

〔原著〕 *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai の菌学およびその  
生産する抗生物質 mycomethoxin A, mycomethoxin B に関する研究

山 中 茂\*

(昭和47年3月24日受付)

要 旨

1. 1960年別府の土壌から新井によって分離された放線菌 KS 2-74 株の菌学的研究の結果、本菌を *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai の neotype と同定した。
2. 本菌の代謝産物である 1-methoxyphenazine, 1, 6-dimethoxyphenazine, および methyl phenazine-1-carboxylate がミコバクテリアに対して抗菌活性を有することを明らかにした。
3. 上記2.の結果を基礎として *S. luteoreticuli* の産生する phenazine 系代謝産物をさらに探索し, mp 150~151° の黄色針状晶 (IV), ならびに mp 187~188° の橙黄色針状晶 (V) を分離同定した。
4. (IV)および(V)の抗菌作用を検索し, *Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv ならびにストレプトマイシン 1000 µg/ml 耐性株を含むミコバクテリアに対して抗菌性を有することを認め, (IV)および(V)を mycomethoxin A および B と命名した。
5. 上記の各天然 phenazine 化合物がいずれもミコバクテリアに対して抗菌活性を有することから, 合成 phenazine 化合物の抗菌性を探索し, これらのうち主として methoxylate phenazine 化合物がミコバクテリアに対して天然 phenazine 化合物と同様な抗菌活性を有することを明かにした。

Keywords: *Streptomyces luteoreticuli*, phenazine, 抗菌性, mycomethoxin A, mycomethoxin B, *Mycobact. tuberculosis*

略語一覧: Mycobact: Mycobacterium      S.: Streptomyces  
E.: Escherichia      MIC: Minimum Inhibitory Concentration

はじめに

微生物間の拮抗現象の研究は, Tyndall (1876)<sup>1)</sup> あるいは Pasteur および Joubert (1877)<sup>2)</sup> に始まり, その後本現象の要因のひとつとして, 介在する阻害物質の研究が Gosió [mycophenolic acid (1896)]<sup>3)</sup>, Alsberg

および Black [mycophenolic acid (1913)]<sup>4)</sup>, Fleming [penicillin (1929)]<sup>5)</sup>, Dubos [tyrothricin (1939)]<sup>6)</sup> らによって報告されているが, 現在の抗生物質に関する研究は Florey ら (1941)<sup>7)</sup> による penicillin の再発見に始まるといえよう。

以来微生物の産生する2次代謝産物の中に抗菌作用を

\*千葉大学腐敗研究所抗生物質部 (指導: 新井 正教授)

SHIGERU YAMANAKA: Mycological studies on *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai and the isolation of two new antibiotics, mycomethoxin A and B.

Department of Antibiotics, Institute of Food Microbiology, Chiba University, Narashino.

Received for publication, March 24, 1972.

有する物質が存在し、そのうちのある物は化学療法剤と成り得るといふ指導原理のもとに千数百種に及ぶ抗生物質の発見がなされ、そのうち30余種の抗生物質とそれらの誘導体が化学療法剤として開発されてきた。

しかし植竹ら(1953)<sup>8)</sup>によるストレプトマイシン 100  $\mu\text{g/ml}$  耐性赤痢菌の分離に始まる耐性菌の出現と、以後の年次的急増、なかんずく主要な抗性物質および合成化学療法剤に同時に耐性を示すいわゆる多剤耐性菌の出現<sup>9)</sup>、ならびにこれら薬剤耐性が薬剤耐性伝達因子(R因子)と呼ばれる特異な細胞質内因子によって薬剤感受性菌に伝達される事実<sup>10)</sup>の発見は、化学療法剤による治療上重大なる難問を提出したといえる。

著者の研究に関連する結核菌感染症の化学療法剤においても事情は同様であり、小川<sup>11)</sup>によれば1966年において既に結核未治療者の排菌の1/5前後、既治療者の1/2以上が耐性菌であるとされている。

上述の事実は新抗生物質の発見が再び強く要望されるゆえんである。著者は今回 *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai の neotype と同定した放線菌 KS 2-74 株の微量代謝産物に着目し、その生物学的作用に関する研究を行なった結果、mycomethoxin A および B をはじめ本菌の他の phenazine 系代謝産物の抗菌作用を明らかにすることができた。さらに入手し得る限りの合成 phenazine 誘導体の抗菌作用をも検討し、新化学療法剤探索のひとつの可能性を明らかにすることができたのであわせて報告する。

## 実験材料ならびに方法

### 1. 放線菌 KS 2-74 株の同定

供試菌は1960年本学腐敗研究所新井正教授により、別府の土壌から分離された放線菌 KS 2-74 株の凍結乾燥法による教室保存株を用い、実験方法は International Streptomyces Project (ISP) において Genus *Streptomyces* の type strain ならびに neotype strain の記載のために採用されている方法<sup>12)</sup> によった。

実験に用いた菌株はいずれの場合にも凍結乾燥保存胞子をグルコース・アスパラギン寒天に接種し、27°C 2週間培養した後に用いた。光学顕微鏡による観察はキチン培地に接種後27°C 1週間培養して行なった。また電子顕微鏡による観察にはオートミール培地に27°C 1週間培養後気菌系を生理食塩水に懸濁させた試料を用い4000倍で鏡検した。

### 2. *Streptomyces luteoreticuli* の生産する phenazine 系化合物の試験管内抗菌作用

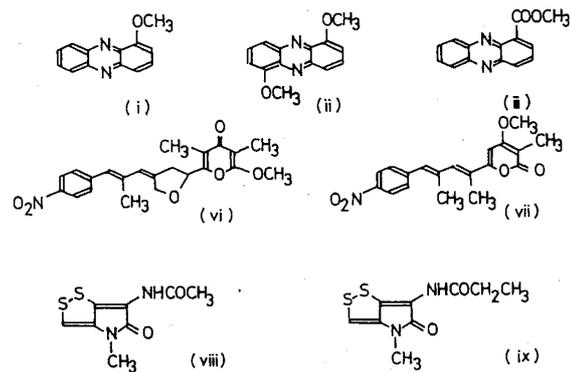


図1. *Streptomyces luteoreticuli* KS 2-74 株の生産する代謝産物の構造

*Streptomyces luteoreticuli* の neotype と同定した KS 2-74 株の代謝産物としては、図1に示した化合物をはじめ mp 150~151° の黄色針状晶(IV)および mp 187~188° の橙黄色針状晶(V)、その他12種の2次代謝産物が小山らにより単離され、それぞれ化学的研究が行なわれてきた<sup>13,14)</sup>。

著者はこれらの代謝産物のうち、特に微量成分である 1-methoxyphenazine (I)、1,6-dimethoxyphenazine (II)、methyl phenazine-1-carboxylate (III) がいずれもその生物学的作用に関しては未検索であることに着目し、その試験管内抗菌作用の検討を試みた。

供試した phenazine は天然から単離された代謝産物とそれぞれ同定した合成 phenazine 化合物 (I)、(II)、(III) を用いた。培養基としては Brain Heart Infusion 培地(BHI)を用いた。被検菌は教室保存の *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus subtilis* PCI 219, *Escherichia coli* F<sub>1</sub>, *Mycobacterium* sp. 607, *Candida stellatoidea*, *Aspergillus niger* の6菌株を用いた。

前記3種の phenazine 化合物は水に難溶のため、まず MeOH に加温して、溶解し、滅菌蒸留水を加えて50% MeOH 溶液を作製し、それぞれ上記培地を用いて系列希釈を行なった。MeOH の最終濃度は5%以下になるようにした。

上述のように作製した各寒天平板に、上記各被検菌を接種し、37°C 48時間培養後、その発育の有無を判定した。

### 3. 代謝産物(IV)(新抗生物質 mycomethoxin A) および代謝産物(V)(新抗生物質 mycomethoxin B) の単離、同定

本菌の培養菌体のアセトン抽出液を減圧濃縮し、残留する水性溶液を再びクロロホルムで抽出、水洗乾燥後濃縮、アルミナカラムクロマイグラフィに付し、クロ

ロホルムで溶出した黄橙色分画の薄層クロマトグラフィー (TLC) 上のスポットを求める。

また上記黄橙色分画を分別再結晶し、アルミナおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、TLC 上に得られた分画を分取薄層クロマトグラフィーにより分離し、TLC 上単一のスポットを与える分画を得る。これらをそれぞれ標品<sup>13)</sup>との混融ならびに IR により同定した。

#### 4. phenazine 類の試験管内抗菌作用

a. 代謝産物 (IV) (mycomethoxin A) および代謝産物 (V) (mycomethoxin B) の試験管内抗菌作用。

培養基としては BHI 培地以外に Gladstone 培地による検索、またミコバクテリアに対する抗菌作用の検索のためには Sauton 液体培地を用いた。

被検菌としてはさきに (I), (II), (III) の抗菌試験に用いた 6 菌株のほかに、(IV) については表 1 に示した 23 菌株について同様の検索を行なった。またミコバクテリアに対する抗菌作用を明かにするため *Mycobact. tuberculosis* 松戸株, *Mycobact. tuberculosis* 丸株, *Mycobact. tuberculosis* SM (ストレプトマイシン) 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$

耐性株, *Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv 株, *Mycobact. bovis* (BCG) 株, *Mycobact. bovis* IFM 2032 株, *Mycobact. avium* 830 株の 7 株について検査した。試料の希釈系列の作成は 2. に準じて行なった。

b. *Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物のミコバクテリアに対する試験管内抗菌作用。

*Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物 (I), (II), (III) の Sauton 液体培地におけるミコバクテリアに対する抗菌作用を、mycomethoxin A における場合と同様に検索した。

c. 合成 phenazine 系化合物の試験管内抗菌作用

a. におけると同様の実験材料ならびに方法を用いたが、一部は GSA 培地を用いた。試料として用いた合成 phenazine を 図 2 に一括して示す。

表 1. Mycomethoxin A の抗菌スペクトル (medium: brain heart infusion agar). ※は不完全阻止

被 検 菌	MIC ( $\mu/\text{ml}$ )
<i>Staph. aureus</i> 209 P	>100
<i>Staph. aureus</i> Terajima	>100
<i>Staph. albus</i>	>100
<i>Staph. citreus</i>	>100
<i>Sarcina lutea</i>	>100
<i>Strept. faecalis</i>	>100
<i>Strept. pyogenes</i> S 8	>100
<i>Strept. pyogenes</i> Dick	>100
<i>Lactobacillus casei</i>	>100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	※ 75
<i>Mycobacterium</i> sp. 607	25 ※7.5
<i>Escherichia coli</i> F <sub>1</sub>	>100
<i>Aerobacter aerogenes</i>	>100
<i>Salmonella typhi</i>	>100
<i>Shigella dysenteriae</i> Shiga	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100
<i>Serratia marcescens</i> S 32	>100
<i>Candida albicans</i>	>100
<i>Torula rubra</i>	>100
<i>Aspergillus niger</i>	>100
<i>Penicillium glaucum</i>	>100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	※ 50

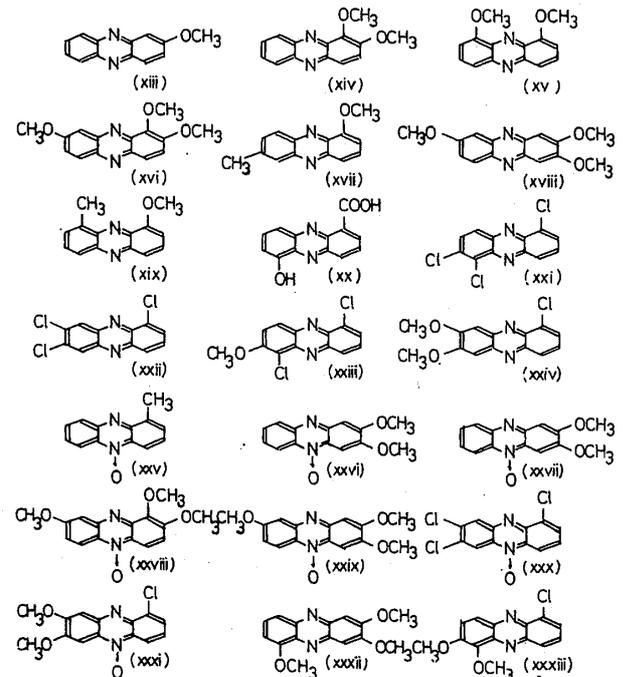


図 2. テストされた合成 phenazine 化合物

#### 実験成績

1. イーストエキストラクト-マルトエキストラクト寒天培地に培養した KS 2-74 株の肉眼的所見は 図 3 の通りである。

栄養菌糸は pale brown の発育をなし、白色綿状の気菌糸を豊富に着生し、後に胞子を形成するに到り汚れた olive green の色調を帯びる。

はじめ 40~50  $\mu$  の間隔に生じた短い菌糸は、10~15  $\mu$  の輪生分岐 (whirl) となり、さらに培養の経過とともに

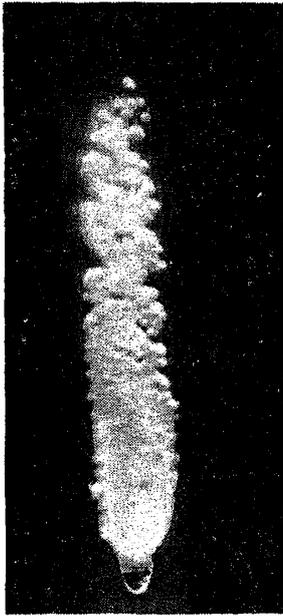


図 3. KS 2-74 株の肉眼的所見

に第 2 次の輪生分岐を形成する。また胞子の形状は円柱状であり、 $0.7 \times 1.5 \mu$  であった。気菌糸の光学顕微鏡写真ならびに胞子の電子顕微鏡写真は図 4 および 5 に示したが、胞子の表面は平滑であり数個が鎖状に並んでいる。

ISP の方法に従って行なった培養性状の検索結果を表 2 に示したが、栄養菌糸は大多数の培地で限局性に発育し、cream, yellowish brown から pale brown を呈

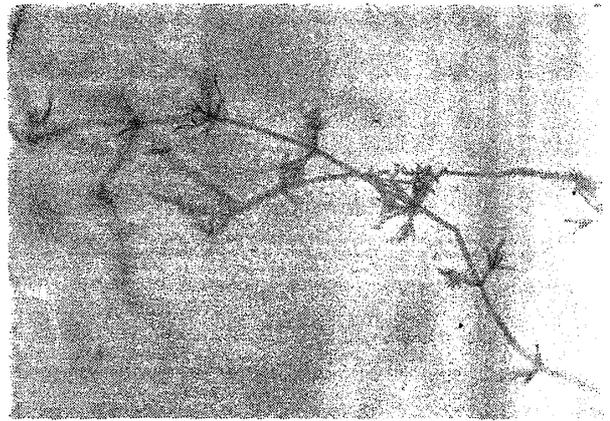


図 4. KS 2-74 株の気菌糸の顕微鏡写真 ( $\times 300$ )

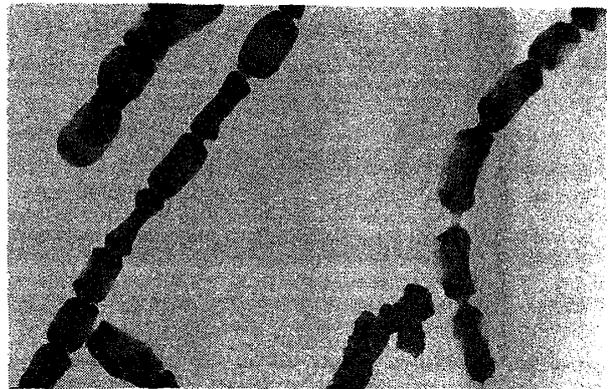


図 5. KS 2-74 株の胞子の電子顕微鏡写真 ( $\times 4000$ )

表 2. *Streptomyces luteoreticuli* KS 2-74 株の培養性状

培 養 基	栄 養 菌 糸	気 菌 糸	溶 解 性 色 素
Synthetic agar	spreading, penetrating, yellowish brown to pale brown	white to cream colored	none
Glucose-asparagine agar	spreading, penetrating, greyish brown to pale brown	white to olive green, cottony	sometimes brown
Plain agar	minute colonies, yellowish to cream colored	white to greenish yellow, cottony	olive green
Yeast-extract agar	spreading, brown to pale brown	white to olive green, cottony	faint yellow
Ca-malate agar	minute colonies, cream colored	none	none
Starch agar	bacterial colonies, colorless	white, cottony	none
Egg-medium	good growth, greyish brown	white to olive green, cottony	none
Potato plug	thick, flax colored	white	none
Tyrosine agar	brownish yellow	white to olive green	faint olive
Milk	in ring on the surface, olive colored	white, cottony	yellowish to cream
Peptone water	brownish on the surface	white to cream, cottony	yellow
Blood agar	no hemolysis.		
Cellulose	not decomposed.		
Nitrites	produced from nitrates.		
Starch	not hydrolysed.		

する。また大多数の培地において white, cream から olive green の豊富な気菌糸を着生し, Ca-malate 培地<sup>16)</sup>においては<sup>16)</sup>の着生を見なかった。なお一般に greenish yellow の可溶性色素を産生するのを特長とした。

糖利用能の検索結果は表 3 に示す通りで、比較的限局された利用能を示している。

2. *Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物 (I), (II), (III) の試験管内抗菌作用の検査結果を表 4 に一括して示した。

(I), (II), (III)はいずれも *Mycobact. sp. 607* に対

表 3. *Streptomyces luteoreticuli* KS 2-74 株の糖利用能

	KS 2-74 株	<i>S. luteoreticuli</i>
adnitol	+	-
dextrin	卍	+
arabinose	+	+
dulcitol	+	+
galactose	+	卍
inositol	卍	卍
inulin	卍	-
lactose	+	+
maltose	卍	+
mannitol	+	-
mannose	卍	+
rhaffinose	+	-
rhamnose	+	-
salicin	卍	+
sorbitol	+	+
xylose	+	-
Na-citrate	+	+
Na-succinate	+	+
Na-acetate	+	-
control	-	-

表 4. *Streptomyces luteoreticuli* KS 2-74 株の生産する phenazine 化合物 (I), (II), (III) の抗菌スペクトル  
単位は MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ), ※は不完全阻止

	(I)	(II)	(III)
<i>Staph. aureus</i> 209 P	>100	>100	>100
<i>B. subtilis</i>	>100	>100	>100
<i>E. coli</i> F <sub>1</sub>	>100	>100	>100
<i>Mycobact. sp. 607</i>	※ 50	※100	10 ※ 7.5
<i>Candida stellatoidea</i>	>100	>100	※100
<i>Asp. niger</i>	>100	>100	>100

して 7.5~100  $\mu\text{g/ml}$  で不完全発育阻止作用を示した。

3. mycomethoxin A および B の確認のために行なった TLC 上のスポットは図 6 に示す通りである。

このうち f および g に相当するスポットは、紫外線照射 (360 m $\mu$ ) 下において 1-methoxyphenazine (I) (スポット h) および 1, 6-dimethoxyphenazine (II) (スポット d) と同様な輝黄色蛍光を示した。

分取薄層クロマトグラフィーにより分離し、TLC 上単一のスポットとして得られた分画のうち、f に相当するものは酢酸 エチルから再結晶して、mp 187~188° の橙黄色針状晶 (IV) として単離し、g に相当する分画はエタノールから再結晶して、mp 150~151° の黄色針状晶 (V) として単離した。

4. a. Gladstone 培地を用いて (I), (II), (III) の抗菌試験と同じく 6 種の菌株について行なった抗菌作用の結果を表 5 に、また同様に BHI 培地の成績を表 1 に示した。

これらの結果から明かなように (IV) は *Mycobact. sp. 607* に対して 24 時間後の判定で 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , 48 時間で 75  $\mu\text{g/ml}$  の完全発育阻止作用を示し、(V) は 24 時間後で 25  $\mu\text{g/ml}$ , 48 時間で 50  $\mu\text{g/ml}$  の完全発育阻止作用を示し、これらの代謝産物がいずれもミコバクテリアに対し選択毒性を示すことが明かとなった。

上記の知見のもとにこれら両物質の化学療法剤としての開発の可能性を検討するため、(IV)について *Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv を含む 7 種のミコバクテリアに対

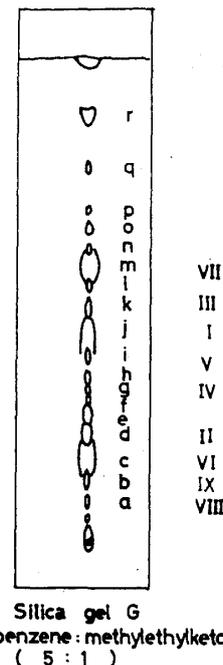


図 6. *Streptomyces luteoreticuli* 代謝産物の薄層クロマトグラム

する抗菌作用を検索し、その結果を表6に示したが、(IV)は *Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv に対し、4週間後の判定で、2.5 µg/ml, 5週間で 5.0 µg/ml の完全発育

表5. mycomethoxin A (IV)およびB (V)の抗菌スペクトル  
(medium: Gladstone), 単位は MIC (µg/ml)  
※は不完全阻止

被検菌	mycomethoxin A		mycomethoxin B	
	24 hrs.	48 hrs.	24 hrs.	48 hrs.
<i>Staph. aureus</i> 209 p	>100	>100	>100	>100
<i>B. subtilis</i>	※75.0	>100	※50	>100
<i>E. coli</i> F <sub>1</sub>	>100	>100	>100	>100
<i>Mycobact. sp.</i> 607	2.5 ※1.0	75 ※7.5	25 ※2.5	50
<i>Candida stellatoidea</i>	>100	>100	>100	>100
<i>Asp. niger</i>	>100	>100	>100	>100

表6. mycomethoxin A のミコバクテリアに対する抗菌作用  
単位は MIC (µg/ml), ※は不完全阻止

被検菌	1週	2週	3週	4週	5週
<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	2.5	5.0
<i>Mycobact. tuberculosis</i> 丸株	—	—	—	1.0	2.5
<i>Mycobact. tuberculosis</i> SM 1000 µg/ml	—	—	—	2.5	2.5
<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸株	—	—	—	1.0	2.5
<i>Mycobact. bovis</i> (BCG)	—	—	—	1.0	1.0
<i>Mycobact. bovis</i> IFM 2032	—	—	—	0.5	1.0
<i>Mycobact. avium</i> 830	10.0 ※1.0	25.0 ※2.5	50.0 ※2.5	50.0 ※5.0	50.0 ※5.0

表8. 合成 phenazine 類の抗菌スペクトル(1)

(medium: Gladston または Glucose-starch agar, 37°C, 48 hrs,) 単位は MIC (µg/ml),  
※は不完全阻止, †印は GSA 培地

被検菌	(XV)	(XVIII)	(XX)	(XXI)	(XXII)	(XXIII)†	(XXIV)	(XXVI)†	(XXX)†	(XXXII)
<i>Staph. aureus</i> 209 P	>100	>100	10.0 ※5.0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>B. subtilis</i>	>100	>100	25.0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>E. coli</i> F <sub>1</sub>	>100	>100	100 ※50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Mycobact. sp.</i> 607	>100	25.0	>100	>100	100 ※50	>100	>100	2.5 ※1.0	>100	>100
<i>Candida stellatoidea</i>	>100	>100	※100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Asp. niger</i>	>100	>100	※100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

阻止作用を示した。また *Mcobact. tuberculosis* SM 1000 µg 耐性株に対しても、2.5 µg/ml で抗菌作用を示し、比較的低濃度で有効であることが明らかとなった。

b. *Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物 (I) (III) について、mycomethoxin A と同じく Sauton 液体培地内ミコバクテリアに対する抗菌作用を検索したところ表7のような結果を得た。すなわち、*Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv を含む4種のミコバクテリアに対して 1-methoxyphenazine (I) は 0.5~7.5 µg/ml, methyl phenazine-1-carboxylate (III) は 1.0~10 µg/ml で完全発育阻止作用を示した。

c. 図2に示された合成 phenazine のうち10種のものについて、Gladstone 培地または GSA 培地を用いて、天然 phenazine 類の抗菌試験と同様の6菌株に

表7. 化合物 (I) および (III) のミコバクテリアに対する抗菌作用  
(medium: Sauton, 37°C), 単位は MIC (µg/ml), ※は不完全阻止

化合物	被検菌	1週	2週	3週	4週	5週
(I)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	0.5	0.5
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	0.5	0.5
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	<0.5	0.5	0.5
	<i>Mycobact. avium</i> 830	<0.5	1.0 ※0.5	2.5 ※0.5	7.5 ※0.5	7.5 ※0.5
(III)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	1.0	2.5
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	2.5	2.5
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	0.5	0.5	1.0
	<i>Mycobact. avium</i> 830	10.0 ※0.5	10.0 ※7.5	10.0 ※7.5	10.0 ※7.5	10.0

表 9. 合成 phenazine 類の抗菌スペクトル(2)  
(medium: brain heart infusion agar), 単位は MIC( $\mu\text{g/ml}$ ), ※は不完全阻止

被 検 菌	(XIII)	(XIV)	(XVI)	(XVII)	(XIX)	(XXV)	(XXVII)	(XXVIII)	(XXIX)	(XXXI)	(XXXIII)
<i>Staph. aureus</i> 209 p	50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staph. aureus</i> Terajima	75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staph. albus</i>	75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staph. citreus</i>	75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Sarcina lutea</i>	25	>100	>100	100 ※ 75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Strept. faecalis</i>	50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Strept. pyogenes</i> S 8	25	>100	※100	100 ※ 50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Strept. pyogenes</i> Dick	50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Lactobacillus casei</i>	75 ※ 50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Corynebact. diphtheriae</i>	25	50	25	75 ※ 50	>100	5	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	25 ※ 7.5	※ 2.5	>100	※ 75	100 ※ 25	※ 10	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Mycobact. sp.</i> 607	25 ※ 7.5	25	25	7.5 ※ 5	10 ※ 2.5	5 ※ 2.5	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Mycobact. avium</i>	10 ※ 7.5	25	25	25	5 ※ 2.5	5	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> F <sub>1</sub>	※ 50	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Aerobacter aerogenes</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonella typhi</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Shigella dysenteriae</i> Shiga	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsilla pneumoniae</i>	>100	※ 75	※ 100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> S 32	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i>	25	※ 75	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Torula rubra</i>	10 ※ 7.5	25 ※ 10	>100	75	10 ※ 7.5	50 ※ 25	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Aspergillus niger</i>	25 ※ 7.5	25 ※ 10	>100	75 ※ 7.5	7.5	50 ※ 25	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Penicillium glaucum</i>	25 ※ 10	75 ※ 50	>100	※ 75	50	50 ※ 25	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	25	25 ※ 10	75 ※ 25	100 ※ 75	10 ※ 7.5	25 ※ 10	※ 100	>100	>100	>100	>100

対する効果を検査し表 8 に、また BHI 培地を用い、各種細菌 24 菌株についてさらに詳しく抗菌作用を検査した結果を表 9 に、Sauton 培地を用いて行なったミコバクテリアに対する抗菌試験の結果を表 10 に示した。

## 考 察

### 1. 放線菌 KS 2-74 株の同定について

顕微鏡下の所見において明らかにしたように、本菌は気菌糸に輪生分枝を生ずる点で、Streptomyces のうち特長な菌群に属する。このような形態的特長は Baldacci & Locci<sup>15)</sup> がひとつの taxon として認め、Genus

Streptomyces から whirl forming species を分離して、Streptoverticillium として独立の genus を設けることを提唱するに至ったほどの重要な特長であり、本菌の帰属を明示するものである。

以上本菌が Genus Streptomyces の中 Section Verticillati に属することを明かにしたが、その培養性状の特長は 1957 年加藤および新井<sup>16)</sup> によって熊本の土壌より分離され、Streptomyces luteoreticuli Katoh et Arai と命名された同じく Section Verticillati に属する菌種の記載にほぼ一致する。またその糖利用能についての記載は著者が KS 2-74 株で行なった実験結果とは dextrin, inulin などにおいて異なり、その他若干の差異が認め

表 10. 合成 phenazine 類のミコバクテリアに対する抗菌作用  
(medium: Sauton, 37°C), 単位は MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ), ※は不完全阻止

化合物	被 検 菌	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
(XIII)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	2.5	5.0
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	1.0	2.5
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	5.0	5.0	5.0
	<i>Mycobact. avium</i> 830	10.0 ※5.0	10.0 ※5.0	10.0	10.0	10.0
(XIV)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	2.5	2.5
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	5.0	5.0
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	0.5	1.0 ※0.5	1.0
	<i>Mycobact. avium</i> 830	25.0 ※10.0	25.0 ※10.0	25.0	25.0	25.0
(XVII)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	1.0	1.0
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	0.5	1.0
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	<0.5	<0.5	0.5
	<i>Mycobact. avium</i> 830	2.5 ※1.0	2.5	2.5	2.5	2.5
(XIX)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	0.5	0.5
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	0.5	0.5
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	<0.5	<0.5	0.5
	<i>Mycobact. avium</i> 830	2.5 ※0.5	2.5	0.5	0.5	0.5
(XXV)	<i>Mycobact. tuberculosis</i> H 37 Rv	—	—	—	<0.5	<0.5
	<i>Mycobact. tuberculosis</i> 松戸	—	—	—	<0.5	<0.5
	<i>Mycobact. bovis</i> BCG	—	—	<0.5	1.0	1.0
	<i>Mycobact. avium</i> 830	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

られる。しかしこのような生化学的性状における微少な差異は比較的容易に生起し、同一菌種の継代中にもしばしば経験するところである。従って数種の糖の利用能における若干の差異は他の多くの性状が同一であるとすれば、同一の菌種とするのが妥当である。

*Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai と KS 2-74 株との直接の比較は、原株が事故のため失われており不可能であったが、原記載者である新井との意見の一致のもとに本菌を *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai の neotype と同定した。

2. *Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物の試験管内抗菌作用について。

表 4 にみられるように (I) (II) (III) のいずれもがミコバクテリアに対して特異的な抗菌性を示したという事実は、微量代謝産物の抗菌作用を検索することにより、新抗生物質を発見する可能性を示唆するものである。また従来より知られている微生物代謝産物のうち、*Pseudomonas iodium* より得られる iodinin<sup>17)</sup>、*Streptomyces griseoluteus* より得られている griseolutein A お

よび B<sup>18)</sup>、phenazine-1-carboxylic acid<sup>19)</sup>、また *Pseudomonas aeruginosa* より得られる aeruginosin A および B<sup>20)</sup> などの phenazine 系化合物が抗生物質として知られていることは、(I)、(II)、(III) が phenazine 系化合物であることと考え合せ、興味深いことと考えられる。

3. 代謝産物 (IV)、(V) (新抗生物質 mycomethoxin A, B) の単離、同定について

代謝産物 (I)、(II)、(III) がミコバクテリアに対し抗菌作用を示す事実から、*Streptomyces luteoreticuli* の産生する他の phenazine 系化合物の探索を志し、培養菌体のアセトン抽出液を減圧濃縮、残溜水性溶液のクロロホルム抽出、さらにその濃縮物をアルミナカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで溶出した黄橙色分画の薄層クロマトグラフィー上のスポットのうち f および g に相当するものが、紫外線照射による輝黄色蛍光を示すところから methoxylated phenazine であることを知った。そこで f および g に相当する物質の抗菌作用を明らかにする目的で、おおむね小山ら<sup>15)</sup>

の方法に従って抽出単離を試み、それぞれ標品との混触ならびに IR により同定することができた。すなわち f に相当するものは mp 187~188° の橙黄色針状晶 (IV) であり、g に相当するものは mp 150~151° の黄色針状晶 (V) である。

#### 4. phenazine 類の試験管内抗菌作用について

a. *Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物のうち (IV) および (V) の試験管内抗菌作用を検索したが、*Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv に対する抗菌作用は (IV) については充分にみられたが、(V) については試料が微量のため検査が不能であった。しかし (IV), (V) の Gladstone 培地上での *Mycobact. sp. 607* に対する抗菌作用の類似性ならびに後に述べる他の天然 phenazine 類のミコバクテリアに対する抗菌作用と関連して、(V) もミコバクテリアに対し (IV) と同様な抗菌性が期待できる。

ミコバクテリアに対し 1~5 µg/ml で発育の完全阻止を示す抗菌活性はパラアミノサリチル酸 (PAS) の 1 µg/ml と比べて遜色のないものであり、さらに *Mycobact. tuberculosis* の SM 耐性菌に対し低濃度で抗菌活性を示したことは極めて興味ある事実であり、今後さらに化学療法剤としての評価を明かにしてゆく上で重要な知見を提供したものと云えよう。

これらの結果から (IV), (V) は抗酸性菌に対し特異的な生物活性を示す抗生物質であることが判明し、著者はその抗菌活性に因んで (IV) を mycomethoxin A, (V) を mycomethoxin B と命名した。なおそれらの化学構造については小山<sup>21)</sup>により図 7 に示すように決定された。

b. 上述のように mycomethoxin A が Gladstone 培地上 *Mycobact. sp. 607* に対し、比較的高濃度で発育阻止作用を示すにすぎなかったにもかかわらず、*Mycobact. tuberculosis* をはじめとする病原性ミコバクテリアに対しては、比較的低濃度で抗菌性を示すことが明らかとなったが、*Streptomyces luteoreticuli* の産生する他の phenazine 系化合物 (I), (II), (III) が、*Mycobact. sp. 607* および *B. subtilis* に対して不完全発育阻止作用を示すところから、(I), (II), (III) にも同様のことがあるものと考え、Sauton 液体培地上ミコバクテリア

に対する抗菌作用を検査した。結果は表 7 に示すようにこれらにも抗菌作用があり予想を裏付ける事ができた。

c. このように、*Streptomyces luteoreticuli* の産生する phenazine 系化合物 (I)~(V) のいずれもが、ミコバクテリアに対し抗菌作用を示す事実から、入手可能な各種の合成 phenazine 系化合物について、抗菌作用を検索した。

表 8~10 に明らかなように、合成 phenazine 類においても mycomethoxin A および B, ならびに 1-methoxy phenazine, 1, 6-dimethoxyphenazine, methyl phenazine-1-carboxylate と同様、*Mycobact. sp. 607* に対して発育阻止作用を示すとともに、*B. subtilis* に対しても一定の阻止作用を示すことは、この種の phenazine 系化合物の抗菌性の特長であろうと考えられる。もちろんパシラスとミコバクテリアの間には、分類学的近縁性はないのであるが、興味ある事実と思う。

またさきに述べたように *Mycobact. sp. 607* および *B. subtilis* に対する抗菌性が、*Mycobact. tuberculosis* H 37 Rv に対する抗菌性となんらかの相関があるとすれば、*Mycobact. sp. 607* および *B. subtilis* に対し抗菌性が極めて低いとしても、病原性ミコバクテリアに対する抗菌試験を行なうことは意義があると考え、図 2 の化合物の中から *Mycobact. sp. 607* および *B. subtilis* に対し抗菌性を示す化合物を選んで行なった病原性ミコバクテリアに対する抗菌試験の結果が表 10 である。ここにおいても mycomethoxin A, 1-methoxyphenazine, methyl phenazine-1-carboxylate の場合と同様な結果を得ることができた。いずれの化合物においても 0.5~10 µg/ml という比較的低濃度で抗菌性を示している事実は、この種 phenazine 化合物の今後の化学療法剤としての開発の可能性を示したと云えよう。

また 1, 2-dimethoxyphenazine, 2-methoxyphenazine, 1-methoxy-6-methyl phenazine, 1, 8-dimethoxyphenazine, 1-methyl phenazine-5-oxide など *Candida albicans*, *Torula rubra*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Trichophyton mentagrophytes* などの真菌類に対し抗菌作用を示す点は、真菌の深部感染症に対する化学療法剤の開発が強く望まれている現在、興味ある知見である。

終りに終始懇切なご指導を賜わり、かつご校閲を頂いた恩師新井 正教授に心からの謝意を表します。本研究の、特に化学的な面について、本学薬学部小山泰正助教授のご指導とご協力を深謝します。また実験に際して特に援助を頂いた加治技官および三上教務員に感謝します。

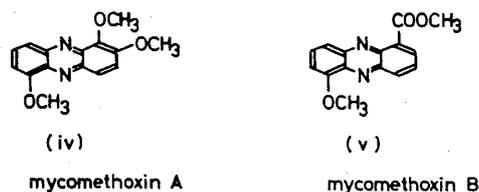


図 7. mycomethoxin A, B の構造

## SUMMARY

Taxonomical studies were carried out on *Streptomyces* strain No. KS 2-74 which was isolated by Arai from soil sample collected in Beppu, Kyushyu, Japan.

The organism formed yellowish white aerial mycelium on oat meal agar. The mature sporophores produced primary and secondary whirls. From the results of detailed morphological and physiological investigations, the streptomycetes was identified as *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai described in 1957.

Phenazine compounds, 1-methoxyphenazine, 1, 6-dimethoxyphenazine and methyl phenazine-1-carboxylate, obtained as the secondary metabolites of *S. luteoreticuli* exhibited antibacterial activity on *Mycobacterium* sp. 607.

On the basis of these observations, other minor phenazine compounds in the culture of *S. luteoreticuli* were further investigated and two new antibiotics, mycomethoxin A (1, 2, 6-trimethoxyphenazine) and B (methyl 6-methoxyphenazine-1-carboxylate) were isolated and identified. Mycomethoxin A was obtained as orange needles melting at 187 to 188 C and B as yellow needles melting at 150 to 151 C. These two antibiotics were found to be especially active on human phogenic mycobacteria including streptomycin and INAH resistant strains.

As the results of *in vitro* antimicrobial activity of several synthetic phenazine compounds, it was also revealed that some of methoxylated phenazines are active on mycobacteria.

The detection and subsequent forced production of bioactive minor metabolites of streptomycetes seem to be one of the promising approach to develop new antibiotics and antibiotic derivatives effective on drug resistant microorganisms.

## 文 献

- 1) Tyndall, J.: The optical department of the atmosphere in relation to the phenomena of putrefaction and infection., philosoph. Transact. Royal Soc. Lond. 166, 27-74, 1876.
- 2) Pasteur, L. et Joubert, J. F.: Charbon et Sépticémie., Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, 85 101-115, 1877.
- 3) Gosio, B.: Ricerche bacteriologica e chimica sulle alterazioni del mais; contributo all'etiologia della pellagra., Riv. d'ig. e san. pubbl., Roma, 7, 825, 869.
- 4) Alsberg, C. L. and Black, O. F.: Maize Deterioration, Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry. Bull., 270, 7-48, 1913.
- 5) Fleming, A.: On antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in isolation of B. influenza., Brit. J. Exper. Path., 10, 226-236, 1929.
- 6) Dubos, R. J.: Studies on bactericidal agent extracted from soil bacillus., J. Exp. Med., 70, 1-10, 1939.
- 7) a) Abraham, E. P.: Further observations on penicillin, Lancet, 2, 177-188, 1941. b) Florey, H. W.: current therapeutics., antibiotics Practitioner, 162, 67-75, 1949.
- 8) 長岐佐武郎, 齋藤 誠: 抗生物質耐性赤痢, 日医会誌, 39, 581-585, 1958.
- 9) a) 小張一峯: 赤痢・疫痢の臨床, 最新医学, 12, 133-138, 1957. b) Marberg, K., Altman, G. and Eshkol, B. A.: Observations on resistance to sulfadiazin and antibiotics in shigellosis., Am. J. Trop. Med. Hyg., 7, 51-57, 1958.
- 10) a) 落合国太郎, 山中敏樹, 木村勝直, 沢田 収: 赤痢菌相互間およびこれと大腸菌との間における薬剤耐性の遺伝に関する研究, 日医事報, 1861, 34-46, 1959. b) 秋葉朝一郎, 木村貞夫: 多剤耐性赤痢菌の発生機序に関する研究, 日医事報, 1866, 46-50, 1960. c) 渡辺 力: 耐性の発現の機作 1. 突然変異と選択による薬剤耐性の出現, 医学のあゆみ, 56, 350-355, 1957. d) 橋本 一: 耐性の発現の機作 2. 薬剤耐性の導入による伝達, 同誌, 56, 356-362, 1957. e) 中谷林太郎, 中村明子, 山田千昌: 耐性の発現の機作 3. 接合による R 因子の伝達, 同誌, 56, 363-373, 1957.
- 11) 小川辰次: 抗生物質感受性の年次的変動 3. 結核菌, 同誌, 56, 347-349, 1966.

1) Tyndall, J.: The optical department of the atmosphere in relation to the phenomena of

- 12) Shirling, E. B. and Gottlieb, D.: Methods for characterization of streptomyces species., Internat. J. System. Bact., 16, 313-340, 1966.
- 13) 山岸三郎, 小山泰正, 深草佑一, 興村伸夫, 大石洵一, 浜道則光, 新井 正: *Streptomyces luteoreticuli* Katoh et Arai の代謝産物について (第1報). 代謝産物の単離, 薬誌, 91, 351-357, 1971.
- 14) a) Celmer, W. D., Tanner Jr, F. W., Harfenist, M., Lees, T. M. and Solomons, I. A.: Characterization of the antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin., J. Am. Chem. Soc., 74, 6304-6305, 1952. b) Celmer, W. D. and Solomons, I. A.: Studies on a common hydrolysis product of thiolutin and aureothricin., Antibiotics Ann., 1953-1954, 622-625, 1954.
- 15) Locci, R., Baldacci, E. and Baldan, B. P.: The Genus *Streptoverticillium*. A taxonomic study., *Giornale di Microbiologia*, 17, 1-60, 1969.
- 16) 加藤 博, 新井 正: *Streptomyces luteoreticuli* とその産生する抗生物質について, 腐研報, 10, 52-57, 1957.
- 17) Clemo, G. R. and McIlwain, H.: The phenazine series. Part VII. The pigment of chromobacterium iodinum; The phenazine di-N-oxides., J. Chem. Soc., 1938, 479-483, 1938.
- 18) a) 梅沢浜夫, 早野正己, 緒方保夫, 前田謙二, 岡見吉郎: 新種 *Streptomyces griseoluteus* によつ生産される新抗生物質 Griseolutein について., J. Antibiotics, 4, 34-40, 1951. b) Nakamura, S., Wang, E.L., Murase, M., Maeda, K. and Umezawa, H.: Structure of griseolutein A., J. Antibiotics, 12 A, 55-58, 1959.
- 19) a) Kluyver, A. J.: *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigments., J. Bacteriol., 72, 406-411, 1956. b) Haynes, W. C., Stodola, F. H., Locke, J. M., Pridham, T.G., Conway, H. F., Sohns, V. E., and Jackson, R. W.: *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and phenazine- $\alpha$ -carboxylic acid, its characteristic pigment., J. Bacteriol., 72, 412-417, 1956.
- 20) Herbert, R. B. and Holliman, F. G.: Aeruginosin B-A naturally occurring phenazinesulphonic acid., Proc. Chem. Soc., 1964, 19, 1964.
- 21) Koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Yamagishi, S. and Arai, T.: The structure of luteoreticulin, a nitro-containing metabolite of *Streptomyces luteoreticuli*., Tetrahedron Lett., 1969, 355-358, 1969.