

# 新抗生物質 Tuberactin の生物学のおよび 薬理学的性状について

永田明穂・早野和夫・星野保夫

東洋醸造株式会社研究部 (部長 阿部仁之助)

受付 昭和 43 年 5 月 16 日

## BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDIES ON TUBERACTIN, A NEW ANTIBIOTIC\*

Akio NAGATA, Kazuo HAYANO and Yasuo HOSHINO

(Received for publication May 16, 1968)

A new antibiotic, Tuberactin (TU), has been isolated from fermentation broths of a new strain of streptomycetes named *St. griseoverticillatus* var. *tuberacticus*. This antibiotic is water soluble basic peptide, and is effective against tubercle bacilli as well as some of gram-negative and gram-positive bacteria. It relates viomycin (VM) in some physico-chemical properties, however, TU differs clearly from VM in its chromatographic behavior and amino acids composition. Some preliminary data of biological and pharmacological studies on the antibiotic is reported in this paper.

### (I) Biological studies

#### 1) Antimicrobial spectrum

The minimal inhibitory concentration of tuberactin against a variety of microorganisms was determined by the serial agar streak dilution method. It inhibits the growth of mycobacteria, some of gram-negative and gram-positive bacteria.

#### 2) Microbiological assay

Standard curves in cup plate or disc plate method were determined for *Bacillus subtilis* PCI 219 and *Mycobacterium avium* F as test organism, and the effects of media compositions and pH were checked.

#### 3) Stability

Stability in aqueous solution was observed at 100°C in various pH. TU is markedly stable in acid and neutral solution. The effect of blood components on the biological activity was also examined.

### (II) Pharmacological studies

#### 1) Absorption and excretion

The absorption of TU was studied in mice and rats by i. m. injection or oral administration of 100 mg/kg single dose. The antibiotic concentration in the blood and urine and distribution in various organs of rats were determined by use of microbiological assay.

#### 2) Toxicology

The acute toxicity was determined in mice and rats. No death of mice was observed by both i. m. injection and oral administration of 1,600 mg/kg and 3,200 mg/kg, respectively.

The subacute toxicity was examined in rats by i. m. injection of 50, 100, 200 and 400

\* From Research Laboratories, Toyo Jozo Co. Ltd. Ohito-cho, Shizuoka-ken, Japan.

mg/kg as daily dose for 30 days. The growth curves were compared with saline or VM treated groups. No significant adversary effects were observed in preliminary clinical laboratory tests, hematological and histological examinations of the animal treated with 200 mg/kg or less doses of TU.

Biological and pharmacological data suggests the close relationship between TU and VM, but TU shows rather higher blood level and organ distribution than VM and seems to be less toxic in subacute toxicological study.

Further investigations including the effects on renal and auditory function are necessary to estimate the therapeutic usefulness of this antibiotic.

## 緒 言

Tuberactin (TU) は永田ら<sup>1)</sup>が静岡県大仁町の土壌より分離同定した放線菌, *Streptomyces griseovorticillatus* var. *tuberacticus* の培養液から単離した水溶性塩基性ペプチド新抗生物質で, 人型結核菌に試験管内で抗菌作用を示し, 動物の実験的結核症の治療に有効であることが, 豊原<sup>2)</sup> および小関ら<sup>3)</sup> により報告されている。本物質の化学構造は未定であるが, 塩析クロマトグラフィーの Rf 値, 構成アミノ酸等の点で, 既知の水溶性塩基性ペプチド抗生物質, Viomycin (VM) や Capreomycin (CPM) 等と異なる新物質である。本報告は主として TU の生物学的, および薬理的性状について予備的検討を行なった成績を述べる。

## 実験方法

### I. Tuberactin の調製

実験に用いた TU は, 前記生産菌の培養液より弱酸性陽イオン交換樹脂に吸着分離し, 活性炭処理およびメタノール沈殿を繰返して精製した塩酸塩, および硫酸塩であり, 用量はすべてこれらの塩の重量で表示した。

### II. 生物学的性状の試験

#### 1) 抗菌スペクトル

常法により寒天平板希釈法を用い, 最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。試験菌には 23 種の細菌ならびに 19 種の糸状菌, 酵母を用い, 細菌は 37°C, 24 時間 (*Mycobacteria* のみ 48 時間), その他は 30°C, 48 時間の培養で結果の判定をした。TU 濃度は最高 200 mg/ml より 2 倍希釈系列とし, 培地はすべて日本栄養化学製品を使用した。

#### 2) 生物検定条件の検討

MIC 測定結果により, TU 感受性菌 8 株を選び, カップ平板法による標準曲線の比較を行なうとともに, 培地の種類, pH 等の要因による抗菌力の変動を検討した。なお標準試料には再結晶を繰返し精製した TU 塩酸塩最純標品を用いた。

#### 3) 安定性試験

TU 水溶液の安定性を調べるため, 種々の pH 条件下で 100°C に加熱し, 抗菌力の経時変化を測定した。また血液成分の抗菌力に対する影響をみるため, 馬血清, 全血, 75% 赤血球懸濁液に TU を溶解して 37°C に保存し, 抗菌力の変化を測定した。

### III. 薬理的性状の試験

#### 1) 吸収排泄実験

ラットおよびマウスを用い, 筋肉内注射ならびに経口投与による血中濃度, 臓器分布の測定を行なった。

使用動物: Wistar-Imamichi 系ラット ♂ (体重 100~120 g) および ddY 系マウス ♂ (体重 15~20 g) を各群 5 匹ずつ用いた。

薬剤投与: TU 硫酸塩を滅菌蒸留水に溶解し, *musculus gluteus* への筋肉内注射, または胃カテーテルによる経口投与を行なった。対照薬剤として VM を用い, 両者とも 100 mg/kg 1 回投与による試験をした。

血中濃度測定: ラットは経時的に尾静脈より採血, マウスは頸静脈より採血し, 生物検定により TU または VM 濃度を測定した。

臓器内分布測定: ラットを用い, 注射または投薬後 90 分および 360 分後に主要臓器を摘出し, 同重量の生理食塩水でホモジナイズした試料を用いて生物検定を行なった。

尿中排泄: 採尿ケージを使用してラットより採尿し, 生物検定で測定した。

#### 2) 急性毒性

各群 10 匹の前記動物を用い, 尾静脈よりの静脈注射, 筋肉内注射および経口投与を行なつて 72 時間観察し, 50% 致死濃度 (LD<sub>50</sub>) を算出した。

#### 3) 亜急性毒性

各群 10 匹のラットを用い, 50, 100, 200 および 400 mg/kg の TU 塩酸塩を毎日 1 回, 30 日間の筋肉内注射を行ない, 体重を測定して成育曲線を作成比較した。対照として VM の同量注射群, ならびに生理食塩水注射群を行なった。注射終了後, さらに常法による主要臓器

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of Tuberactin

Test organisms (mcg/ml)		Test organisms (mcg/ml)	
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 12.5	14	<i>Micrococcus flavus</i> 25
2	<i>Escherichia coli</i> NIHJ 25	15	<i>Sarcina lutea</i> >100
3	<i>Escherichia coli</i> B 100	16	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 1001 100
4	<i>Salmonella Paratyphi</i> A 25	17	<i>Vibrio comma</i> A >100
5	<i>Salmonella Paratyphi</i> B 100	18	<i>Vibrio comma</i> B >100
6	<i>Salmonella enteritidis</i> 100	19	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219 12.5
7	<i>Shigella dysenteriae</i> 100	20	<i>Nocardia asteroides</i> 3.2
8	<i>Shigella flexneri</i> 12.5	21	<i>Mycobacterium</i> ATCC 607 12.5
9	<i>Shigella sonne</i> 100	22	<i>Mycobacterium phlei</i> 3.2
10	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 p 50	23	<i>Mycobacterium avium</i> F 6.3
11	<i>Staphylococcus albus</i> 100	24	<i>Asperigillus fumigatus</i> 200
12	<i>Staphylococcus citreus</i> 50	25	<i>Trichophyton rubrum</i> 100
13	<i>Staphylococcus aureus</i> Yoshioka 100	26	<i>Candida albicans</i> 200

Media: 1~20, Nutrient agar, pH7.0

21~23, Nutrient agar with 1% glycerin, pH8.0

24~25, Potato dextrose agar, pH7.0

Table 2. Stability of Tuberactin &amp; Viomycin

	pH	0 min	15 min	30 min	60 min
Tuberactin	2	100%	100	100	100
	4	100	100	100	80
	7	100	100	70	20
	9.5	100	10	6.2	4.6
Viomycin	2	100%	100	100	100
	4	100	100	100	92
	7	100	46	20	9.0
	9.5	100	6.4	6.0	6.0

100 mcg/ml solution, at 100°C

機能, 血液像, および病理組織学的検査を実施した。

Table 3. Effect of Blood Components on Biological Activity

Medium	Incubation time (min)				
	0	30	60	180	360
Saline	95	72	105	92	93
Horse serum	91	82	98	94	100
Horse blood	91	98	95	98	86
75% horse red cells	95	92	94	97	93

TU in mcg/ml

## 実験成績

## I. Tuberactin の物理化学的性状

すでに永田ら<sup>1)</sup>により報告されており, ここでは要約記載する。

外観: 白色結晶状粉末

Table 4. Distribution of Tuberactin and Viomycin in Various Organs of Rat

Route	Tuberactin				Viomycin			
	PO		IM		PO		IM	
	90'	360'	90'	360'	90'	360'	90'	360'
Heart	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung	56.0	66.0	60.5	41.0	21.0	24.0	49.5	48.0
Liver	29.0	36.5	28.0	23.2	18.4	16.0	16.6	18.0
Spleen	42.0	55.0	41.3	40.0	12.2	11.4	21.0	29.0
Kidney	35.0	69.5	218.0	200.0	18.7	19.6	1260.0	860.0
Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0
Small intestine	37.2	37.3	31.0	25.0	12.0	16.5	23.0	21.2
Large intestine	39.0	39.0	45.0	40.5	16.0	166.0	33.0	20.0
Blood	17.5	18.0	50.3	12.5	11.8	0	98.5	10.0
Urine	14.5	130.0	270.0	290.0	30.0	—	—	1210.0
Stomach content	101.0	129.0	0	0	198.0	111.5	0	18.4
Large intestine content	—	—	18.6	0	0	—	14.4	14.0

Dose: 100 mg/kg Conc.: mcg/ml in blood or urine, mcg/g in other materials

融点：222~225°C，分解（塩酸塩）

元素分析値（塩酸塩）

C 35.16, H 6.06, N 20.91, Cl 12.29

分子量：514（質量分析）

推定分子式：C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>·2HCl

紫外吸収スペクトル

268 mμ (H<sub>2</sub>O), 268.5 mμ (0.1 N HCl), 285.5 mμ (0.1 N NaOH) に最大吸収

溶解性：水に易溶，有機溶媒に難溶

呈色反応：ニンヒドリン，ビュレット，坂口反応陽性

II. Tuberactin の生物学的性状

### 1) 抗菌スペクトル

各種細菌等に対する最小発育阻止濃度を表1に示す。TU はある種のグラム陰性，陽性細菌，とくに Mycobacteria に抗菌力を有するが，糸状菌，酵母にはほとんど無効である。

### 2) 生物検定条件

カップ法による標準曲線を作成した8種のTU感受性菌のうち，Mycobacterium avium F, Bacillus subtilis PCI 219 の2株が感度，直線性の点で最もすぐれ，培地の種類および pH 等の影響を調べた結果，M. avium F では1% グリセリン加普通寒天培地 pH 8.0 を用い，37°C 40 時間培養，また B. sub. では普通寒天培地，

Table 5. Acute Toxicity of Tuberactin

Animal	Route	LD <sub>50</sub>
Mice	i. v.	200 mg/kg
	i. m.	>1,600
	p. o.	>3,200
Rats	i. m.	> 800
	p. o.	>1,600

Mice: ddY Rats: Wistar-Imamichi

Table 6. Results of Clinical Laboratory Tests

Sample	Daily dose (mg/kg)	Tuberactin		Viomycin		Saline
		400	200	400	200	
RB	(×10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	557.6	612.0	544	550	461.0
WB	/mm <sup>3</sup>	10,000	7,200	12,270	14,700	7,100
HB	(g/dl)	14.2	12.7	10.3	12.0	14.1
Ht	(%)	43.3	34.4	32.3	42.4	49.4
Total blood sugar	(mg/dl)	130	103	157	173	137
Total protein	(g/dl)	7.37	7.82	10.75	11.70	9.34
Total cholesterol	(mg/dl)	86.0	90.7	93.0	78.0	79.0
GOT	(u)	69.7	54.7	45.7	37.0	43.0
GPT	(u)	15.7	10.3	7.7	8.03	8.5
BSP	(%)	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2
PSP	(%)	61.1	57.4	55.8	54.3	52.5

Rats treated for 30 days (I.M. injection)

RB: Red blood cells WB: White blood cells HB: Hemoglobin Ht: Haematokrit value (Sahli)

pH 8.0, 37°C 20 時間培養の条件で，再現性も良好であり，TU 濃度 3 mcg/ml までの測定が可能であった。

### 3) 安定性

TU 水溶液の種々の pH 条件下における安定性を表2に示す。TU は pH 7 以下の中性または酸性条件下ではきわめて安定であり，100°C 15 分の加熱で抗菌力の低下を認めないが，VM は pH 7 でやや不安定のような。またアルカリ側では TU, VM とも不安定である。次に血清等，血液成分との共存による抗菌力の変化も表3にみられるごとくほとんど認められなかった。

### III. Tuberactin の薬理的性状

#### 1) 吸収および排泄

ラットにおける血中濃度，臓器内分布の試験成績を表4に総括表示した。TU は筋肉内注射，経口投与いずれの場合も速やかに吸収され，血液および肺，脾，腎臓等の臓器に高い濃度分布を示し，とくに経口投与での臓器分布の値が高いことが注目される。血中濃度の経時的測定においても経口投与2時間後に 50 mcg/ml 以上のピークを認めた。

次に尿中排泄も良好で，筋肉内注射 30 分後の尿中濃度 250 mcg/ml 以上の値を示した。

マウスの血中濃度測定結果においても，筋肉内注射，経口投与とも 50 mcg/ml 以上のピーク値ならびに，7 時間以上の血中での存在を認めた。

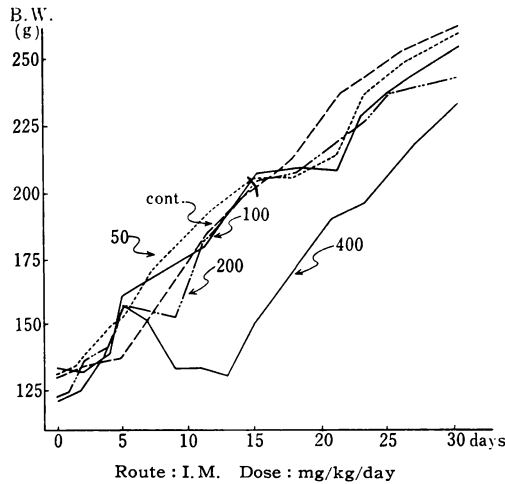
#### 2) 急性毒性

マウスおよびラットにおける LD<sub>50</sub> 値を表5に示す。

#### 3) 亜急性毒性

ラットにおける 30 日間連日筋肉内注射の体重曲線を図1に示す。400 mg/kg では6日目より体重の顕著な減少を認めたが，200 mg/kg 以下では対照群と大差ない。一方 VM 注射群は図2に示すごとく，100 mg/kg でも対照群とかなり差があり，400 mg/kg の場合，死亡例

Fig. 1. Growth Curves of Rats Treated with Tuberactin



(10匹中4匹)を生じた。

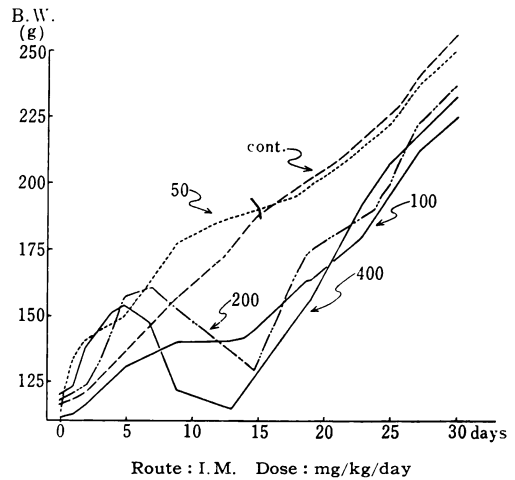
次に30日間の注射終了後、主要臓器機能検査を行なった成績を表6に示すが、TU 200 mg/kg注射群は対照と大差なく、同時に行なった血液像検査および病理組織学的検査成績での異常は認めなかつた。

考 察

以上の実験成績を総括すると Tuberactin はある種のグラム陰性および陽性細菌、とくに Mycobacteria に抗菌力を有する抗生物質であり、安定性も良好で、ラットおよびマウスにおける筋肉内注射、または経口投与で、安定した高い血中濃度と臓器内分布を示し、毒性も低い。これらの成績は人型結核菌に対する効果とあわせ、本物質の抗結核薬としての臨床的応用の可能性を示唆するものであり、引続き副作用の研究に重点をおき詳細な検討を実施中である。

次に、その物理化学的性状において類似する VM との比較であるが、本実験における生物学的諸性質についても、かなりの近似点があり、両者の近縁関係を暗示す

Fig. 2. Growth Curves of Rats Treated with Viomycin



る。一方薬理的試験成績のうち、亜急性毒性の点では TU のほうが低く、経口投与時の体内分布においても若干の差異がみられる。従来、抗結核抗生物質の副作用としては、腎機能障害、難聴などが最も問題とされており、TU についても現在これらの点での VM, CPM, KM 等との比較検討を進めている。

結 び

放線菌より新たに分離した塩基性ペプチド新抗生物質 Tuberactin に関し、生物学的ならびに薬理的性状の検討を行ない、抗菌スペクトル、安定性、吸収・排泄、および毒性についての基礎的知見を得た。

文 献

- 1) 永田明穂 他：日本抗生物質学協，第160回研究会講演，昭43.3，於東京。
- 2) 豊原希一：結核，投稿中。
- 3) 小関勇一・岡本茂広・金井興美・室橋豊穂：結核，43：55，昭43。