

〔特別掲載〕

(東女医大誌第30巻第8号)
頁1411—1422昭和35年8月抗生物質探索のための放線菌の
鑑別法に関する研究

国立予防衛生研究所抗生物質部 (指導部長 梅沢浜夫博士)

鈴 木 本 子
スズキ キモ

(受付 昭和 35 年 6 月 13 日)

目 次

緒 言

A 既知抗生物質に対する感受性による鑑別法

- 1 概要
- 2 実験方法
- 3 結果および考察

B 血清学的鑑別法

- 1 概要
- 2 実験方法
- 3 結果および考察

C 土壌より新たに分離した放線菌の鑑別

- 1 概要
- 2 実験方法
- 3 結果および考察

総括および結語

緒 言

放線菌類は近來抗生物質その他有用物質生産菌としてますます重要度を加えている。現在 300 有余の抗生物質のうち 260 余りが放線菌の生産するところであり生産菌種は 100 以上にわたっている。新抗生物質の探索にあたっては既知抗生物質を生産する既知菌種を鑑別し、これを探索系外に取り除くことが最初の過程であり重要な手段である。従来放線菌種の分類鑑別にあたっては放線菌の形態的、生理的性状、すなわち基中菌糸の形状、色、気菌糸の形、分枝法、色、胞子の形状、溶解性色素の産出、蛋白分解能力、糖消化性などを各種の合成培地、およびゼラチン、牛乳、ペプトンなどの有機培地で調査し、その総合判定によつてその種が鑑別されているが、鑑別過程は複雑であり、新抗生物質探索のための菌種鑑別法としては簡明適切ではない。ここに著者は既知菌種

の既知抗生物質に対する放線菌の感受性スペクトラムと、既知菌種の血清反応を検討し、抗生物質生産菌種ひいてはその生産する抗生物質の鑑別に適応した新鑑別法を確立したので報告する。

A 既知抗生物質に対する感受性による鑑別法

1. 概要

放線菌は形態的分化度においてかび類に近似し菌糸を形成し、なかんづくストレプトミセス (*Streptomyces*) は気菌糸を形成して青かび、こうじかびなどの不完全菌に酷似するが、いつぼうその大きさは細菌類に類似し、1827年 Meyen のこの菌類発見以来分類学者により、あるときはかび類としあるときは細菌類として取り扱われてきた。近年 Romano¹⁾、Cummins²⁾ による放線菌の細胞壁の研究により、放線菌はかび類よりもむしろ細菌類に属する細胞壁構造を有するという、分類学上の放線菌の本質的な位置づけの研究があり、また放線菌は細菌と同じく抗細菌性抗生物質に阻害され、抗かび性抗生物質に阻害され難いという事実から放線菌は本質的には細菌に酷似するものであることが認められてきている。Waksman³⁾ は、イソニコチン酸ヒドロラジドに対する結核菌、放線菌、かび類の感受性を調査し、放線菌はかび類と異なり結核菌などと同じ態度を示すことを述べているが、各種抗生物質に対する放線菌の感受性に関する系統的研究はない。ここに著者は放線菌、およびその類縁菌の各種抗生物質に対する感受性を系統的に調査した。いつぼう抗生物質生産菌は互に近似の菌種であれば互に交差発育せしめるとき拮抗現象を示し難く、異種であれば互に阻害現象を示すことを利用した抗生物質生産菌の鑑別法があるが⁴⁾ この拮抗現象の原理は主として、抗生物質生産菌はそれ自身が生産する抗生物質には

Motoko SUZUKI (Department of Antibiotics, National Institute of Health, Tokyo) : Studies on the identification of antibiotic-producing-streptomyces for antibiotic screening.

表1 放線菌及びその類縁菌の

- * Group A : 抗細菌性抗生物質
 B : 抗細菌性・抗カビ性抗生物質
 C : 抗カビ性抗生物質

属	種	株	生産物質	Actithiazic acid
Streptomyces	abikoensis	Z-1-6	Abikoviromycin	-
"	aureofaciens	NRRL 2209	Chlortetracycline	-
"	eurocidicus	549-A1	Eurocidin	-
"	flavus	134	Actinomycin	-
"	fradiae	117	Neomycin	-
"	griseoluteus	P-37	Griseolutein	-
"	griseus	S-1	Streptomycin	-
"	kanamyceticus	K-2 J	Kanamycin	-
"	lavendulae	E-2	Streptothricin	-
"	mediocidicus	535-A1	Mediocidin	-
"	netropsis	NRRL 2268	Netropsin	-
"	nitrosporeus	O-20	Nitrosporin	-
"	pyridomyceticus	451-A8	Pyridomycin	-
"	rimosus	NRRL 2234	Oxytetracycline	-
"	roseochromogenes	B-2	Streptothricin	-
"	rubescens	Z-5-2	Abikoviromycin	-
"	tanashiensis	144	Luteomycin	-
"	thioluteus	280-3	Aureothricin	-
"	venezuelae	O-163	Chloramphenicol	-
"	sp.	NRRL B1368	Xanthomycin	-
Nocardia	asteroides	244		(-)
"	gardneri			-
"	mexicanus			(-)
Mycobacterium	sp.	215		S
"	"	217		S
"	"	219		V S
"	"	258		S
"	"	260		S
Saccharomyces	cerevisiae			-
Candida	albicans	3147		-
Aspergillus	niger			-

各種抗生物質に対する感受性

抗 生 物 質 100γ/cc

Group A														B		C					
Amphotycin	Bacitracin	Chloramphenicol	Erythromycin	Etamycin	Griseofulvin	Isonicotinic acid hydrazide	Kanamycin	Luteomycin	Neomycin	Oxamycin	Puromycin	Pyridomycin	Streptomycin	Tetracycline	Viomycin	Actinomycin	Aureothricin	Anisomycin	Cycloheximide	Nystatin	Oligomycin
S	(S)	(-)	S	(S)	-	-	VS	-	S	(-)	S	VS	(-)	S	(-)	VS	VS	-	-	-	-
VS	(-)	VS	VS	VS	(-)	-	S	-	(-)	(S)	(S)	(S)	VS	-	S	VS	S	-	-	-	-
VS	(-)	S	VS	VS	(S)	-	S	-	(-)	S	S	S	VS	VS	(-)	VS	VS	-	-	(-)	-
S	(-)	VS	VS	VS	(-)	-	S	-	S	S	(-)	VS	VS	S	VS	-	(S)	-	-	-	-
VS	S	VS	VS	VS	VS	-	(S)	S	-	VS	S	VS	VS	S	(-)	VS	VS	-	-	(S)	-
VS	S	S	VS	VS	-	-	VS	(S)	S	S	VS	VS	VS	S	S	VS	S	-	-	-	-
S	VS	S	S	(S)	(S)	-	VS	(S)	S	S	VS	VS	-	VS	-	VS	VS	-	-	-	-
(S)	-	S	S	(S)	-	-	-	-	-	-	(S)	VS	-	S	-	(S)	(S)	-	-	-	-
VS	-	S	(-)	S	-	-	S	(-)	(S)	(S)	VS	VS	(-)	(-)	S	VS	VS	-	-	S	-
VS	(-)	S	VS	VS	-	-	VS	S	(-)	VS	VS	VS	(-)	S	(S)	VS	VS	-	-	VS	-
(-)	(-)	(S)	S	(S)	(S)	-	VS	(S)	(S)	(-)	S	S	VS	S	S	S	VS	-	-	-	-
VS	VS	VS	VS	VS	(S)	-	S	S	S	S	VS	VS	S	S	S	VS	VS	-	-	-	(-)
VS	-	VS	VS	VS	-	-	-	-	(-)	S	-	-	S	(S)	S	VS	VS	-	-	-	-
VS	(S)	S	VS	S	-	-	-	-	-	S	VS	S	-	-	-	S	(S)	-	-	-	-
S	S	VS	VS	VS	(-)	-	VS	S	(-)	(S)	S	S	S	S	(S)	S	S	-	-	(-)	-
(S)	-	(-)	VS	S	-	-	(-)	-	(-)	(-)	(S)	(S)	-	(S)	-	S	(S)	-	-	-	-
VS	-	VS	VS	VS	VS	-	VS	(S)	(S)	S	(S)	S	S	S	S	VS	VS	-	-	-	-
VS	VS	S	S	S	-	-	S	(-)	(-)	-	S	(-)	(S)	(S)	(S)	VS	-	-	-	-	-
S	(-)	-	S	S	-	-	VS	-	S	S	S	S	(S)	(S)	(S)	(S)	-	-	-	-	-
(S)	S	S	S	VS	S	-	VS	(S)	S	VS	S	S	S	S	(S)	(S)	S	-	-	(S)	-
VS	(-)	(S)	S	S	-	-	(-)	(S)	-	(S)	VS	-	S	(S)	(S)	S	S	-	-	-	-
VS	-	(-)	VS	VS	(-)	-	-	(S)	(S)	-	(-)	VS	-	VS	VS	S	S	-	-	(-)	-
VS	(-)	(-)	S	S	-	-	-	-	-	-	(S)	VS	(-)	S	-	(-)	VS	-	-	-	-
-	-	(S)	VS	-	-	(S)	VS	(-)	VS	-	(-)	VS	(-)	S	-	(S)	(S)	-	-	-	-
-	-	-	VS	-	-	(S)	S	(-)	S	-	VS	VS	(-)	S	(-)	S	(S)	-	-	-	-
-	-	(-)	VS	-	-	-	VS	(-)	S	-	(-)	VS	(-)	S	-	S	(-)	-	-	-	-
-	-	(S)	(S)	(S)	-	-	S	(-)	S	-	S	VS	S	S	-	-	-	-	-	-	-
(S)	-	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	S	(-)	S	-	VS	VS	S	S	(S)	S	(S)	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	VS	VS	VS	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-	VS	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	(S)	S	VS	VS

表2 S. griseus 中の各種菌株の感受性スペクトラム

S. griseus 株番号	抗 生 物 質																	100γ/cc						
	Actithiazic acid	Amphotycin	Bacitracin	Chloramphenicol	Erythromycin	Etamycin	Griseolutedin	Isonicotinic acid hydrazide	Kanamycin	Luteomycin	Neomycin	Oxamycin	Purromycin	Pyridomycin	Streptomycin	Tetracycline	Viomycin	Actinomycin	Aureothricin	Anisomycin	Cycloheximide	Nystatin	Oligomycin	
S-1	-	S	V	S	S	(S)	(S)	-	V	S	(S)	S	S	V	S	V	S	-	V	S	V	S	-	-
S-2	-	(S)	V	S	S	(S)	(S)	-	V	S	(S)	(S)	S	S	V	S	V	S	-	V	S	V	S	-
S-3	-	(S)	V	S	(S)	(S)	(S)	-	V	S	(S)	S	-	S	V	S	-	S	-	S	S	-	-	-
H-12	-	(S)	S	S	(S)	(S)	(-)	-	V	S	(-)	S	-	S	V	S	-	(S)	-	S	(S)	-	-	-
O-60	-	S	S	S	S	(S)	(S)	-	V	S	(S)	S	S	V	S	V	S	-	S	(-)	S	S	-	-
SM-1	-	V	S	V	S	V	S	(S)	-	S	S	S	S	S	V	S	V	S	-	S	S	V	S	(-)

阻害され難く、他の菌種の生産する抗生物質には阻害されやすいことにあると推定されるので、各種の精製抗生物質に対する放線菌の感受性は菌種の鑑別に利用しうると考えられた。ここに著者は新抗生物質の探索にあたって多数の菌の感受性を調査するのに最も簡便な方法を考慮し、各種抗生物質を含有せしめたペーパーディスクを用いて感受性を調べ鑑別に有利な結果を得た。

2. 実験方法

a) 被検菌株：国際標準菌株を含む放線菌、およびその類縁菌の斜面培養より一白金耳量の菌体を取り、500 cc の肩付振盪用 フラスコ中の グルコース・肉エキス・ペプトン培地（グルコース 1.0%，肉エキス 0.5%，ペプトン 0.5%，食塩 0.2%，pH 7.0）100 cc に接種し、毎分 140 往復、振幅 8 cm の往復振盪機上で 28°C、4 日間培養した菌体を被検菌懸濁液とする。

b) 標準抗生物質含有ペーパーディスク調製：それぞれ結晶状に純粋となつた物質を 100 γ/cc の割合に蒸留水に溶かし、これに直径 8 mm、厚さ 3 mm の滅菌円型濾紙（東洋濾紙 No. 51）を浸し、取り出して滅菌濾紙上で余分の液を吸い取つた後シャーレ上で室温乾燥する。この抗生物質含有ペーパーディスクは冷室に保存すれば長期保存に耐え必要に応じて適宜使用できる。

c) 感受性検査：直径 9 cm のペトリーシャーレにグルコース・肉エキス・ペプトン寒天培地（上記グルコース・肉エキス・ペプトン培地に寒天を 1.5% 加えたもの）20 cc を基層として注入固化せしめた後、45°C 内外で 4 cc の同寒天培地に 5% の割合に上記被検菌懸濁液を混和したものを菌液層として展開固化せしめる。この

検査寒天培地に各種抗生物質をしませた上記標準ペーパーディスクを 5~9 箇所におき、27°C（Mycobacteria は 37°C）で 5~8 日間培養すると感受性の高い菌はペーパーディスクの周囲に発育阻害環を生ずる。

d) 判定：阻止環の直径が 15 mm 以上を常に示すものを鋭感受性（Very Sensitive：VS）、15 mm 以下のものを感受性（Sensitive：S）、ペーパーディスク外に阻止環を示さぬものを非感受性（-で示す）とし実験ごとに値の一定でないものをそれぞれ括弧（ ）で示した。

3. 実験結果および考察

結果を表 1 と表 2 に示す。表 1 は既知菌種の抗生物質感受性試験の成績を総括的に示してあり、表 2 は Streptomyces griseus 中の既知菌株の成績を示してある。表 2 中 S-1、S-2、S-3 は Streptomycin 生産菌、H-12 O-60 は Grisein 生産菌、SM-1 は Streptomycin 生産赤色変異株である。使用した抗生物質の性状の概要を示せば

1. Actinomycin：S. antibioticus, S. flaveolus, S. flavus, S. parvus など広範囲にわたる菌種から生産され、色素性ペプチドである。抗細菌性、抗腫瘍細胞性があり、弱い抗かび作用もある。

2. Actithiazic acid：S. virginiae, S. cinnamomensis より生産され、チアゾール核を含み、抗結核性があるが、ピオチンにより拮抗される。

3. Amphomycin：S. canus により生産され、両性電解質のポリペプチドで、抗細菌性で抗かび性は示さない。

4. Anisomycin：S. griseolus が生産し、抗かび、抗原

虫性で抗細菌性はない。

5. Aureothricin : *S. thioluteus*, *S. albus* により生産され硫黄を含み, 抗かび, 抗細菌性を示す。

6. Bacitracin : *B. subtilis* より生産されるポリペプチドで, 抗細菌性で, 抗かび性はない。

7. Chloramphenicol : *S. venezuelae* の生産する抗細菌, 抗ウイルス物質で, 抗かび性はない。

8. Cycloheximide : *S. griseus* の生産する抗かび性物質で, 抗細菌性はない。

9. Erythromycin : *S. erythreus* の生産するマクロライド物質で, 抗細菌, 抗ウイルス性があり, 抗かび性はない。

10. Etamycin : *S. griseus*, *S. griseoviridis* の生産するポリペプチドで, 抗細菌性でとくに結核菌に作用する。

11. Griseolutein : *S. griseoluteus* の生産する物質で, フェナジン核を含み, 抗細菌性で, 抗かび性はない。

12. Isonicotinic acid hydrazid : 抗結核菌性の化学合成物質である。

13. Kanamycin : *S. kanamyceticus* の生産する水溶性塩基性物質で, 抗細菌性があり, 抗かび性はない。

14. Luteomycin : *S. tanashiensis* の生産する色素性物質で, 抗細菌性があり, 抗かび性はない。

15. Neomycin : *S. fradiae* の生産する水溶性塩基性物質で, 抗細菌性があり, 抗かび性はない。

16. Nystatin : *S. noursei* の生産するポリエン物質で, 抗かび性があり, 抗細菌性はない。

17. Olygomycin : *S. sp.* の生産する抗かび物質で, 抗細菌性はない。

18. Oxamycin : *S. garyphalus* の生産するオキサゾリドン物質で, 抗細菌性があり, 抗かび性はない。

19. Puromycin : *S. alboniger* の生産する物質で, プリン核を有する。抗細菌, 抗アメーバ性があり, 抗かび性はない。

20. Pyridomycin : *S. pyridomyceticus* の生産する

物質で, 抗細菌性があり, 抗かび性はない。

21. Streptomycin : *S. griseus*, *S. bikiniensis*, *S. mashuensis*, *S. rameus*, *S. galbus* などにより生産され, 抗細菌性で, 抗かび性はない。

22. Tetracyclin : *S. rimosus*, *S. aureofaciens* より生産され, 抗細菌, 抗ウイルス性があり, 抗かび力はない。

23. Viomycin : *S. floridae*, *S. californicus*, *S. griseus* var., *S. luteovorticillus* より生産され, 抗細菌性で, 抗かび性はない。

これらの抗生物質はそれぞれの化学的性状, すなわちポリペプチドであるか配糖体であるかに無関係に表1に見るごとく, 抗細菌性の抗生物質はかび類には阻止環を示すことはなく, *Streptomyces*, *Nocardia* などの放線菌は *Mycobacteria* と同様抗細菌性抗生物質によつて阻害される場合が多い。これに反して抗かび物質は放線菌に, *Nystatin* を除いては全く阻止環を示さない。このことは放線菌がかび類よりもむしろ細菌類に密接な関係を有していることが示され, Romano ら, および Cummins らの示した細胞壁の組成構造の差を考え合わせれば, 阻害物質に対する感受性の差は細胞壁の差によるところ大なることが考えられる。*Streptomyces* 属中の各菌種は各種の抗生物質に対して特定の感受度を持つことが示されており (表1 aを参照) 表2に示されるごとく, 異なつた抗生物質を主として生産する異なつた菌株でも一菌種中に属するときは近似の感受性スペクトラムを示している。この各菌種に特異の感受性スペクトラムは菌種の判定にも利用しうるが, 特に抗生物質生産菌の鑑別に当つては, その菌種は, それ自身が生産することのある抗細菌性物質には非感受性 (耐性) であることが強く指摘される。すなわち *S. griseus* は, *Streptomycin* を生産する菌株はもちろん *Grisein* を主として生産する菌株も *Streptomycin* 耐性であり, *S. griseus* のひとつの特異性であるといつてもさしつかえない。ただし *S. griseus* は抗細菌性物質に対して *Streptomycin* ばかりでなく *Viomycin* にも非感受性であることは興

表1 a *Streptomyces* 属菌種の各抗生物質に対する感受性

菌種	抗 生 物 質					
	Amphomycin	Aureothricin	Bacitracin	Chloramphenicol	Griseolutein	Luteomycin
<i>S. venezuelae</i> O-163	S	—	(—)	—	—	—
<i>S. lavendulae</i> E-2	V S	V S	—	S	—	(—)
<i>S. roseochromogenes</i> B-2	S	S	S	V S	(—)	S
<i>S. netropsis</i> NRRL 2268	(—)	V S	(—)	(S)	(S)	(S)

味深い。Viomycin は発見当時 *S. floridae*, *S. californicus* なる菌種から得られたと発表されたが、この菌株は後に *S. griseus* に近似のものであるとされ現在 *S. griseus* var. に属せしめられていることから注目される事実である。これらのことは分類学的な菌種の決定にも利用しうるばかりでなく、特に新抗生物質探索スクリーニングに当たつて土壌から分離した菌の菌種を知り、いかなる抗生物質を生産する可能性があるかを早急に知るのに大いに利用される。すなわち従来土壌より分離した菌がいかなる抗生物質を生産する可能性があるかを知ることでもでき、また感受性を示した抗生物質を生産する可能性が少いことも有意に推定されよう。

このような新抗生物質探索の目的には、著者の考案せる簡易ペーパーディスク感受性試験法は土壌から分離した多数の菌株を検索するのに適している。被検菌の調製は放線菌が一般に生育しやすい培地を選んだが、ときには生産が推定される抗生物質の生産に最も適した培地で菌液を調製し、更に同培地平板で感受性試験を行なうことが望ましい場合もある。すなわちある抗生物質に対する非感受性を確かめるさい、その抗生物質が最も生産されやすい培地ではその菌は更にその抗生物質に対する非感受性(耐性)が高められることが考えられるからである。またペーパーディスクに含めた抗生物質の量は相当に加減できるが、50 μ /cc では感受性(阻害環)の発見が明瞭でない場合があり、反対に濃度を高めることは非感受性(耐性)を確認するためには有利であるが、水に難溶性のものと、易溶性のものとの取り扱いに注意を要する。

上述の方法により分離菌の生産抗生物質の推定に当たつて検索範囲を特定化することが可能となつたが検索を更に有効に追及する方法が要求される。この目的に適応するものとして著者は次の血清学的検索法を検討した。

B 血清学的鑑別法

1. 概要

上記のごとく抗生物質に対する感受性により検索すべき菌種の特定化を行なつた後、更に特定菌種を簡易に鑑別する方法として既知標準菌あるいは抗生物質生産菌の抗血清と凝集反応に注目した。すなわち同種の抗原抗血清間の凝集価は異種間のそれよりも顕著であることを利用し、上記のごとく既知菌種の中から特定化された菌種のいずれに最も近似であるかを推定することの可能性を検討した。

標準菌種についてウサギによる抗血清を得、抗原性を欠くもの、あるいはほとんど凝集価の上昇せぬものが認められたが、いつぼう凝集価の上昇を得た血清については、他の菌種の抗原との凝集に互に若干の交差性があるにもかかわらず、各菌種について特異な凝集価スペクトラムが示されること、および各菌種の抗血清はそれぞれの菌種の抗原に最も高い凝集価が示されることを認め菌種同定にあつて有効な手段となりうることを知つた。近年秦氏ら⁵⁾をはじめとして抗生物質生産菌株について凝集反応や沈降反応の研究があるが複雑な交差反応の故に菌種菌株の検索に適確性を欠くことが示されている。岡見氏は⁶⁾、*S. lavendulae* の近縁菌のみをとりあげて互の吸収試験により一菌種(*S. venezuelae*)に特異の抗血清を得ているが、かかる特異抗血清が得られる可能性は広く検討されていない。著者は菌種菌株の検索には前記感受性試験の後にこの血清学的方法を用いるべきであることを考慮するとともに、抗生物質研究スクリーニングにさいして多数の菌を取り扱うのに最も簡便な方法でなければならぬことを必須条件として研究を行なつた。

2. 実験方法

a) 試験菌株: 本実験に用いた放線菌は国際標準菌株、および著者の研究室にて分離した菌株22種で表3に示す。

b) 免疫用抗原の調製: 抗原として用いる放線菌の菌体懸濁液はメプトン培地(メプトン0.75%, 食塩0.2%, グルコース1%, pH7.0) 100 cc を 500 cc の振盪培養

表3 血清学鑑別法に用いた標準放線菌

属	種	株	属	種	株
<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	Z-1-6	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	S-1
"	<i>albus</i>	ATCC 3381	"	<i>halstedii</i>	I F O 3199
"	<i>antibioticus</i>	I F O 3126	"	<i>hygroscopicus</i>	I F O 3192
"	<i>aureofaciens</i>	NRRL 2209	"	<i>lavendulae</i>	3440-8
"	<i>aureus</i>	I F O 3303	"	<i>lavendulae</i>	A-6
"	<i>californicus</i>	ATCC 3320	"	<i>olivaceus</i>	B-1125
"	<i>fradiae</i>	117	"	<i>parvus</i>	NRRL B-1255
"	<i>flaveolus</i>	ATCC 3319	"	<i>pheochromogenus</i>	788-A2
"	<i>flavovirens</i>	ATCC 3320	"	<i>rimosus</i>	NRRL 2234
"	<i>griseolus</i>	I F O 3300	"	<i>rutgersensis</i>	I F O 3350
"	<i>griseocarneus</i>	Benedict	"	<i>vinaceus</i>	NRRL 1381

フラスコに分注し、120°C、20分間高圧滅菌した後、表3に示した菌株の斜面培養から一白金耳量の菌を接種し、28°C、3日間振盪培養（振幅8 cm、毎分140往復の振盪機上で）した後、3000 r.p.m.で遠心して菌体を集め生理的食塩水で3回洗浄して得る。200 ccの培養液から5~13 gの菌体（湿つた状態）が得られ、これをホモゲナイザーで均一化して250 mg/ccの懸濁液を調製し、殺菌剤として1000倍のマーゾニンを加える。ウサギに免疫するに当たって、10倍希釈25 mg/ccとして使用する。

c) 抗血清の調製：免疫するウサギは2 kg~3 kgの体重のもの3頭を選び、上記の抗原を1日目0.2cc、2日目0.4 cc、3日目0.6 cc、4日目0.8 cc、5日目1 cc、6日目を休み次の週からは3週間続けて1 ccづつ注射し、4週間目に全採血する。しかし4週間目に行なう部分採血でまだ凝集価の上昇せぬものは更に1週間追加するがなお上昇しない時はそのまま中止して全採血を行なう。血清を分離した後、56°C30分間加熱非動化し、1万倍のマーゾニンを添加して冷蔵庫に保存する。なおウサギに免疫する前に、その菌に対する自然抗体が存在するか否か予備試験を行なった。

d) 凝集反応：冷蔵庫に保存したウサギの放線菌抗血清を生理的食塩水で5倍より倍数希釈し、小試験管（1 cm×6 cm）に0.5 ccづつ分注し免疫用に調製したものと同一抗原を0.5 ccづつ添加しよく混和して、37°Cに2時間作用させた後凝集価を測定した。

3. 実験結果および考察

放線菌の菌種により免疫中ウサギが死亡する菌種、また凝集価の上昇せぬ菌種もあり、640倍以上の凝集価を示す抗血清を得た菌種は9種であった。（表4に示す）死亡したウサギの死因については抗原菌種中 *S. abikoensis* は Abikoviromycin (LD₅₀ 6.6 mg/kg i.v.) Viomycin 様物質 (Viomycin (LD₅₀ 200 mg/kg i.v.)), Candicidin 様物質 (Candicidin (LD₅₀ 12.5 mg/kg i.v.)) を、*S. griseocarneus* は Hydroxy streptomycin (LD₅₀ 500 mg/kg i.v.) を、*S. griseolus* は Anisomycin (LD₅₀ 140 mg/kg i.v.), Argomycin (LD₅₀ 170 mg/kg i.v.), Griseomycin (LD₅₀ 210 mg/kg i.p.), Ferrocidin (LD₅₀ 180 mg/kg i.v.) をそれぞれ生産するが、種々の抗生物質を生産する *S. lavendulae* でも上記のごとく洗浄調製し静脈に投与した量では致死量になることはほとんど考えられないので、むしろ抗原として用いた放線菌の菌糸細胞の物理的な障害によるものと考えられる。凝集価の上昇せぬ菌種についてその原因を系統的に解明することは行なわなかつたが、*S. griseus* は繰返し実験を行なつても、また他の *S. griseus* 菌株を用いても凝集価の上昇は得られず、この条件下で *S. griseus* の示す一種の特性として見ることもできると考えられる。いつばう表5および表6に示されるように、各菌種により凝集反応の出現度(++, +, ±)によつて示される)が質的に異なるごとく見える。すなわち+の凝集が1280倍まで見られるものでも、それより濃い抗血清に

表4 免疫中ウサギの死亡した菌種

属	種	株	属	種	株
<i>Streptomyces</i>	<i>abikoensis</i>	Z-1-6	<i>Streptomyces</i>	<i>lavendulae</i>	3440-8
"	<i>griseocarneus</i>	Benedict	"	<i>olivaceus</i>	B-1125
"	<i>griseolus</i>	I F O 3300			

凝集価の上昇せぬ菌種 (1 : 320以下)

属	種	株	属	種	株
<i>Streptomyces</i>	<i>albus</i>	ATCC 3381	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>	S-1
"	<i>aureofaciens</i>	NRRL 2209	"	<i>parvus</i>	NRRL B-1255
"	<i>flaveolus</i>	ATCC 3319	"	<i>lavendulae</i>	A-6
"	<i>flavovirens</i>	ATCC 3320	"	<i>vinaceus</i>	NRRL 1381

凝集価の上昇した菌種

属	種	株	凝集価
<i>Streptomyces</i>	<i>aureus</i>	I F O 3303	1 : 1280
"	<i>antibioticus</i>	I F O 3126	1 : 1280
"	<i>californicus</i>	ATCC 3320	1 : 20480
"	<i>fradiae</i>	117	1 : 5120
"	<i>halstedii</i>	I F O 3199	1 : 1280
"	<i>hygroscopicus</i>	I F O 3192	1 : 1280
"	<i>pheochromogenus</i>	788-A2	1 : 2560
"	<i>rimosus</i>	NRRL 2234	1 : 1280
"	<i>rutgersensis</i>	I F O 3350	1 : 5120

表 5 標準菌種

抗 原 菌 種	抗 血 清 (希)											
	S. fradiae 117				S. pheochromogenus 788-A2				S. aureus I F O 3303			
	卅	++	+	±	卅	++	+	±	卅	++	+	±
S. fradiae 117	1280	2560	5120		20	40		80	40	80		160
S. pheochromogenus 788-A2		40		160	640	1280	2560		10	80	640	2560
S. aureus I F O 3303											1280	
S. antibioticus I F O 3126		320	640			160	320		80	160	640	2560
S. rutgersensis I F O 3350		10				10						
S. hygroscopicus I F O 3192									20	40		
S. halstedii I F O 3199						80			40		80	
S. rimosus NRRL 2234												
S. californicus ATCC 3320	10	20	40			10	20		40		320	640

表 6 標準放線菌の凝集スペクトラム

抗 原 菌 種	抗 血 清 (希 釈 倍 数)									
	S. fradiae 117	S. pheochromogenus 788-A2	S. aureus I F O 3303	S. antibioticus I F O 3126	S. rutgersensis I F O 3350	S. hygroscopicus I F O 3192	S. halstedii I F O 3199	Si rimosus NRRL 2234	S. californicus ATCC 3320	
S. fradiae 117	5210	40	80	40	160	80	20	40	80	
S. pheochromogenus 788-A2	40	2560	640	160	80	640	80	1280	640	
S. aureus I F O 3303	-	-	1280	80	160	160	80	80	640	
S. antibioticus I F O 3126	640	320	640	1280	640	320	640	320	640	
S. rutgersensis I F O 3350	10	10	-	-	5120	-	160	-	160	
S. hygroscopicus I F O 3192	-	-	40	80	-	1280	40	160	320	
S. halstedii I F O 3199	-	80	80	80	40	320	1280	160	640	
S. rimosus NRRL 2234	-	-	-	160	-	640	20	1280	10	
S. californicus ATCC 3320	40	20	320	80	160	80	320	640	20480	

の凝集反応

積倍(数)

S. antibioticus IFO 3126				S. rutgersensis IFO 3350				S. hygroscopicus IFO 3192				S. halstedii IFO 3199				S. rimosus NRRL 2234				S. californicus ACTT 3320			
卅	廿	十	士	卅	廿	十	士	卅	廿	十	士	卅	廿	十	士	卅	廿	十	士	卅	廿	十	士
20	40		80	40	80	160		10	40	80		10	20			10	40			10	40	80	160
20	40	160		40		80		160	320	640	1280	40	80			160	320	1280		10	320	640	
20	40				40	160			160				80				40	80	160	40	640		5120
80	320	1280		40	320	640	1280	80	160	320		80	320	640		160	320				320	640	
					250	5120							160								160		
40	80							80	160	1280		20		40		80	160			20	40	320	
10	40	80			10	20	40	40	80	320	640	80	160	1280			80	160		20	40	640	
	160								640				20				160	1280	5120			10	40
	40	80		40	80	160		20	80			10	320		5120	10	40	640	5120	80	5120	20	480

において卅あるいは卅の凝集状態が得られるものと、得られないものがあることが注意される。しかしこれは用いた抗原が複合性の抗原であり、あるいは抗原の調製にさいする培養条件その他により必ずしも一定でないことも考えられるので菌種についての特性として見ることは危険である。いずれにせよ S. fradiae の抗血清は S. fradiae の抗原に、S. aureus の抗血清は S. aureus の抗原に対して最も凝集価を高く示し、他の菌種の抗原に対しては無いかあるいはそれより低い凝集価を示す。他の菌種と交差凝集はあるがそのスペクトラムを通観すればそれぞれに特異の凝集スペクトラムを示していることがわかる。表7に示されるように同菌種中の異なつた菌株も高い凝集価が示され、吸収試験によつてほとんど同質の抗原構造を有することが示される。これらを考察するに少なくとも Neomycin を生産する S. fradiae は S. fradiae 117 の標準血清に対し高凝集価を示し、新分離

菌種検索に利用しうることが知られる。しかしながら上述のごとく他菌種との交差反応が比較的広く見られることなどから、この凝集反応のみによつて直接菌種を鑑別することは不可能であり、前述の感受性試験によつて選択特定化した範囲の菌種中で菌種を鑑別するのに利用することができると思はれる。

C 土壌より新たに分離した放線菌の鑑別

1. 概要

上記の感受性試験および血清反応により菌種鑑別の可能性が見出されたので、新たに土壌より分離した放線菌を用いて上述の方法を行い菌種の鑑別が行なわれることを確認した。

2. 実験方法

a) 土壌より放線菌の分離：土壌 10 g を 20 cc の生理的食塩水に懸濁し、Krainisky のグルコース・アスパラギン寒天平板上に塗布展開し、7 日間、27°C で培養後

表7 S. fradiae 中の菌株の凝集価

抗 原 菌	S. fradiae 117 標準抗血清に対する凝集									
	40X	80X	160X	320X	640X	1280X	2560X	5120X	10240X	
S. fradiae 117	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
" 261	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
抗 血 清	吸 収 抗 原				抗 原				凝 集 価	
S. fradiae 117	S. fradiae 261				S. fradiae 117				1 : 40	
"					"				1 : 5120	

表8 新分離放線菌培養液の抗菌力

分離菌番号	Staph. aureus 209P(mm)	E. coli NIHJ	Mycobact. 607	Aspergillus niger	Saccharomyce cerevisiae
1560	—	—	—	—	—
1561	—	—	—	—	—
1562	20.0 *	17.0	19.0	—	—
1563	—	—	—	—	—
1564	—	—	—	—	—
1565	—	—	—	—	—

— : 阻止環を示さず

* : 数字は阻止環直径 (mm)

表9 1562菌株の感受性試験

抗生物質	阻止環直径 (mm)	抗生物質	阻止環直径 (mm)
Actithiazic acid	—	Oxamycin	17.5
Amphotycin	18.0	Puromycin	18.5
Chloramphenicol	19.0	Pyridomycin	18.0
Erythromycin	20.0	Streptomycin	20.0
Etamycin	19.5	Tetracycline	19.0
Griseolutein	18.5	Viomycin	—
Kanamycin	18.5	Actinomycin	18.5
Luteomycin	17.0	Aureothricin	20.0
Neomycin	—		

放線菌の集落を釣菌し同じくグルコース・アスパラギン斜面寒天に継代分離した。

b) 菌学的菌株同定が光学顕微鏡による気菌糸形態、各種培地(合成培地、肉汁寒天、グルコース加肉汁寒天、馬鈴薯切片、ゼラチン、牛乳培地、澱粉合成培地など)上の集落の形態、色素の産出、生理性状(蛋白分解力、澱粉分解能など)を調査記載した。

c) 生産抗生物質の同定: グルコース・肉エキス・ペプトン培地(グルコース1.5%, 肉エキス0.75%, ペプトン0.75%, 食塩0.3%) 100 cc を 500 cc の肩付振盪培養フラスコ中で滅菌し、これに被検菌(グルコース・アスパラギン寒天斜面培養)を一白金耳接種し、28°C で 8 cm 振幅、毎分 140 往復の振盪機で培養する。4日後の培養液をカップ法により抗菌力を常法に従い調査した。同時に濃液をペーパーストリップにスポットし、各種溶剤を用いて上昇法により展開し、上記の抗菌像試験で阻害を受けた菌を含む寒天上に展布し、37°C 培養後、抗菌スポットを検し標準既知抗生物質と比較し同定を行なった。

3. 実験結果および考察

土壌より新たに分離した菌株は抗菌力試験より表8の結果を得たがそのうち抗菌力の示された1562号菌は典型的な *Streptomyces* 属の性状(気菌糸を着生)を示していたので Bacitracin のごとき細菌から産生される抗生物質、および抗かび性抗生物質を除き感受性試験結果

を得た。表9のごとく 1562 号菌は Actithiazic acid, Neomycin, Viomycin に耐性であつたが、Actithiazic acid は表1に見るごとくすべての *Streptomyces* に阻害作用を示さない。従つて Neomycin, (*S. fradiae* が産生)あるいは Viomycin (*S. californicus* が産生)を産生する可能性が推定されるが、抗菌像(表8)からはいずれか判定することはできない。(Neomycin も Viomycin も同じ抗菌像を示すことが多い)ただ 1562 号菌は桃色の気菌糸を着生することが *S. californicus* より *S. fradiae* に近いと思われるが更にいずれかの確認が必要である。そこで次に血清反応によりその確認を行なった。表10に示すごとく1562号菌は *S. californicus* よりむしろ *S. fradiae* に近似であることが示された。次にはたして1562号菌がに属するか否かを菌学的に確かめ

表10 1562菌株と標準抗血清との凝集反応

抗原	凝集価(抗血清希釈倍数)	
	標準抗血清	
	<i>S. fradiae</i> 117	<i>S. californicus</i> ATCC 3320
1562号菌	1 : 2560	1 : 80
<i>S. fradiae</i> 117	1 : 5120	1 : 40
<i>S. californicus</i> ATCC 3320	1 : 80	1 : 20480

表11 1562菌株の菌学的性状と *S. fradiae* との比較

	分離菌株	国際標準菌株
	1562	<i>S. fradiae</i> Waks 3535
顕微鏡的性状	基中菌糸はよく分枝し菌糸には先端に多くの螺旋性が見られる。胞子は多く螺旋部に見られる。卵円形で $1.0 \times 1.2 \mu$ の大きさをもつ。	気菌糸は線状に真直にのびるがときどき鉤状、輪状が見られる。胞子は短棒形、または卵形で $0.5 \sim 0.7 \times 1.25 \mu$ の大きさをもつ。
各培地上の形態及び生理作用		
① 合成培地	拡散性の発育で無色あるいは暗黄色を呈する。気菌糸は厚くうすいピンク系の褐色で溶解性色素はない。	拡散性の無色で滑らかな発育で気菌糸は厚く綿状に表面をおおい桜貝緑のピンクを呈する。可溶性の色はない。
② 肉汁寒天	褐色を帯びた暗黄色の発育で気菌糸は生じにくく白く点状につく時がある。可溶性色素は生成しない。	黄色の限局型の発育で除々に黄橙色に変化する。可溶性色素は生成しない。
③ グルコース加肉汁寒天	湿潤性のクリーム色の発育で気菌糸は生じにくい。可溶性色素は生成しない。	光沢のある滑らかな限局型の発育をし鈍黄色を呈する。
④ 馬鈴薯切片	皺のある橙色の発育で気菌糸は黄色味がかかる。切片の色は変らない。	限局型の発育で橙色を呈する。色素は可溶性でない。
⑤ 肉汁ゼラチン培地	クリーム色の発育で気菌糸が液化された部分につくこともある。可溶性色素は生成しない。液化は迅速である。	稠密な生育で色はクリームから茶色に変化する。可溶性色素は生成しない。液化が見られる。
⑥ 澱粉合成培地	褐色をおびた無色の発育で気菌糸は桃色。可溶性色素はない。澱粉消化は行なわれる。	拡散性の無色の発育。澱粉消化は行なわれる。
⑦ 牛乳培地	クリーム色の発育で表面、試験管壁に環状に生え、凝固は一週間て生じペプトン化する。	クリーム色に試験管壁に弱い環状の発育をする。凝固、ペプトン化する。
⑧ 生産抗生物質	抗細菌性物質を生産する。	抗細菌性物質 Neomycin を生産する。

た。表 11 のごとく 1562 号菌は *S. fradiae* に属することが判明したが更に 1562 号菌の産生する抗細菌性物質が Neomycin であることをペーパークロマト法⁸⁾により確認した。(図 1) これらのスポットは対照に用いた Neomycin とほぼ同一の Rf 値を示すものであり Neomycin に耐性の *Mycobacterium* 607 を用いるとスポットが示されないことで 1562 号菌の抗細菌物質の示すスポットは Neomycin であることが確認された。

総括

1. 放線菌の国際標準菌株、および著者の分離した放線菌のうち 20 種の放線菌を用い 22 種の標準抗生物質に対する感受性を簡便なディスク法を用いて調査し菌種により特異な感受性スペクトラムが示されることを知った。

2. 各放線菌はその生産する抗生物質には非感受性(耐性)で、また他の抗生物質のうち特定のものに対しても感受性を欠くものが知られた。したがって被検菌の菌種同定に当たって、既知抗生物質に対する耐性によって検索菌種の範囲を特定化することができる。

3. 上記のごとく検索された特定の数菌種から一つの菌種を決定するには次の血清学的方法が考慮される。標準菌株についてウサギによる抗血清を得た。抗原性を欠くもの、あるいはほとんど凝集価の上昇せぬものが認められたが、いつばう凝集価の上昇を得た抗血清については他の菌種の抗原との凝集により各菌種について特異な凝集価スペクトラムが示されることを知った。

4. ことに各菌種の抗血清はそれぞれの菌種抗原に最も高い凝集価が示されることは菌種の同定に当たって検索すべき菌種を特定化するのに貢献しうることを知った。

5. 土壌より著者の分離した菌株について上記感受性試験、および凝集試験を行ない菌種の同定、および生産抗生物質の鑑別に成功した。

結語

抗生物質生産放線菌の迅速簡便な菌種鑑別法として、著者は標準抗生物質に対する感受性試験と標準抗血清に対する血清反応とを組合わせた新法を考案し、これを実

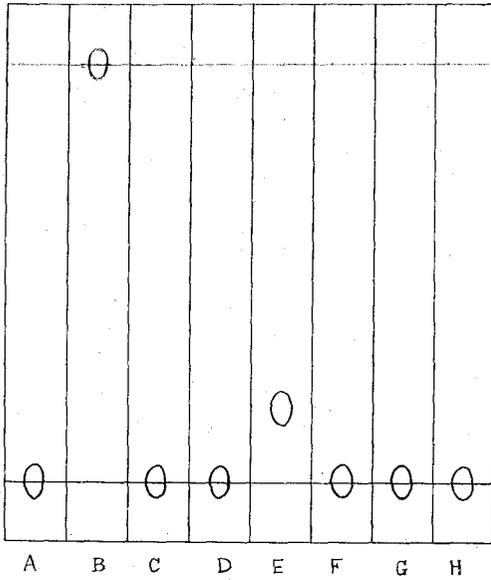


図1 1562 菌株培養液の総合クロマトグラム

検定菌 Staph. aureus 209 P

溶 剤	A	ブタノール (水飽和)	
	B	3%塩化アンモニウム	
	C	7.5%フェノール	
	D	50%アセトン	
	E	ブタノール 40 ml	} 混合液
		メタノール 10 ml	
		水 20 ml	
		メチルオレンジ 15g	
	F	E+メチルオレンジ	
	G	ベンゼン 80 ml	} 混合液
		メタノール 20 ml	
	H	蒸留水	

地に応用して優秀な成績をおさめた。今後新抗生物質の研究に応用さるべき方法と考える。

本研究にさいし終始御懇篤な御指導を賜わった部長梅沢浜夫博士に深甚な感謝の意を捧げる。また著者は本論文の御校閲を賜わった平野憲正教授に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) Romano, A.H. et al. : J. Bacteriol., **72** 865-868 (1956)
- 2) Cummins, O.S. et al. : J. Gen. Microb., **15** IX-X (1956)
- 3) Waksman, S.A. et al. : Am. Rev. Tuberc., **67** 261-264 (1953)
- 4) Kuroya, M. et al. : J. Antibiotics, Ser. A, Tokyo **4** 327-332, 363-366 (1953)
- 5) Yokoyama, Y. and Hata, T. : J. Antibiotics, Ser. A, Tokyo **6** 80-86 (1953)
- 6) Okami, Y. : Giornale di Microbiologia, **2** 63-75 (1956)
- 7) 厚生省編纂 : 抗菌性物質製剤基準 昭28 B3頁
- 8) Ishida, N. et al. : J. Antibiotics, Ser. A, Tokyo **4** 505 (1951), **5** 481 (1951)