

抗真菌性抗生物質 Etruscomycin の検討

河部 靖・金沢 保・滝本義一

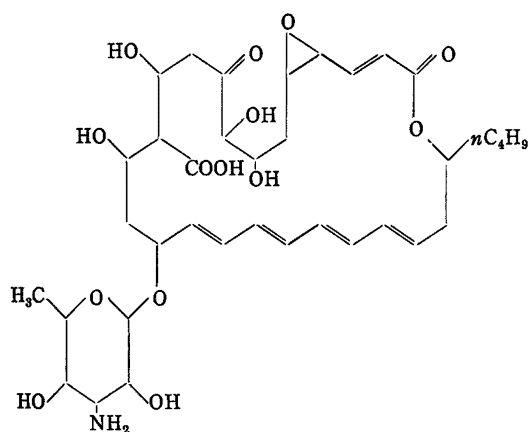
宮本淳子・池田友久

エーザイ株式会社研究所

(昭和 40 年 7 月 5 日受付)

I. 緒 言

1957 年 ARCAMONE ら¹⁾は *Streptomyces lucensis* の培養液より各種真菌に対して強い抗菌性を有する新しい抗生物質を単離し Etruscomycin(ESM) と命名した。このものは水に難溶性の黄色粉末で Nystatin (NS) と同様 tetraene 系に属するポリエン化合物で GAUDIANO ら²⁾により最近その化学構造が明らかにされた。



Etruscomycin

(Trade name of Farmitalia Co., Lucensomycin)

ESM の *in vitro* 抗真菌性は GRAESSLE ら³⁾によっても精査された結果、各種真菌に対し NS よりすぐれていることを報告している。

しかるに ESM の真菌感染動物に対する治療効果は ARCAMONE らの報告ではあまり明らかでない。そこで著者らは ESM の抗真菌剤としての価値を判断する目的をもつて諸種の *in vitro* 実験のほか急性毒性、さらに *Candida* 菌感染マウスおよび白癬菌感染モルモットに対する治療効果についても検討を加えた。

II. *In vitro* 抗微生物性

1. 各種細菌に対する抗菌性

実験方法：NS を対照として実施した。ESM, NS それぞれ 5 mg を 25% エタノール 10 cc に溶解せしめ、常法通り無菌水で 2 倍希釈系列を作成した。次いでこれら各希釈液 1 cc をとり Brain Heart Infusion 寒天培地 (Difco) 9 cc とペトリシャーレ上でよく混和せしめて試験平板を調製した。これらの平板に 24 時間 slant

上で前培養した各試験菌の生理食塩水希釈液 (菌数 $4 \sim 8 \times 10^4$ /cc) より 1 白金耳量を画線塗抹し、37°C に 24 時間培養後最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

実験成績：Table 1 に示した。

ESM は NS と同様 50 mcg/cc でも各種細菌に対し発育阻止作用を示さず、細菌に対する抗菌力は期待できないものといえる。

2. 各種真菌に対する抗菌性

実験方法：細菌試験の項に示したと同様に実施した。ただし培地は SABOURAUD 寒天培地を使用し、菌液は yeast type の菌では SABOURAUD 寒天培地の slant より 1 白金耳量を取り生理食塩水 10 cc に、mycelial type の菌は 1 slant 量を生理食塩水 10 cc に懸濁せしめて菌液を調製し、これらの菌液より 1 白金耳量を試験平板に画線塗抹して 27°C に 4 日および 7 日間培養後 MIC を

Table 1. *In vitro* antibacterial activity of Etruscomycin
MIC (mcg/cc)

Bacteria	Antibiotics	Etrusco- mycin	Nystatin
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P		>50	>50
<i>Streptococcus hemolyticus</i> Y-73-5		>50	>50
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219		>50	>50
<i>Escherichia coli</i> O-1		>50	>50
<i>Shigella flexneri</i> 2 a		>50	>50
<i>Salmonella typhimurium</i> 1406		>50	>50
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19		>50	>50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A 3		>50	>50

Table 2. *In vitro* antifungal activity of Etruscomycin
MIC (mcg/cc)

Fungi	Day	Antibiotics	Etrusco- mycin		Nystatin	
			4	7	4	7
<i>Candida albicans</i> (No. 2)			0.8	0.8	6.25	12.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>			0.2	0.2	3.13	6.25
<i>Trichophyton asteroides</i>			12.5	12.5	12.5	25
" <i>rubrum</i>			6.25	12.5	6.25	12.5
<i>Microsporum gypseum</i>			25	25	50	50
<i>Aspergillus niger</i>			3.13	3.13	6.25	6.25

判定した。

実験成績：Table 2 に示した。

ESM は mycelial type の真菌には NS とほぼ同等の抗菌力を有することがわかったが、yeast type の真菌には NS よりはるかに低濃度で発育阻止作用を示した。

3. 各種 *Candida* 菌に対する抗菌性

ESM は yeast type の真菌に対し強い抗菌性を有することがわかったため、さらに各種 *Candida* 菌に対する抗菌力の検討を行なった。

実験方法：真菌試験の項に準じて実施した。ただし 37°C に 48 時間培養後 MIC を求めた。

実験成績：Table 3 に示した。

ESM は各種 *Candida* 菌に対し 0.4~1.56 mcg/cc でその発育を阻止したのに対し、NS は *in vitro* 成績では ESM より抗菌力が弱く、また *Candida* 菌の種類によって抗菌力にかなりの差が認められた。

4. 血清添加時の抗真菌性

ESM は *in vitro* 成績では NS より抗真菌性がすぐれていると認められるが、血清添加時に失活が起るかどうかはこのものの価値を判定する上に重要な因子となる。

Table 3. *In vitro* antifungal activity of Etrusco-mycin on various *Candida* sp. MIC (mcg/cc)

<i>Candida</i>	Antibiotics	Etrusco-mycin	Nystatin
<i>Candida albicans</i> No. 2		0.8~1.56	12.5
" " Yu-1200		1.56	12.5
" " 3174		1.56	6.25~12.5
" <i>krusei</i> NI 7492		0.8~1.56	25
" <i>parakrusei</i> NI 7493		1.56	25
" <i>tropicalis</i> NI 7495		0.8~1.56	6.25~12.5
" <i>pseudotropicalis</i> IAM 3829		0.8	3.13
" <i>guilliermondii</i> IAM 4412		1.56	6.25
" <i>mycoderma</i> IAM 4564		0.8	6.25
" <i>robsta</i> NI 7638		0.4	6.25
" <i>utilis</i> IAM 4215		0.8	12.5

Table 4. *In vitro* antifungal activity of Etrusco-mycin on SABOURAUD's media including 10% horse serum MIC (mcg/cc)

Fungi	Day	Antibiotics		Etrusco-mycin		Nystatin	
				4	7	4	7
<i>Candida albicans</i> (No. 2)		6.25		6.25	12.5	12.5	
<i>Cryptococcus neoformans</i>		6.65		6.25	6.25	6.25	
<i>Trichophyton asteroides</i>		>50		>50	12.5	12.5	
<i>Microsporum gypseum</i>		50		>50	25	25	
<i>Aspergillus niger</i>		50		50	12.5	12.5	

Table 5. *In vitro* activity of Etrusco-mycin on *Trichomonas vaginalis* MIC (mcg/cc)

Antibiotics	Etrusco-mycin	Nystatin
<i>Trichomonas vaginalis</i>	25	25

そこで SABOURAUD 寒天培地に 10% の割に馬血清を添加し真菌試験の項に準じて抗菌力を検討した結果、Table 4 に示す値が得られた。

血清存在下における ESM の *in vitro* 成績は Table 2 の結果と比較すれば明らかに抗菌力の低下が見られた。これに対し NS はほとんど血清の影響をうけないことがわかった。

金政ら⁴⁾も ESM が血清存在下において抗菌力が著しく低下することを認めており、その原因として ESM が血清蛋白と結合するためではなく、血清中の酵素により不活化されるのであろうと報告している。

ESM はこのように血清存在下で容易に失活するため NS にくらべ抗生物質としての価値はかなり減ずるものといえる。

5. *Trichomonas* 原虫に対する発育阻止作用

実験方法：細菌試験の項で示した ESM, NS の各希釈液 0.3 cc を浅見培地 2.0 cc, 馬血清 0.6 cc の混液に添加し、これらに 48 時間前培養した *Trichomonas vaginalis* 液 0.1 cc を添加し、72 時間培養後肉眼および検鏡により MIC を判定した。

実験成績：Table 5 に示した。

ARCAMONE ら¹⁾は ESM が 5~10 mcg/cc の濃度で *Trichomonas vaginalis* (8~24 時間培養) の運動を停止し、また高濃度で *Entamoeba histolytica* の発育を抑制する作用がある旨報告している。

著者らの成績では ESM, NS とともに 25 mcg/cc では *Trichomonas vaginalis* に対する発育阻止作用は全く見られなかった。

ESM の場合はとくに血清存在下の失活が著しいため *Trichomonas* 原虫のように *in vitro* 実験で培養に血清を必要とするものに対してはよい成績は当然期待できないものと考えられる。

III. 急性毒性

ARCAMONE ら¹⁾は ESM のマウスに対する急性毒性 (LD₅₀) は腹腔内投与で 37.14 mg/kg, 経口投与で 1263 mg/kg と報告している。

著者らは ESM の 1% アラビアゴム懸濁液を作成し、dd 系マウスを用いて急性毒性を検討し

Table 6. Acute toxicity of Etruscomycin LD₅₀ (mice), mg/kg

Intraperitoneal	55.0
Oral	1260

た。腹腔内投与の場合は 24 時間後、経口投与の場合は 72 時間後判定計算した結果を Table 6 に示した。

すなわち ARCAMONE らの報告とほとんど一致した値が得られた。ESM は抗真菌性抗生物質としては比較的安全性が低い方に属すると考えられる。

IV. 真菌感染動物に対する治療効果

ESM は *in vitro* 成績で各種 *Candida* 菌、ならびに皮膚糸状菌に対し強い抗菌力を有することが判明したため、著者らはさらに *Candida albicans* 感染マウスならびに白癬菌 (*Trichophyton asteroides*) 感染モルモットに対する治療実験を試みた。

1. *Candida albicans* 感染マウスに対する治療効果

実験方法：体重 20±2g の dd 系マウス (♂) を 1 群に 10 匹宛使用した。*Candida albicans* No. 13 株を 37℃ に 72 時間 SABOURAUD's bouillon 中で振盪培養した菌液を生理食塩水で希釈し、菌数 $4 \times 10^5/0.5$ cc/mouse 量を前記マウスの尾静脈に投与して感染せしめた。

薬剤は ESM, NS とともに 320 mcg/cc となるよう 0.5% CMC 含有生理食塩水に懸濁せしめたのち、菌液接種直後、24 時間後、および 96 時間後に 80 mcg/0.25 cc/mouse 宛腹腔内投与し 15 日間飼育しマウスの生死を観察した。

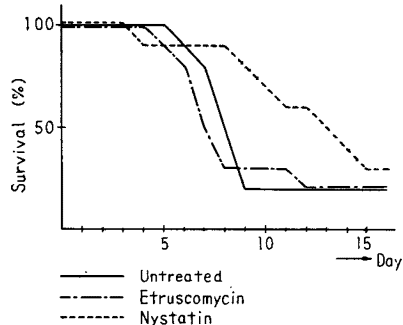
実験成績：Fig. 1 に示した。

ARCAMONE らは ESM が *Candida* 感染マウスに対し経口または皮下投与した場合、ほとんど治療効果があらわれないが、腹腔内投与では一応効果を認めた旨報告している。

しかし著者らの実験では Fig. 1 に示したように ESM を 3 回腹腔内投与したにもかかわらず、対照とした無処置群と全く同一の死亡経過を辿り、*Candida* 感染マウスに対する治療効果は見られなかった。NS は 15 日間観察後の生存率 (30%) を判定すれば対照群 (20%) とほとんど差がなく、顕著な治療成績とはいえないが、観察 7 日～10 日においては生存率 90～70% を示し、ESM の 50～30% に比し差が見られた。

ESM は血清中で失活するため本成績からも内部真菌症の治療には不適なものといえる。

Fig. 1 Therapeutic effect of Etruscomycin to candidiasis in mice



2. 白癬菌感染モルモットに対する治療効果

ESM は *in vitro* で皮膚糸状菌に NS と同程度の抗菌力を示したため、モルモットを使用する実験的白癬菌皮膚感染症に対する治療効果を検討した。

実験方法：酒井ら⁹⁾ または野宮ら¹⁰⁾ の詳細な報告があり、著者らもこれらに準じて実施した。

すなわち白系モルモット (♂), 体重 400～500g のものを 1 群に 10 匹宛使用し、て左右の背部を剃毛、消毒後、皮膚に約 2 cm² の面積で 6 箇所軽く出血する程度に傷をつける。これらの箇所にもルモット皮膚に 2 代継代し毒力を強めた *Trichophyton asteroides* の孢子懸濁液 (1 slant 量/SABOURAUD's bouillon 10 cc) を滅菌小筆を用いて塗布した。

菌液塗布より 48 時間後から ESM, NS の 1% 懸濁液 (基剤：70% エタノール グリセリン=9:1), および Pentachlorophenol (PCP) 液 (基剤：70% エタノール：グリセリン=9:1) を各試験箇所 1 日 1 回、連続 9 日間塗布し 10 日目にモルモットを屠殺、0.1% 昇汞水に 30 分浸し、さらに体表をよく洗浄後各試験箇所より皮膚を約 3 mm² の大きさに 1 箇所につき 3 片宛剥離し、SABOURAUD 寒天培地 slant 上にならべて置く。これらの slant を 27℃ に 7 日間培養後、菌の生育の有無を観察し薬剤の治療効果を判定した。

実験成績：Table 7 に示した。

Table 7. Therapeutic effect of Etruscomycin to dermatomycosis of guinea pigs

Guinea pig No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Therapeutic effect (%)
Treated											
Untreated	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Base control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
1% ESM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	60
1% NS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	70
1% PCP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90

+: Recognized the growth of *Trichophyton asteroides*

—: No growth of *Trichophyton asteroides*

9日間の塗布で ESM は治癒率 60%, NS は 70%, PCP は 90% を示した。このことより ESM は白癬菌感染モルモットに対し一応治療効果は認められたが、その成績は対照とした他の薬剤に比し良好ではない。

V. 総 括

新しい抗真菌性抗生物質 ESM を NS と比較してその *in vitro* における抗菌力、さらに真菌感染動物に対する治療効果につき検討を加えた。

その結果、ESM は *in vitro* 実験では各種真菌に対し NS より強い抗菌力を示し、なかんずく *Candida* 菌にはその種類に関係なく 1.56 mcg/cc またはそれ以下の低濃度で発育を阻止した。ただし血清加培地では抗菌力がかなり低下することがわかったが、NS では失活を認めなかった。各種細菌、*Trichomonas* 原虫には低濃度で発育阻止作用は見られない。

Candida 菌感染マウスに対し、ESM は無処置群と生存率に差がなく治療効果を認めなかった。これは ESM が生体内で容易に不活化されることに原因するものと考えられる。白癬菌感染モルモットに対して連続 9 日間の塗布で ESM は 60% の治癒率を示したが他の抗真菌剤

に比し良好な成績ではない。

以上のことより ESM は皮膚真菌感染症には一応使用し得るも内部真菌症の治療には不適であると考えられる。

本研究に終始御鞭撻頂いたエーザイ株式会社研究部門長 田辺普博士、第一研究所長 勝井五一郎博士、*Candida albicans* No. 13 株を分与頂いた東京大学細菌学教室 岩田和夫教授、種々御助言を賜わった岡山大学微生物学教室 金政泰弘博士に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) ARCAMONE, F. *et al.*: Giorn. Microbiol., 4 : 119-128, 1957.
- 2) GAUDIANO, G. *et al.*: Rend. Sc. fis. mat. e nat., 36 : 589-595, 1964.
- 3) GRAESSLE, O. E. *et al.*: Antibiotics & Chemotherapy, 12 : 608-617, 1962.
- 4) 金政泰弘ほか：第 13 回日本化学療法学会総会で発表, 1965.
- 5) 酒井純雄ほか：真菌と真菌症, 1 : 252-257, 1960.
- 6) 野宮文三ほか：日本細菌学雑誌, 18 : 28-37, 1963.