

# 新抗生物質 Enduracidin に関する細菌学的研究

中沢昭三 小野尚子 横田芳武 金森政人 中崎睦子

京都薬科大学 微生物学教室

## はじめに

Enduracidin は 1964 年武田薬品醸酵生産物研究所の柴田、水野らにより西宮市の土壌から分離された 1 放線菌 *Streptomyces fungicidicus* No. B 5477 の菌体より抽出された塩基性ポリペプチド型抗生物質である。

現在私どもはこの Enduracidin (以下 EDC と略す) に関する基礎的研究, とくに細菌学的検討を行なっているが, 現在までに得られた成績を第 1 報として報告する。

## I. 抗菌スペクトラム

各種病原細菌の試験管内感受性を常法の寒天平板希釈法により 37℃ 24 時間後の最小発育阻止濃度 MIC で求めた。

なお, 連鎖球菌群, 肺炎球菌, ジフテリア菌については 10% 血液加寒天培地を, 淋菌髄膜炎菌については G・C 培地を, また嫌気性菌群の破傷風菌, ボツリヌス菌, ウェルシー菌についてはチオグリコール酸塩培地を用いた液体

希釈法により測定した。その成績は表 1 に示されるごとくである。まずグラム陽性菌群に対する EDC はとくに溶血連鎖球菌, 肺炎球菌に非常に強い感受性を示し, いずれも 0.045~0.09 mcg/ml の MIC を示した。ブドウ球菌群については, 黄色ブドウ球菌, 209-P, ペニシリン耐性黄色ブドウ球菌 No. 80 (Penicillinase 産生株), 黄色ブドウ球菌寺島株, 同じく NEWMAN 株, 白色ブドウ球菌, レモン色ブドウ球菌などについてみると, ほぼ 0.19~1.56 mcg/ml の範囲内に MIC が認められた。またジフテリア菌については 1.56 mcg/ml, 枯草菌, 炭疽菌については 0.78~1.56 mcg/ml の感受性を示した。嫌気性菌群の破傷風菌, ボツリヌス菌, ウェルシー菌については <0.39~0.78 mcg/ml の感受性を示している。結核菌 607 に対しては 6.25~12.5 mcg/ml であった。一方, グラム陰性菌群についてはナイセリア属の淋菌が 12.5 mcg/ml, 髄膜炎菌が 50 mcg/ml とかなり感受性が鈍く, その他グラム陰性桿菌たる大腸菌, アエロバクター, クレブジエラ菌, 変形菌, 緑膿菌, サルモネラ菌群, 赤痢菌などについては 100 mcg/ml 以上の MIC でほとんど感受性が見られなかつた。

表 1 抗菌スペクトラム

菌 種	MIC	菌 種	MIC
<i>Staph. aureus</i> 209-P	0.78	<i>Myc. tuberculosis</i> 607	6.25~12.5
<i>Staph. aureus</i> 80 PC-R	1.56	<i>Escherichia coli</i> Denken	>100
<i>Staph. aureus</i> TERASHIMA	1.56	<i>Escherichia coli</i> NIH	>100
<i>Staph. aureus</i> NEWMAN	0.78	<i>Aerobacter aerogenes</i>	>100
<i>Staph. albus</i>	1.56	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100
<i>Staph. citreus</i>	0.19	<i>Proteus vulgaris</i>	>100
<i>Sarcina lutea</i>	0.78	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> No. 12	>100
<i>Str. hemolyticus</i> S-23	0.045	<i>Salmonella typhosa</i> T-287	>100
<i>Str. viridans</i>	3.12	<i>Salmonella typhosa</i> H-901	>100
<i>Str. faecalis</i>	3.12	<i>Salmonella typhosa</i> O-901	>100
<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	0.09	<i>Salmonella enteritidis</i>	>100
<i>Cory. diphtheriae</i>	1.56	<i>Shigella dysenteriae</i>	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-291	0.78	<i>Sh. flexneri</i> 2a	>100
<i>Bacillus anthracis</i>	1.56	<i>Sh. boydii</i>	>100
<i>Clostridium tetani</i>	0.78	<i>Sh. sonnei</i>	>100
<i>Cl. botulinum</i>	0.39	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	12.5
<i>Cl. welchii</i>	<0.39	<i>Neisseria meningitidis</i>	50

(MIC mcg/ml)

## II. 臨床分離病原ブドウ球菌に対する EDC の感受性

1966 年 4 月以降日本各地の大学病院より分与された病原ブドウ球菌約 100 株に対する EDC の感受性を検討した。

図 1 臨床分離ブドウ球菌 (101 株) に対する EDC の感受性

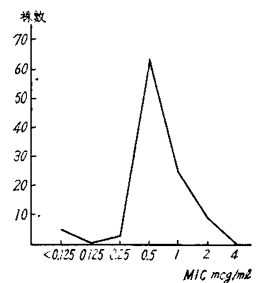


表2 1966年臨床分離病原ブドウ球菌の抗生物質に対する感受性分布

MIC		≤0.005	0.011	0.022	0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	≥100	総数	
抗生物質	PC		8	4	8	6	11	7	4	7	6	7	3	5	6	15	98	
	CER	1	10	21	7	15	22	12	3	1	0	0	1				93	
	TC								4	5	41	5	2	0	2	41	100	
	CP								1	4	43	46	12	1	10	2	99	
	EM		41	1	1	5	3	1	5	5	2	7	2	0	0	26	99	
	SM						13	1	18	31	13	0	1	3	3	7	11	101
	KM							1	17	34	21	16	0	1	2	1	7	100
EDC						4	2	63	24	8							101	

(mcg/ml)

表3 抗菌力におよぼす諸因子の影響

MIC mcg/ml	<i>Staph. aureus</i> 209-P						患者分離多剤耐性ブ菌						cont.	
	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15	0.08	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15	0.08		
pH	5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	6	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	7	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	8	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	9	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
血清 (%)	50	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	25	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	10	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	0	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
菌量 cell/ml	2×10 <sup>7</sup>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	2×10 <sup>6</sup>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	2×10 <sup>5</sup>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	2×10 <sup>4</sup>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	2×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	2×10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+

(37°C, 24 hrs)

測定方法は常法の寒天平板希釈法で 37°C 24 hr 判定で行なった。その成績は表2, 図1のごとくである。すなわち, ブドウ球菌標準株の感受性は表1で述べたごとく 0.19~1.56 mcg/ml であつたが, この成績を見ると, ほとんど全部の試験菌株が標準株と同一か, さらに良い 0.69~1.56 mcg/ml の範囲にあることがわかつた。

なお, この場合, 既知抗生物質 Penicillin-G (PC),

Cephaloridine (CER), Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CP), Erythromycin (EM), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM) も同時に比較検討し, これら既知抗生物質多剤耐性株との交叉耐性について検討したが EDC はこれら既知抗生物質はもちろん, さらにサルファ剤, ニトロフラン系薬剤ともまったく交叉耐性は認められなかつた。

III. 抗菌作用に及ぼす諸因子の影響

試験管内抗菌力に及ぼす培地 pH, 血清, 菌量の影響をブドウ球菌 209-P, 患者分離多剤耐性ブドウ球菌 2 株を用いて検討した。その成績は表3に示されるごとくである。すなわち pH の場合, pH 8~9 でやや抗菌力が増強された。また血清蛋白の影響についてはほとんど見られなかつた。次に接種菌量の影響については 2×10<sup>2</sup> より 2×10<sup>7</sup> 接種まで検討した。その結果, ブドウ球菌 209-P, 多

剤耐性ブドウ球菌いずれの場合でも接種菌量により著しい感受性の変動が認められた。

IV. 抗菌作用の型式

(1) 石炭酸係数測定法応用による殺菌効果について

EDC の殺菌作用を石炭酸係数測定方法を応用して検討した。対照にフェノールを置き, 試験菌としてブドウ

表4 石炭酸係数測定法による殺菌効果

Phenol		2.5	5	10	15
濃度	分				
×70		—	—	—	—
×80		+	+	—	—
×90		+	+	+	—
×100		+	+	+	+

EDC		2.5	5	10	15
濃度	分				
×2,000		—	—	—	—
×10,000		—	—	—	—
×20,000		+	+	+	+
×100,000		+	+	+	+

(37°C 24 hrs)

球菌 209-P 株を用いた。その成績は表4に示されるごとくである。すなわち、EDCは10,000倍の希釈濃度において2.5分の接触により完全にブドウ球菌を殺菌していることがわかる。この強さはすでに私どもが既知化学療法剤について報告したPC-G, CERなどの強力な殺菌効果とかなり近いことがわかる。現在比較検討中である。

(2) ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼす影響

多剤耐性ブドウ球菌の増殖曲線を比濁法および生菌数法により測定しこの増殖曲線におよぼすEDCの影響を検討した。その成績は図2(a, b), 図3(a, b)に示されるごとくである。まず培養当初に薬剤を0.1 mcg/ml, 0.05 mcg/ml, 0.01 mcg/mlを添加すると図2(a)のご

とく、比濁法では0.1 mcg/mlにおいては74時間まで観察したがほとんど増殖は認められず完全な誘導期の延長が見られ、一方、混濁寒天平板法によりそのときの生菌数におよぼす影響を求めると図2(b)のごとくである。すなわち著明な殺菌作用による菌数の著しい減少が見られる。しかしながらその半量~1/10量の0.05 mcg/ml 0.01 mcg/mlの場合は比濁法の場合も、生菌数の場合もいずれの実験法においても対照と同じような増殖曲線を描きほとんど抑制効果が出ていないことが認められた。

次に薬剤を対数期の途中、すなわち、培養開始後8時間目に添加した成績は図3(a, b)に示されるごとくである。すなわち、この場合薬剤添加量は前回より多く、成人常用量筋注の場合の血中濃度のピークなどを考慮し

図2-a 臨床分離多剤耐性ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼすEDCの影響(比濁法)

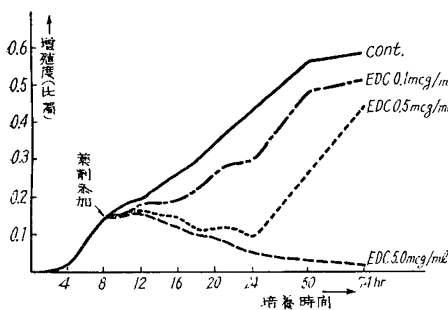


図2-b 臨床分離多剤耐性ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼすEDCの影響(生菌数)

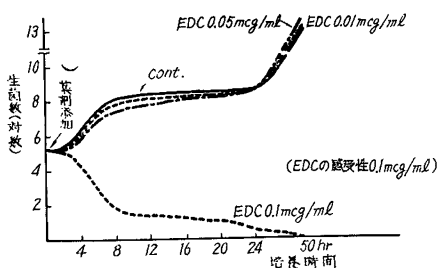


図3-a 臨床分離多剤耐性ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼすEDCの影響(比濁法)

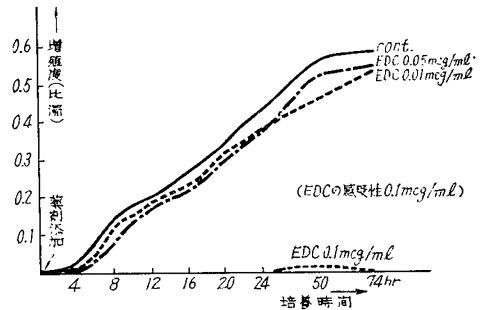
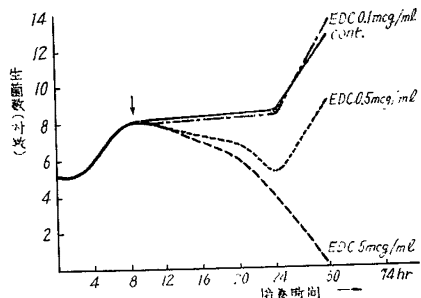


図3-b 臨床分離多剤耐性ブドウ球菌の増殖曲線に及ぼすEDCの影響(生菌数)



て、5 mcg/ml, 0.5 mcg/ml, 0.1 mcg/ml と添加した。5 mcg/ml 添加においては、対照に較べ著明な殺菌～溶菌による濁度の希薄化が見られ顕著な菌数減少曲線が描かれた。0.5 mcg/ml 添加では、約 16 時間まで 5 mcg/ml と同じように著明に減少してゆくが、その後、再び増殖を開始し、その曲線は対照と同じ角度で上昇している。0.1 mcg/ml ではほとんど対照に近い曲線を描いており余り効果は認められない。以上の (1) および (2) の実験成績から考察すると EDC は従来の抗生物質とはかなり異なつた型の阻害曲線を示していることがわかる。すなわち、非常に強力な殺菌作用を有しており、静菌作用のほとんど認められない抗生物質と思われる。

V. 試験管内における既知抗生物質との併用効果

常法の肉汁ブイヨンによる液体希釈法により、PC, SM, KM, Gramicidin-J など 4 種の既知抗生物質との

併用効果を検討した。その成績は表 5, 表 6 に示されるごとくである。この結果 PC との間ではある濃度との組合せでは協力的にでているが、とくに配糖体抗生物質である SM, KM にあつてはかなり明らかな協力効果がでていることが認められる。また興味深いことは化学的に同じポリペプチド型抗生物質である Gramicidin-J との併用については全く無影響であつた。

VI. マウス実験的感染症に対する治療効果

マウス実験的溶血レンサ球菌、肺炎球菌、ブドウ球菌感染症に対する EDC の治療効果を現在実験的に最も強い効果を示す合成 Cephalosporin-C 系抗生物質 CER を対照薬剤として比較検討した。

(1) マウス実験的溶血レンサ球菌感染症に対する効果  
実験方法; 体重 17g ± 0.5, dd 系マウスに 100 LD<sub>50</sub> レンサ球菌を腹腔内に感染させ、2 時間後に EDC 0.05

表 5 Staph. aureus 209-P に対する Penicillin-G と EDC の併用

		Penicillin-G mcg/ml						EDC 単独
		0.024	0.012	0.006	0.003	0.0015	0.00075	
EDC mcg/ml	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.195	-	-	-	-	-	-	+
	0.097	-	-	+	+	+	+	+
	0.048	-	+	+	+	+	+	+
	0.024	-	+	+	+	+	+	+
PC-G 単独		-	+	+	+	+	+	

表

Kanamycin との併用

		Kanamycin mcg/ml						EDC 単独
		0.78	0.39	0.195	0.097	0.048	0.024	
EDC mcg/ml	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	+
	0.195	-	-	-	+	+	+	+
	0.097	-	-	+	+	+	+	+
	0.048	-	+	+	+	+	+	+
	0.024	-	+	+	+	+	+	+
KM 単独		-	+	+	+	+	+	

表 5 Streptomycin との併用

		Streptomycin mcg/ml						EDC 単独
		0.78	0.39	0.195	0.097	0.048	0.024	
EDC mcg/ml	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.195	-	-	-	-	+	+	+
	0.097	-	-	-	+	+	+	+
	0.048	-	-	+	+	+	+	+
	0.024	-	+	+	+	+	+	+
SM 単独		-	+	+	+	+	+	

表

表 6 Gramicidin-J との併用

		Gramicidin-J mcg/ml						EDC 単独
		1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048	
EDC mcg/ml	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.195	-	+	+	+	+	+	+
	0.097	-	+	+	+	+	+	+
	0.048	-	+	+	+	+	+	+
	0.024	-	+	+	+	+	+	+
Gram.J 単独		-	+	+	+	+	+	

図4 マウス実験的溶血レンサ球菌感染症に対する効果

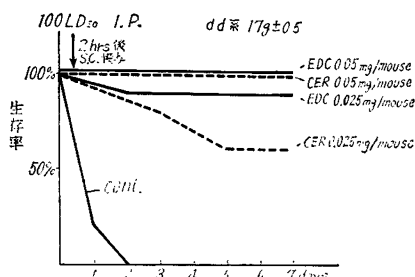


図5 マウス実験的肺炎双球菌感染症に対する効果

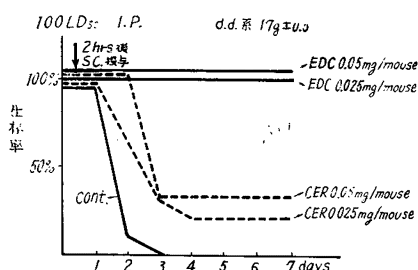
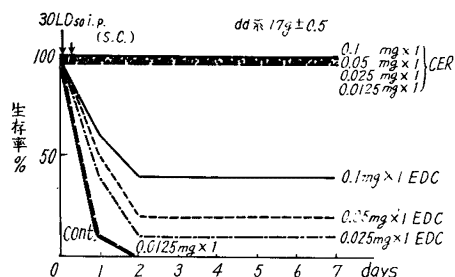


図6 マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する効果



mcg/mouse, 0.025 mg/mouse, CER も同量1回皮下に投与し7日間観察した。その成績は図4に示されるごとくである。すなわち、EDC 0.05 mg, CER 0.05 mg 投与では100%の完全延命効果を示し、EDC 0.025 mg 投与では90%, CER 0.025 mg 投与では60%と明らかにEDCの効果が優れていることがわかる。

### (2) マウス実験的肺炎球菌感染症に対する効果

実験方法; (1)と同様100 LD<sub>50</sub>肺炎球菌III型を腹腔内に感染させ、2時間後にEDC, CERを0.05 mg, 0.025 mg, 1回皮下投与した。その成績は図5に示されるごとくである。この場合EDC, CER両者の間には非常に大きな差異が認められ、EDC 0.05 mg および0.025 mg 投与では共に100%の効果が見られたが、CER 0.05 mg, 0.025 mgの投与では20~30%の生存率しか得られなかった。以上の(1), (2)の実験成績はEDCが溶血

レンサ球菌, 肺炎球菌に対し試験管内感受性が非常に高いことと一致し興味深い。

### (3) マウス実験的ブドウ球菌感染症に対する効果

実験方法; 東大岩田教授分与 *Staph. aureus* E-46 株を3%ムチン液に懸濁させ、30 LD<sub>50</sub>腹腔内に感染させEDC 0.1 mg, 0.05 mg, 0.025 mgを上記同様に皮下投与した成績は図6のごとくである。この場合も対照としてCERを同一条件で使用した。その成績は、上記レンサ球菌, 肺炎球菌の場合と異なり、EDCの効果はCERよりかなり劣っていた。すなわち、CER 0.025 mg 1回投与で100%の延命効果を示したが、EDCでは0.1 mgで約40%, 0.05 mgで約20%, 0.025 mgで約10%の延命効果しか得られなかった。0.0125 mgでは対照と同じで、延命効果は全くみられなかった。この成績はEDCの試験管内におけるブドウ球菌に対する感受性がレンサ球菌, 肺炎球菌よりかなり鈍かったと考えあわすと、この場合もまた動物実験と試験管内感受性が並行しているように思われる。

## VII. ま と め

武田薬品醸酵生産物研究所において発見された新しいポリペプチド型抗生物質 Enduracidin に関し細菌学的研究を行なっているが、現在まで次のごとく成績を得た。

1) 抗菌スペクトラムはグラム陽性の球菌, および桿菌にのみ有効でグラム陰性球菌および桿菌に対しては無効であった。また、抗酸性菌である結核菌に対しては、やや感受性を認めている。

2) 臨床的に分離した病原ブドウ球菌約100株(多剤耐性菌を多く含む)に対しては標準株と同じ感受性を示し、既知化学療法剤との間に交叉耐性は見られなかった。

3) 抗菌作用におよぼす諸因子の影響はpH, 血清蛋白では余りなく、菌量による影響が著明であった。

次に、抗菌作用の型式については非常に殺菌的でありほとんど静菌的作用は認められないようである。

4) 既知抗生物質との試験管内の併用効果については配糖体抗生物質である Streptomycin, Kanamycin との間に明らかな協力効果が認められたが、化学的に近似したポリペプチド型抗生物質 Gramicidin-J との間では無影響であった。

5) マウス実験的諸種細菌感染症に対する効果については、とくに溶血レンサ球菌, 肺炎球菌に対する治療効果は非常に強力に対照薬剤として置いた合成 Cephalosporin-C 系抗生物質 Cephaloridine よりも優れた効果を示した。しかしながら、ブドウ球菌に対する効果に

ついては、レンサ球菌、肺炎双球菌に較べるとかなり劣り、Cephaloridine の効果に比し、一段と劣ることが認められた。

現在、Enduracidin のブドウ球菌細胞に対する超薄切片像での形態的变化を電子顕微鏡により追究中であり、また、本物質の吸収、体内分布、排泄についても実験を進めているので、第2報として続報する。

終りに本物質を提供された武田薬品工業株式会社に感謝するとともに本研究に非常に協力下さった京都薬科大学微生物教室の諸兄姉に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

東出栄治、波多野和徳、柴田元雄、中沢鴻一：新抗生物質 Enduracidin の研究. I. Enduracidin 生産菌

*Streptomyces fungicidicus* No. B5477. 第153回日本抗生物質学術協議会 1967, 1, 27

浅井満子、室井正之、杉田紀夫、川島寛、水野公明、三宅彰：新抗生物質 Enduracidin の研究. II. Enduracidin の分離、精製とその理化学的性状. 第153回日本抗生物質学術協議会, 1967, 1, 27

土屋皖司、近藤正熙、大石登喜子、山崎俊幸、横谷肇：新抗生物質 Enduracidin に関する研究. III. Enduracidin の生物学的性状. 第153回日本抗生物質学術協議会, 1967, 1, 27

土屋皖司、近藤正熙、大石登喜子、善養寺浩、大久保暢夫、五島瑳智子：新抗生物質 Enduracidin の研究. IV. Enduracidin の病原細菌に対する抗菌作用. 第40回日本細菌学会総会, 1967, 3, 31

## BACTERIOLOGICAL STUDIES ON ENDURACIDIN, A NEW ANTIBIOTIC SUBSTANCE

SHOZO NAKAZAWA, HISAKO ONO, YOSHITAKE YOKOTA,  
MASATO KANAMORI & MUTSUKO NAKASAKI  
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

### Summary

A bacteriological study of enduracidin, a new polypeptide antibiotic which was discovered by Microbiological Research Laboratories of Takeda Chemical Industries, Ltd. has been carried out, and the following findings have so far been obtained:

1. From the standpoint of the antibiotic spectrum, enduracidin was found effectively only against Gram-positive cocci and bacilli, and ineffective against Gram-negative cocci and bacilli. Further, the test antibiotic has a slight effect against *Myc. tuberculosis* which is an acid-fast bacteria.

2. Enduracidin was found to be as effective against about 100 strains of clinically isolated pathogenic *Staphylococci* (including those resistant to 2 or more antibiotics) as against the standard strains, but there was no cross resistance with the already known chemotherapeutics.

3. Tests on the influence of various factors on the antibiotic activity of enduracidin revealed that the variations in pH value and addition of serum protein did not exert any appreciable effect, but the variations in the amount of inoculum greatly influenced the antibiotic activity of the test antibiotic.

Examination of the type of antibiotic activity of the test substance disclosed that it is strongly bactericidal but scarcely bacteriostatic.

4. *In-vitro* experiment on the effect of enduracidin in combination with the already known antibiotics showed that the test antibiotic was synergistic with streptomycin and kanamycin, which are a glucoside antibiotic, but not synergistic with gramicidin-J, which is a chemically similar polypeptide antibiotic.

5. Enduracidin was found to be very potent in therapeutic effect against experimental infections in mice—*Streptococcus hemolyticus* and *D. pneumoniae* in particular, and superior to cephaloridine, an antibiotic of synthetic cephalosporin-C group. The test antibiotic, however, was considerably less active in effect against *Staphylococcus*, being inferior to cephaloridine.

The morphological changes in the cells of *Staphylococcus* caused by enduracidin are being electron-microscopically examined using super-micro slices of the sample at present, and the study on the absorption, distribution *in vivo* and excretion of enduracidin is under way. The findings will be published later.