"	++
Eurocidin ¹⁹⁾	"	++
Mycelin IMO ²⁰⁾	"	++
Aureofacin ²¹⁾	"	++
Virosin ²²⁾	"	+

実験方法及び材料 実験方法：下に記すような方法をとつた。

1) ブイヨンまたは寒天培地中に被検菌に対する作用物質を混合して被検菌に対する最少完全有効阻害濃度を求め、それに被検物質を作用させ、卵形器中に置き一定時間 (24 時間または 48 時間) 後における菌の発育を濁度でみるか菌数計算して対照と比較する方法。

2) 抗生物質のカップ検定法を応用して次の 2 方法によつた。

a) 完全に阻止円を形成する範囲でなるべく低濃度の作用物質 (例えば amicetin では 10 γ /cc) と被検物質を等量混合してカップに入れ、対照の阻止円径と比較する方法。

b) 最少完全有効阻害濃度の作用物質をあらかじめ培地中に封入し、カップに被検物質のみを入れ、培養後増殖円が形成されるか否かを見る方法。

screening test の手段としては 1), 2) を、爾後の本実験における拮抗比の算定には 1) の方法が用いられた。

被検菌：screening test ではもちろん amicetin を作用物質とするため、被検菌には最も感受性の強い *M. flavus* (Table II) で実験されたが、本実験では拮抗物質と作用物質の立場を時々かえることも行われたので、それに応じて被検菌²³⁾ も次に記す株が用いられた。

(1) *Micrococcus flavus* ATCC 10240 (IFO 3242)

(2) *Candida albicans*

(3) *Trichomonas vaginalis* var. TV 1099 (IFO 0599)

培地：上の被検菌に応じ次のものを用いた。

(1) ペニシリン検定用寒天培地または普通ブイヨン

(2) サブロー寒天培地またはサブローブイヨン

15) 緒方：J. Antibiotics (Japan) B 3, 440(1950).

16) 三宅他：Pharm. Bull. (Japan) 1, 84(1953).

17) 中沢他：第 72 回抗生物質協議会発表 (1953 年 7 月).

18) 中沢他：第 79 回抗生物質協議会発表 (1954 年 3 月).

19) 中沢他：第 72 回抗生物質協議会発表 (1953 年 7 月).

20) 五十嵐他：日本農芸化学会関西支部発表 (1954 年).

21) 緒方 (醸酵研究所)：未発表.

22) 中沢他：第 85 回抗生物質協議会発表 (1954 年 10 月).

23) これらに用いた菌液は斜面寒天、24 時間培養菌体を 1 mg öse で 1 白金耳とり、10 cc の生理的食塩水に浮遊させたものであるが、植菌にはその 1 öse または 2 öse を用いる。この間の菌量差によつて成績の異なることはない。

(3) F または V ブイヨン^{24,25)}

実験成績 上記実験方法のうち screening test として 1) 法を用いると, 1 白金耳の *M. flavus* 菌液の植菌で amicetin は 37°, 24 時間培養後コールマン比濁計の読みから Fig. 1 にみられるように 31 γ /cc で最少完全有効阻害を示す。したがって実験はすべてこの条件で行われた。

1) アミノ酸, ビタミン及びピリミジン系化合物: 緒言にも述べたように拮抗物質としては amicetin の構造からアミノ酸及びビタミンに対応するものが考えられた。そして水またはメタノールに溶解された Table I にある 74 種の化合物が上記の方法で実験に供されたが, 一旦抑制された菌に対して賦活作用をもつものは現われ

Fig. 1. Inhibition Curve of Amicetin
(*M. flavus*, 37°C 24 hrs.)

Fig. 2. Effect of Amicetin on Neutral Bouillon having various Concentration of Candimycin and Influence of Time before Inoculation

なかつた。これらの物質はすべて 1 mg/cc 以下の濃度で用いられた。

2) 抗生物質: (1) amicetin による菌抑制を賦活する場合: Table III にあげられた抗生物質の 25~50 γ /cc と amicetin の 31 γ /cc を混和した実験ではこれらの抗生物質のうち放射状菌の菌体から得られる抗カビ, 抗原虫性物質と enteromycin (Gram (-) 菌にのみ特異的に抗菌力を示す) が抑制菌を賦活することがわかった。そこで amicetin の 31 γ /cc 含有培地に菌体物質 candimycin を拮抗物質として用い, その 500 γ /cc を頂点とする倍数希釈系列により両物質を混合し *M. flavus* を植菌して実験を行つた。その結果混合と同時に菌を植えると抑制された菌の賦活は困難であつたが, 混和後低温で暫時放置した後植菌すると菌の増殖がみられた。それ

Fig. 3. Effect of Candimycin on Sabouraud-Glucose Bouillon having various Concentration of Amicetin and Influence of Time before Inoculation

24) 浜田: 阪大医誌 5, 429(1953).

25) 37°, 48 時間培養菌体を被検培地に対し 2 cc 移植した。この際の虫体数は約 1.4×10^5 個である。

Fig. 4. Effect of Trichomycin on F-Bouillon having Various Concentration of Amicetin and Influence of Time before Inoculation.

- △-△- 1. Inoculation and mixing at the same time.
- 2. Addition of Amicetin 16 hrs. after inhibition of T. V.
- 3. Mixing at the same time, inoculation after 16 hrs.

を濁度で示すと Fig. 2 が得られる。

(2) 菌体物質による菌または原虫抑制を賦活する場合：同様なことは菌体物質（例えば candimycin）で抑制された菌（*C. albicans*）でも amicetin によつて拮抗され、菌の増殖賦活をみることがわかつた。Fig. 3 では candimycin の 1.5 γ/c によつて完全発育阻害された *C. albicans* が amicetin の混合によつて増殖賦活された状況を示す。この図で △-△- は 4 時間、10° の室に放置後植菌した場合を示し、×-×- は同温度に 16 時間放置したのち植菌した場合で、いずれも 37°、24 時間培養後の濁度である。

次に著者等は trichomycin²⁶⁾ を用い、*Trichomonas vaginalis* var. TV 1099 が同様に拮抗作用で賦活されるかを見た。Fig. 4 にみられるようにこの場合も同時混合して同時に *T. vaginalis* を植えると原虫の発育はみられない、また先に trichomycin で原虫を抑制しておいて 16 時間後に amicetin を加えても原虫の増殖はみられない。しかし amicetin を先に原虫と共に加え、37° で 16 時間培養した後 1.0 γ/cc の trichomycin を加えると原虫は全く抑制されず、増殖していることがみられた。別に trichomycin と amicetin を同時混合して 16 時間後に原虫を植えると、Fig. 4 に見られるように 12 γ/cc から 50 γ/cc の間で完全賦活することがわかつた。そうしてこの時の原虫数を Petroff Hausser の細菌計算板で測定したところ濁度と全く一致した。また trichomycin を 2 γ/cc 用いると、発育濃度は 100 γ/cc から 25 γ/cc の間にあつて前者は比例する。しかし 8 γ/cc 以上の trichomycin ではその作用はみられなかつた。

考 察：放射状菌の菌体から抽出される物質の種類はかなりあるが、そのうち紫外線吸収帯でその値にはいくらかのずれはあるとしても 3 つの極大値をもち、その性質が相互に極めて似ている一群がある。Oroshnick 等²⁷⁾ はこれを polyene antibiotics として一括している。

我々の実験で観察したように我々が用いた菌体物質は amicetin と拮抗作用を示したが、これ等はいずれもこの polyene antibiotics に共通な紫外線吸収帯をもっている。このことはこれら菌体物質の化学構造と生物学的性質との関係に興味ある示唆を提供していると考えられる。

amicetin と菌体物質の拮抗作用には被検微生物の種類、作用する両物質の混合比、植菌までの時間等に制限があると考えられる。被検微生物として *Mycob. tuberculosis* var. *avium* を用いた時にはこの作用は認められなかつた。これに似た事実は既往の文献では B₆ または biotin と INAH の拮抗について見られる。Foster 等²⁸⁾ によれば極めて明瞭な拮抗作用を示した実験成績も、東大株を用いた川島（武田薬工研究所²⁹⁾）の実験では全くその作用が見られていない。これは被検菌に対する拮抗物質と作用物質間の代謝系の様式が Eagle³⁰⁾ が唱える単一相と両相に作用することがあり、単一相の場合にある種の菌では賦活（拮抗現象）が見られないのであろう。また混合比と時間の問題は、拮抗現象が一種の反応と見られることから、作用量と時相とが考えられ、当然物質の反応に関係があると思われる。また作用物質の影響をうけない対照と、拮抗物質により賦活された菌の濁度または菌数を比較すると完全賦活が行われないことが判る。実験方法によつて或いは完全賦活するのかも知れないが、これはむしろ Williams³¹⁾ が “Detoxication Mechanisms” で述べているような部分拮抗と解すべきではなからうか。しかし被検微生物例えば *T. vaginalis* var. ではその様相も変つてくる可能性があるので、このことについては更に詳細に追究しなければならぬと考える。

以上の実験では単に amicetin と抗カビ、抗原虫物質である放射状菌からの菌体物質とがある種の細菌、原虫を用いる時に拮抗現象を現わすということを知り得たに過ぎず、その際の機作或いは適用範囲については将来の研究にまづことにしたい。

本研究にあたり終始御鞭撻を賜つた研究所長桑田 智博士および醸酵研究所長佐藤喜吉博士に謹謝する。また多種の貴重なビリミジン系化合物を分与下さつた田中邦喜博士に感謝する。

武田薬品工業株式会社研究所、醸酵研究所

26) 4,000 U/mg (*C. albicans*) の物質。（細谷教授より分与されたもの）。

27) W. Oroshnick et al.: Science **121**, 147(1955).

28) J. W. Foster: J. Bacteriol. **67**, 53(1954). 29) 未発表。

30) H. Eagle: J. Bacteriol. **62**, 663(1951).

31) R. J. Williams: “Detoxication Mechanisms,” Chapman & Hall Ltd., London(1949).

Summary

1) Amicetin, an antibiotic substance possessing strong antibacterial action against *M. avium* and *M. flavus*, was not antagonized by 74 kinds of substances including amino acids, pyrimidine compounds, and vitamins. However, it was found that antifungal-antiprotozoal substances, such as candimycin, trichomycin, eurocidin, mycelin-IMO, aureofacin, and virosin, and enteromycin were antagonistic to amicetin.

(Received June 3, 1955)

314. 大杉邦三：1,2,4-Trimethylpyrrolidine の新合成法
2,4-Dimethyl-3,5-dicarboxypyrrole ナトリウム塩の接触還元

Kunizo Osugi : A Novel Synthesis of 1,2,4-Trimethylpyrrolidine.
The Catalytic Hydrogenation of the Sodium Salt of
2,4-Dimethyl-3,5-dicarboxypyrrole.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd*.)

従来ピロールカルボン酸誘導体の接触還元については Adkins 等の広汎な研究があるが、対象とされた化合物はピロールカルボン酸エステル、N-置換ピロールカルボン酸エステル或いはそれらの誘導体等で、標記の如きピロールカルボン酸塩の接触還元について研究された報告は未だ見当たらない。Adkins¹⁾等の研究によれば N に置換基を有しないピロールカルボン酸エステル及び同族体は従来知られた如何なる条件でもピロリジンカルボン酸エステル等に還元され得ないが、N に carbethoxy 基等を導入すると比較的容易に還元を受け母核はピロリジン環になるといわれる。著者はこれに対し N に置換基を有しないピロールカルボン酸塩を接触還元した場合、如何なる結果が得られるかを明らかにしようと試み、興味ある新事実を明らかにし得た。

アセト酢酸エチルから合成した 2,4-dimethyl-3,5-dicarbethoxypyrrole (Knorr のピロール) (I) をケン化して得た 2,4-dimethyl-3,5-dicarboxypyrrole (II) をナトリウム塩 (IIa) として水に溶かし、Raney ニッケルを触媒とし 150°, 100 気圧でこれを接触還元し、反応物を Amberlite IRC-50 で処理して 1 つの有機酸塩と 1 つの有機塩基とを分離することができた。前者は確認の結果ギ酸ナトリウム (IV) であり、後者は分解および合成の結果 1,2,4-trimethylpyrrolidine (III) であることを確認した。還元生成物に塩酸を加えて酸性にした場合やそれを Amberlite IRC-50 を通した際に二酸化炭素のある程度の発生を認めたことから反応中にカル

ボン酸ナトリウム基が離脱し、ある程度炭酸ナトリウムが生成していたことが推定される。樹脂を通過した酸性の流出液を水酸化ナトリウムで正確に中和し蒸発乾固して得た残留物から mp 141° の *p*-bromophenacyl ester を得。これを mp 141° の *p*-bromophenacyl formate の真正品と混融しても融点降下は認めなかつた。その

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

1) a) F. K. Signaigo, H. Adkins : J. Am. Chem. Soc. 58, 709(1936); b) F. K. Signaigo, H. Adkins : Ibid. 58, 1122(1936); c) F. K. Signaigo, H. Adkins : Ibid. 61, 1104 (1939).