

〔特別掲載〕

(東女医大誌第30巻第8号)
(頁1403—1410昭和35年8月)エリスロマイシン群抗生物質とその類似抗
生物質との迅速簡易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)

大 井 小 二 三
オ オ イ コ フ ミ

(受付 昭和 35 年 6 月 13 日)

目 次

緒言

A. 各群標準物質による予備実験

① ムーバークロマトグラフ法

a 実験方法

b 実験結果

c 考察

② 呈色試験

a 実験方法

b 実験結果

c 考察

③ 溶血試験

a 実験方法

b 実験結果

c 考察

B. 分離菌株培養液での鑑別法

① 実験方法

② 実験結果

③ 考察

総括及び結語

緒 言

近時、抗生物質は化学療法剤としてきわめて重要な地位を占め、新抗生物質の探索が盛んに行われてきているが、それに伴つて抗生物質の数はきわめて多数にのぼり、放線菌の生産するものは、すでに 260 種を数えている。それにもかかわらず、既知抗生物質には、なお細菌の薬剤耐性、アレルギー、あるいは毒性、抗菌スペクトラム、抗菌効力などの諸問題において多くの難点が残されているため、さらに新しい抗生物質を探索するということは必須の傾向にある。このような事情のもとで新抗生物質を探索するにあつては一つの菌株の生産する抗

生物質と既知抗生物質との異同をできるだけ早期に鑑別することが重要な問題となる。現在とくに一層の研究探索を強く要望されているものの一つにグラム陽性菌に有効な新抗生物質がある。このグラム陽性菌に有効な新抗生物質の探索中に非常にしばしば遭遇する既知抗生物質にエリスロマイシン並びにその類似抗生物質群がある。エリスロマイシン群抗生物質 (以下 E 群物質と呼ぶ) には、エリスロマイシン¹⁾、カルボマイシン²⁾、フオロマジジン³⁾、メチマイシン⁴⁾ など 18 の物質が知られている。一方 E 群物質とはその生産菌の菌学的な性状や有効物質の簡単な抗菌スペクトラム、あるいは簡単な精製操作だけでは容易に判別しがたい類似抗生物質群がある。すなわちアクチノマイシン⁵⁾、アクチノロイキン⁶⁾ によつて代表される物質群 (以下それぞれ AM 群、AL 群物質と呼ぶ) であり、キサントマイシン⁷⁾、キサントマイシン様物質⁸⁾ を含む物質群 (以下 X 群物質と呼ぶ) であり、他の一つはルテオマイシン (以下 L 物質)⁹⁾ である。これら類似性を有する物質群を早期にかつ簡便に鑑別することは新抗生物質の発見及び研究を迅速かつ円滑に推進する上にきわめて重要なことであり、その方法の確立は焦眉の急務である。著者はグラム陽性菌に有効な新物質が E 群物質あるいはその類似抗生物質たる AM、AL、X、L 群に属する場合に抽出操作を施すことなくその生産菌の培養液を用いてムーバークロマトグラフ法を行い、その濾紙片に抗菌試験、呈色試験並びに溶血試験を施して所属抗生物質群を迅速簡便に鑑別し、かつ毒性の強弱をも同時に推定しうる方法を考案した。

A. 各群標準物質による予備実験

① ムーバークロマトグラフ法

a. 実験方法

材料: アクチノマイシン J, アクチノロイキン, エリ

Kofumi OHI (Department of Antibiotics, National Institute of Health, Tokyo): Studies on an improved method for identification of erythromycin-group and related antibiotics.

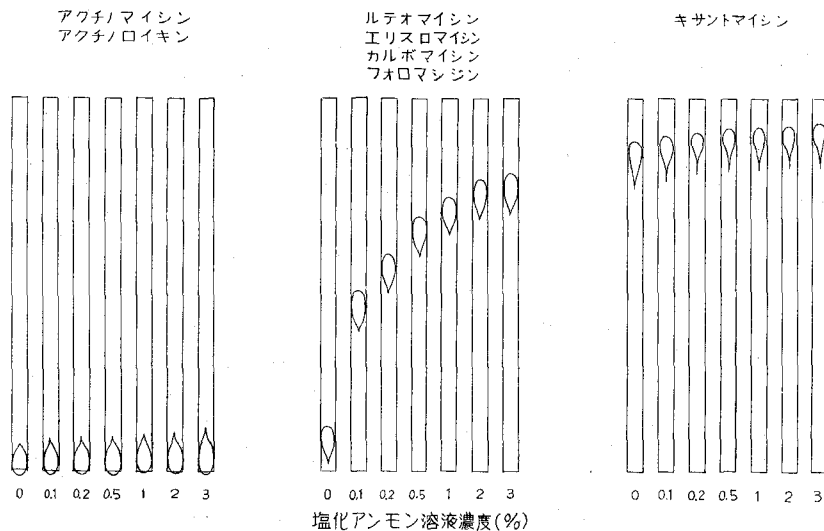
スロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジン, ルテオマイシン, キサントマイシンAの純品またはそれに匹敵する純度を有する結晶性粉末を使用した。

方法: 一次元上昇法を用いた。濾紙片は 1cm×40cm の大きさに切断した東洋濾紙 No. 50 を使用した。試料を蒸留水を用いて各 300 γ /ml の濃度の溶液とした。ただしアクチノマイシンとアクチノロイキンとは溶解にクロロホルムを用いた。この溶液を毛細管にとり濾紙片の下端から 6cm の原点に 1 滴 (約 0.01ml) をスポットし空気中で充分乾燥する。展開溶剤は塩化アンモンの 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3% 水溶液及びアセトンの 5, 10, 15, 20, 30, 50% 水溶液を用いた。ここで展開に先だつて展開の条件を均一にするため濾紙片をクロマト塔中に 15 時間放置し展開溶剤の蒸気と平衡したところで展開を開始した。展開時間は 2~4 時間で展開前線が原点より 20cm に達したところでクロマト塔より取りだし直射日光を避けて風乾したのち Rf 値は抗菌像をもつて判定した。試験菌には *M. pyog. var. aureus* 209P 及び *B. subtilis* PCI 219 を用い基層及び種層寒天培地は, *M. pyog. var. aureus* 209P 用としてペニシリン検定用寒天培地 (ペプトン 10.0g, 肉エキス 5.0g, 食塩 2.5g, 寒天 15.0~20.0g, 蒸留水を加えて 1000ml とし, 滅菌後の pH を 6.5~6.6 に修正したもの) を用い, *B. subtilis* PCI 219 用としてはストレプトマイシン検定用寒天培地 (ペプトン 5.0g, 肉エキス 3.0g, 寒天 15.0g, 蒸留水 1000ml とし, 滅菌後の pH を 7.8~8.0 に修正したもの) を用いた。巾 30cm, 長さ 40cm, 高さ 2cm のステンレス製トレイ二枚にそれぞれの基層寒天培地 400ml を入れて水平面になるように固まらせ, この上に 45°C に保つた種層寒天培地 100ml に試験菌液 (抗菌性物質製剤基準に準拠)¹⁰⁾ を, *M. pyog. var. aureus* 209P は 2%,

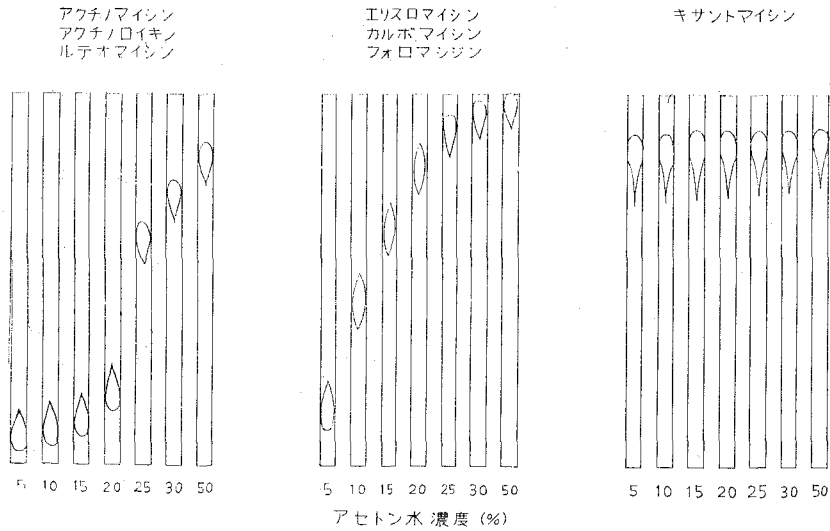
B. subtilis PCI 219 は 0.5% の割合で加えたものを一様にひろげて固まらせる。次に展開, 風乾ずみの濾紙片をこの上にはりつけ室温で 15 分間放置して試料が充分寒天に拡散したところでその濾紙片を取りのぞき 37°C の孵卵器で 18~20 時間培養しその阻止帯が描く抗菌像を測定する。この際抗菌像をよりよく観察するために寒天表面にフェノールを流し菌を固定して白色となし静かに水洗してフェノールを除き抗菌像のみ透明とし Rf 値並びに形状を観察した。

b. 実験結果

第 1 図, 第 2 図に抗菌像を第 1 表に Rf 値を示す。第 1 図は塩化アンモン溶液を展開溶剤としたもの, 第 2 図はアセトン水を展開溶剤としたものである。この図及び表に見られるごとく展開溶剤として塩化アンモン溶液を用いた場合はアクチノマイシンとアクチノロイキンは塩化アンモンの濃度の上昇によつてもスポットがほとんど原点にとどまり, エリスロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジン, ルテオマイシンは塩化アンモン溶液の濃度が増すにしたがつて原点より展開溶剤前線へ上昇し, キサントマイシンは各濃度でほとんど溶剤前線にあつた。またアセトン水ではアクチノマイシン, アクチノロイキン, ルテオマイシン, エリスロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジンなどはスポットがアセトンの濃度が増すにしたがつて上昇線を示すがそれらのうちでエリスロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジンは上昇の程度が速く前三者とは区別され, キサントマイシンは各濃度でほとんど溶剤前線にあつた。なお塩化アンモン溶液の系では濃度が高いほど抗菌像の Tailing がみられた。この実験より 0.2% 塩化アンモン溶液を用いればアクチノマイシン, アクチノロイキンは Rf 0.02~0.03 に, ルテオマイシン, エリスロマイシン, カルボ



第 1 図 塩化アンモン溶液によるペーパークロマトグラフ法



第2図 アセトン水によるペーパークロマトグラフ法

第1表 ペーパークロマトグラム Rf 値

展開溶剤 濃度(%) 抗生物質名	塩化アンモン溶液							アセトン水						
	0	0.1	0.2	0.5	1	2	3	5	10	15	20	25	30	50
アクチノマイシン	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.09	0.10	0.12	0.17	0.59	0.69	0.80
アクチノロイキン	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.07	0.09	0.11	0.17	0.61	0.72	0.82
ルテオマイシン	0.08	0.45	0.52	0.58	0.66	0.72	0.75	0.10	0.11	0.15	0.20	0.45	0.79	0.80
エリスロマイシン	0.10	0.46	0.55	0.64	0.70	0.74	0.76	0.13	0.45	0.64	0.80	0.91	0.94	0.96
カルボマイシン	0.09	0.48	0.56	0.66	0.73	0.77	0.80	0.14	0.47	0.65	0.83	0.90	0.94	0.95
フロロマシジン	0.09	0.47	0.55	0.64	0.71	0.74	0.77	0.14	0.45	0.63	0.79	0.88	0.92	0.92
キサントマイシン	0.85	0.87	0.88	0.89	0.89	0.90	0.90	0.85	0.85	0.85	0.85	0.86	0.86	0.86

マイシン、フロロマシジンは Rf 0.52~0.56 にキサントマイシンは Rf 0.88 に抗菌像が現われ、ルテオマイシンとエリスロマイシン群またはアクチノマイシンとアクチノロイキンは、常に各濃度で同一の Rf 値を示し鑑別できなかつた。次に10%アセトン水を用いれば、ルテオマイシンは Rf 0.11 に、エリスロマイシン、カルボマイシンなどは Rf 0.45~0.47 に、キサントマイシンは Rf 0.85 に抗菌像が現われ鑑別に好適であつた。しかしアクチノマイシン、アクチノロイキンは、すべての濃度でルテオマイシンとほぼ同様の Rf 値を示し鑑別できなかつた。この両法を併用実施すればアクチノマイシンとアクチノロイキンは鑑別できないが、この二物質と他の物質ルテオマイシン、エリスロマイシン群、キサントマイシンはそれぞれ鑑別可能であることが判明した。

c. 考察

抗菌スポットによるペーパークロマトグラフ法を抗生

物質の鑑別に用いた研究は石田らの¹¹⁾、いわゆる総合ペーパークロマトグラムがある。即ち、石田氏らは8種の溶剤系を用いて上昇法により展開し、それぞれの系の Rf 値を総合的に判定して、物質を鑑別するのであるが、多種の溶剤系あるいは二次元の展開によるよりも一次元あるいは少数の溶剤系を用いて鑑別できることが、抗生物質のスクリーニングには有利である。この点著者の見出したごとく、2種の溶剤系による判別は迅速簡易鑑別に使用しうる条件を備えている。ことに塩化アンモン系において、石田らの用いているごとく高濃度の塩化アンモン系では Tailing がしばしば見られる欠点を有し、著者のごとく低濃度の塩化アンモン系を用いることが有利である。しかしながら、抗菌スポットの明瞭さが微小な実験条件の変化により変化することもあり、この2種の系のみの Rf 値で確実な鑑別を行うことが危険な場合も生ずることがある。また上記のごとく、アクチノマイシン

ンとアクチノロイキンとの判別は不能であつたので、ここに各群抗生物質に耐性の菌を用いて抗菌スポットの消滅を判別し、鑑別することも有効と考えられるが、この群の抗生物質に対する耐性の上昇は比較的緩慢なるため、確実な耐性菌が得られ難いことにより、むしろ他の化学的性状などによる鑑別が有利なことが考えられ、著者は次の実験を行つた。

① 呈色試験

a. 実験方法

材料：使用した抗生物質は実験①と同じ。
 方法：試料は実験①で使用した 300γ/ml の溶液を用い、東洋沱紙 No. 50 に呈色反応の感度を考慮に入れ毛細管で5滴(約0.05ml) スポットし、風乾後呈色試薬をその上に噴霧し、呈色の有無及び色調を調べた。各種呈色試験を考慮したのち、最も有効な呈色試薬として1 N苛性ソーダ液と1%塩化第二鉄溶液との二種を用いた。次に実験①の方法で0.2%塩化アンモン溶液と10%アセトン水で展開した沱紙片について呈色試験を同様にを行い呈色の位置、呈色の有無を調べた。

b. 実験結果

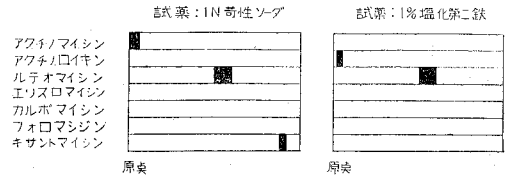
呈色試験の結果は第2表に示すごとくエリスロマイシ

第2表 呈色試験

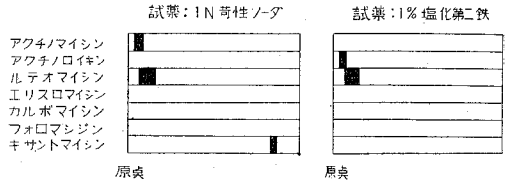
抗生物質名	試薬	
	1 N苛性ソーダ液	1%塩化第二鉄溶液
アクチノマイシン	+	(紫色退色早し)
アクチノロイキン	-	+
ルテオマイシン	+	(褐色)
エリスロマイシン	-	-
カルボマイシン	-	-
フロロマシジン	-	-
キサントマイシン	+	(赤紫色)

ン群は1 N苛性ソーダ、1%塩化第二鉄両反応に陰性、ルテオマイシンは両反応に陽性で、アクチノマイシン、キサントマイシンは前者に陽性、後者に陰性で、アクチノロイキンは逆に前者には陰性であるが後者には陽性である。この結果より、アクチノマイシンとキサントマイシン間の判別はできないが、このアクチノマイシン、キサントマイシンと、アクチノロイキンとルテオマイシンとエリスロマイシン群とのそれぞれの鑑別は可能であつた。なお実験②で展開した沱紙片について呈色試験を行つた結果第3図のごとくほぼ同様 Rf 値に前記と全く同様の呈色を示した。1 N苛性ソーダを使用するとき、アクチノマイシン、キサントマイシン、ルテオマイシンは、いずれも紫色に呈色するが、その、たい色順序は上記の順に早かつた。

(1) 展開溶剤：0.2%塩化アンモン溶液



(2) 展開溶剤：10%アセトン水



第3図 ペーパーグラムを用いた呈色試験

c. 考察

X線、紫外線などによる菌の抗生物質生産性を増強しない通常のスクリーニングの段階では、実験に供した抗生物質はそれぞれ培養液に30~100γ/ml生産されているのが従来の経験によつて知られている。したがつて培養液をスポットしペーパークロマトグラフ法を行つたのちに呈色反応を発現せしめるには、これとほぼ同等の含有濃度の抗生物質液を用いる必要がある。この意味で試験材料液の濃度を300γ/mlとしたのであるがこの濃度で発現するペーパー上のスポットに対して感度を有する呈色試薬の選定を行つた。また一方試験材料液が純粋の抗生物質溶液でなく、培養液のごとく複雑な組成液中の抗生物質液である場合を考慮すれば、培養液中の他物質により呈色するほど鋭敏なものであつてはならないことが要求される。この点上記2種の呈色反応は、これらの要求を満足するものであることが判明したのである。したがつて前項のごとく、供試抗生物質の判別用ペーパーグラムにより得たスポットをより確実に判定する有利な手段であることは疑いない。すなわち前項で判明した僅か2種の溶剤系で展開した沱紙片を用いて、抗菌像による Rf 値と同時に上記呈色試験を行えば簡易にして確実な鑑別を行うことができる。ことにアクチノマイシンとアクチノロイキンは前記のペーパーグラムのみによつては判別しがたかつたが、この呈色反応によつて完全に判別可能となつた。

③ 溶血試験

前項供試抗生物質のごとき抗グラム陽性抗生物質は緒言に述べたごとく類似のものが多数発見されているが、それらのうち実用化されているものはエリスロマイシンオレアンドマイシンなど、E群に属する物質に過ぎず、その原因の一つは、それらの有する毒性の点にある。またこの毒性の一要因は物質自体の有する溶血性によることが考えられる。一方これら一連の抗生物質を通観する

に、毒性の比較的少ない、エリスロマイシンを一方に、毒性のきわめて強いキサントマイシンを他端に考慮するとき、それらの化学構造の部分的変化により溶血性ひいては毒性を失いそれらの中間的な類似諸性状を示し、しかも毒性の比較的少ない物質の出現が考えられる。かかる見地からペーパーグラム上のスポットを用いて溶血試験を併行して行うことが有意であると考え、次の溶血実験を行った。

a. 実験方法

材料：使用した抗生物質は実験と同じ。

方法：検出法として血液寒天培地の溶血性を調べる方法を用いた。血液寒天培地は直径 9cm, 高さ 1.5cm のペトリー皿に普通寒天を 80°C で溶解後、45~50°C に保ち 10% 馬血液を加えたものを 10ml 入れて水平面になるよう固めたものを用いた。試料は実験①で使用した 300γ/ml の溶液を用い、これを抗生物質の簡易測定法としてしばしば利用されるペーパーディスクに浸ませアクチノマイシン、アクチノロイキンの場合はディスクをよく風乾してクロロホルムを除き、血液寒天にはり、そのまま 37°C の孵卵器で 18~20 時間放置後その溶血リング(溶血環)の大きさを測定した。次に試料 300γ/ml の溶液を 5 滴スポットした沱紙片を用い実験①の方法で 0.2% 塩化アンモン溶液と 10% アセトン水で展開風乾したものを、それぞれ各抗生物質の Rf 値の前後 2cm ずつで切りとり血液寒天にはりつけ 37°C の孵卵器で 18~20 時間放置後その溶血の有無強弱を調べた。

b. 実験結果

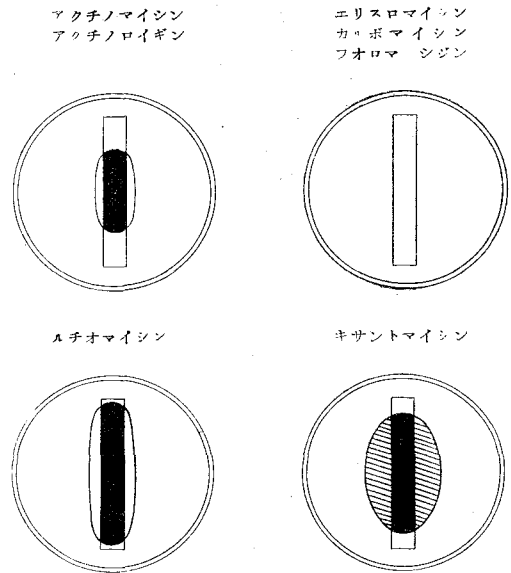
ペーパーディスク法による溶血リングの大きさは第 3 表に示すように、キサントマイシン、ルテオマイシン、アクチノマイシン、アクチノロイキンの順に小さくなり、

第 3 表 溶 血 試 験

項目 抗生物質名	5%血液寒天溶血環径	10%血液寒天溶血環径	溶血像
アクチノマイシン	7.5 mm	6.5 mm	●
アクチノロイキン	6.0	6.0	●
ルテオマイシン	11.0	10.5	●
エリスロマイシン	0	0	(-)
カルボマイシン	0	0	(-)
フオロマシジン	0	0	(-)
キサントマイシン	17.5	14.5	●

- : ディスク裏面は黒変, 溶血環は透明, 尙外環の大小は溶血環の大小を意味する。
- : ディスク裏面は黒変, 溶血環は不透明, 尙外環の大小は溶血環の大小を意味する。
- (-) : 溶血せず。

エリスロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジンは全く溶血現象を起さない。ただしキサントマイシンの場合はリングの大きな割に溶血部位の透明度が悪かった。次にペーパークロマトグラフ法によつて、展開風乾したものについて実施した溶血試験の結果は第 4 図に示



第 4 図 ペーパーグラムを用いた溶血試験 (ペトリー皿裏面)

すが、ここでもアクチノマイシン, アクチノロイキン, キサントマイシン, ルテオマイシンは全部溶血現象を認め、エリスロマイシン, カルボマイシン, フオロマシジンには認められなかった。

なお溶血現象を起したすべてのものは沱紙と血液寒天との界面すなわち沱紙の裏面が著しく黒変するのに対して、起さなかつたエリスロマイシン群物質では裏面は血液そのままの赤色を呈するのが目立つた現象であつた。

c. 考察

上記の実験結果のごとく、毒性の少ないエリスロマイシン (LD₅₀¹) 150mg~600mg/kg マウス, 静脈注射) は溶血性少なく、毒性の強いキサントマイシン (LD₅₀^{7,8}) 0.1~0.2mg/kg マウス, 静脈注射) は溶血性強く、予期されたとおり、毒性と溶血性は関連性を示した。溶血性を示す各群抗生物質の溶血環は互に量的のみならず質的に差が見られたことは注目すべきことと考える。すなわち、これらの溶血性物質の溶血作用が全く同一ではなく、毒性の作用点もそれぞれ異なることが考えられ、これらの差が化学構造の差に結びついている可能性を考えれば、それぞれの物質の化学構造の部分的変化に伴う溶血性の変化、ひいては毒性の変化も考えられ、新物質の発見の可能性さらに毒性の面からの実用性の評価をなすることが考えられる点に興味もたれ、抗グラム陽性菌抗生物質を探索するにあたって有意な実験法であると

考えられる。

B. 分離菌株培養液での鑑別法

① 実験方法

材料：当研究室において新たに土壌中より分離した放線菌菌株のうち、既にエリスロマイシン並びにその類似抗生物質を生産するものと同定された菌株 18 株の培養液を使用した。澱粉 1.0g, ブドウ糖 1.0g, 肉エキス 0.75g, 食塩 0.3g, 蒸留水 100ml の割合よりなる培地を滅菌後の pH が 7.0 となるよう調節したのち 120°C, 20 分加圧滅菌を行い、その培地 150ml を含む 500ml 容量の振盪培養フラスコにグリセリンツアベック寒天斜面上に発育せしめた上記菌株を白金耳接種後 27~29°C で振幅 8cm 振盪回数 120/分の往復振盪培養機で培養した。培養第 4 日 (96 時間後) 及び 5 日 (120 時間後) の培養液をそれぞれ約 2ml ずつ無菌的に取りだし *M. pyog. var. aureus* 209P および *B. subtilis* PCI 219 による円筒平板法で生産量を定量し最高生産に達した培養液の汚液を実験に供した。

方法：培養液を基礎実験に行つた手法を用い 0.2% 塩化アンモン溶液, 10% アセトン水の両展開溶剤を用いて、ペーパークロマトグラフ法を実施した。このときスポット量は培養液の力価に応じて、抗菌像を得るためには 3~10 滴 (約 0.03~0.1ml), 呈色試験, 溶血試験に用いるためには 10~30 滴 (約 0.1~0.3ml) とした。

一種類の培養液について 0.2% 塩化アンモン溶液の場合と, 10% アセトン水の場合と各 3 枚ずつ展開風乾し, 一つは抗菌像をしらべ, 次は呈色試験を他の一つは溶血試験を実施した。

② 実験結果

第 4 表に見られるごとく, 18 株について, 新迅速簡易鑑別の実験を試みた。すべての菌株は表中の阻止環直径から推定されるごとくそれぞれ 30~100γ/ml の生産を示した。No. 1, 2 は当研究室において既にアクチノマイシンを生産することが抽出精製によつて確認されたものであるが, そのペーパークロマトグラフ法による抗菌像は 0.2% 塩化アンモン溶液では Rf 0.03, 10% アセトン水では 0.08~0.11 であり, 溶血像はアクチノマイシン・アクチノロイキン型で, 呈色試験では 1N 苛性ソーダではそれぞれ淡い紫色を示し, 1% 塩化第二鉄では No. 2 は呈色せず No. 1 の菌株のみわずかに黄褐色を帯びてそれぞれ陰性と見なされ AM 群に属するものとして鑑別された。すなわち抽出精製行程なしにアクチノマイシンの生産が鑑別されたことになる。No. 3~No. 8 はアクチノロイキン生産株であるが, ペーパーの Rf 値は 0.2% 塩化アンモン溶液では Rf 0.01~0.03, 10% アセトン水では 0.08~0.10, 呈色試験では 1N 苛性ソーダに呈色せず, 1% 塩化第二鉄に若干色の濃淡はあつたがすべて褐赤色に呈色し, 溶血試験はアクチノマイシン, アクチノロイキ

第 4 表 既知菌株培養液を用いた迅速簡易鑑別

No.	菌株番号	生産抗生物質	培養液の阻止環直径 <i>M. pyog. var. aureus</i> 209-P	ペーパークロマトグラム Rf 値		呈色試験		溶血像	新鑑別法による判定
				0.2% 塩化アンモン	10% アセトン水	1N 苛性ソーダ	1% 塩化第二鉄		
1	1829-Z2	アクチノマイシン	21.5	0.03	0.08	+	±	●	AM群
2	1859-N1	〃	20.0	0.03	0.11*	±	-	●	AM〃
3	1654-Z1	アクチノロイキン	18.5	0.01	0.10	-	+	●	AL〃
4	A 63-Y2	〃	18.0	0.01	0.08	-	+	●	AL〃
5	A162-Z1	〃	18.0	0.02	0.09	-	+	●	AL〃
6	A182-P1	〃	17.5	0.03	0.08	-	+	●	AL〃
7	A183-Z1	〃	17.5	0.03	0.10	-	+	●	AL〃
8	A186-P3	〃	17.5	0.03	0.08	-	+	●	AL〃
9	1754-Z3	エリスロマイシン	20.0	0.57	0.42	-	-	(-)	E〃
10	A 98-P1	〃	17.5	0.56	0.45	-	-	(-)	E〃
11	A361-Y2	〃	18.5	0.54	0.44	-	-	(-)	E〃
12	1934-P2	ルテオマイシン	19.5	0.50	0.12	+	+	●	L
13	1270-C3	キサントマイシン	21.0	0.90*	0.88	+	-	●	X群
14	A 79-Y5	〃	14.5	0.89*	0.86*	+	-	●	X〃
15	M 4586	〃	17.5	0.91*	0.86*	+	-	●	X〃
16	1732-P4	キサントマイシン様物質	29.5	0.89	0.85*	+	-	●	X〃
17	A230-Y1	〃	26.0	0.90	0.85*	+	-	●	X〃
18	M4573	〃	23.0	0.89	0.88	+	-	●	X〃

* : Tailing のはげしいもの。

ン型でただ No. 6 だけが溶血不鮮明であつた。この群も判定は全く一致し A L 型であつた。次に No. 9~11 は E 群物質生産株 No. 12 はルテオマイシン生産株であるが、この抗菌試験、呈色試験、溶血試験によるペーパーステムの判定はそれぞれ E 群、L 群とするに満足な結果を与えていた。No. 13~18 は X 群物質生産株でそのうち 3 株はキサントマイシン、次の 3 株はキサントマイシン様物質生産株であるが、このペーパーステムは 0.2% 塩化アンモン溶液、10% アセトン水ともかなりの Tailing が認められすべて Rf は 0.85~0.91 で X 群の特徴を示し呈色試験、溶血試験は問題なく X 群に属し、これも判定が満足に行われた。以上の結果よりすれば新鑑別法が有意であることが判明したといえるであろう。

④ 考察

培養液中の夾雑物による鑑別試験の妨害はほとんど見られないがアクチノマイシン生産菌 No. 1 の培養液の場合に見るごとく、アクチノマイシン自身は 1% 塩化第二鉄によつて呈色しないにもかかわらず、スポットがわずかに黄褐色を帯びることは、培養液中のアクチノマイシン以外の物質によるものと考えられるが、塩化第二鉄反応は、この反応陽性の多くの物質について通常褐赤色~褐紫色を呈し、黄褐色とは明らかに区別できる程度に赤紫色調を帯びる。したがつて No. 1 株の黄褐色調は塩化第二鉄反応陰性と見なされるべきである。さらにキサントマイシン生産株の培養液ではキサントマイシン単一溶液の場合と異なり、培地中の夾雑物による影響で抗菌像がしばしば Tailing することが注目される。キサントマイシンのこの Tailing 多き傾向は、この供試抗生物質中キサントマイシンに限るので、キサントマイシンの一つの特徴ではあるが、他面 Rf 値の判定に困難をきたす原因ともなり、キサントマイシンおよびキサントマイシン様物質（キサントマイシンと紫外部吸収曲線がわずかに異なる）の区別は不可能である。著者の採用したその他の鑑別法（呈色、溶血）によつてもキサントマイシンおよびキサントマイシン様物質の鑑別はできず、同様にその他の抗生物質群についても、ごく近似の物質を互に区別することは困難である。しかし、抗生物質探索の初段階のスクリーニングとしては、精密ではあるが複雑で日数を要する鑑別法よりむしろ簡便な方法で早期の群別が要求されるので、その意味でこの鑑別法は有意に利用されるべきである。次に、もし生産菌が培養液中に 2 種以上の抗生物質を生産し、それらが互に同じ抗菌像とペーパーステムの Rf 値、呈色反応、溶血性を示すものである場合は鑑別は不可能になる。しかし一菌株が同時に抗細菌性物質と抗カビ性物質を生産することはしばしば報告されているが、各種の細菌あるいはカビに対し同じ抗菌像を示す物質が 2 種以上同時に生産されることはごくまれでありもし抗菌像が近似でもペーパーステムの

Rf、呈色反応、溶血反応においては異なるものである。たとえば著者の鑑別法によつてアクチノマイシン群と判別されるが、アクチノマイシン B であるか、C あるいは D であるかは鑑別できず各々の抽出精製にまたねばならないが、アクチノマイシン群物質とエリスロマイシン群物質あるいはキサントマイシン群物質が同時に生産された前例はなく、またもしあつたとしてもアクチノマイシンと他の物質は著者の鑑別法で簡易に区別できる。

著者の試みた溶血性試験は A 項溶血性試験考察に述べたごとく、類似抗生物質の鑑別に利用しようと同時に、溶血度から毒性を推定し、物質の実用性を評価しうる可能性があるが、ペーパーディスクに供試液を浸す溶血試験単独では若し培地中に抗生物質以外の溶血性物質が存在する場合は考えれば必ずペーパーステムによる 2 物質分別の手段を必要とする。すなわち抗グラム陽性抗生物質の各群の鑑別にはペーパーステム、呈色反応が必要な鑑別法であり、ペーパーステムには 0.2% 塩化アンモン、10% アセトン水が最も簡便な展開溶剤系であり、呈色反応には 1 N 苛性ソーダ反応、1% 塩化第二鉄反応が最も有効な鑑別反応であることが判明し、溶血性試験は鑑別に補助あるいは確認手段として利用されると同時にこの種抗生物質の毒性が推定できる優点が強調される。

総括及び結語

グラム陽性菌に有効な新抗生物質の探索は現在重要な問題の一つであるがそのスクリーニングに際してしばしば遭遇し、鑑別困難な物質にアクチノマイシン、アクチノロイキン、ルテオマイシン、エリスロマイシン、キサントマイシンとその近縁物質がある。これらを早期に、できれば生産菌の培養液のうち鑑別することが必要である。ここにその最も迅速簡便な鑑別法を研究し新方法を確立した。

この新方法によれば各群の抗生物質は抽出、精製の手段を施すことなく直接生産菌の培養液をペーパークロマトグラフ法で展開しそれぞれ抗菌像、呈色像、溶血像を描かせその三者を組合せることによりその物質を鑑別する。

1) 展開溶剤には 0.2% 塩化アンモン及び 10% アセトン水を併用しその抗菌像による鑑別が最も有効な手段であることを明らかにした。ただしこの方法ではアクチノマイシンとアクチノロイキンは近似の Rf 値を示し判別不能であつた。

2) 呈色試薬としては 1 N 苛性ソーダ及び 1% 塩化第二鉄が最も有効簡潔でペーパーステムによる呈色像と前記抗菌像との比較でたとえばアクチノマイシンとアクチノロイキンが鑑別できるとく物質の確認とともにさらに詳しい鑑別を可能にした。

3) ペーパークロマトグラフに溶血性試験を実施すると、アクチノマイシン、アクチノロイキン、ルテオマイ

シン及びキサントマイシンは抗菌像の出現する部位に溶血像を認めた。毒性の少ないエリスロマイシンには溶血像は認められなかつた。また溶血像にはそれぞれ特徴が認められ、溶血試験がこれら各群の鑑別の一手段となりうることを明らかにした。

さらに溶血性の強さは毒性の強さに関連することを明らかにし、実用性のある新抗グラム陽性菌物質のスクリーニングに一つの有力な手段を提供した。

抗生物質に関する研究が盛んになるにつれてその分類、鑑別の手法の研究も菌学、理化学、生物学的各分野で行われてきているが、一般にその分野における単なる物質の系統立て、あるいは区別に属する研究が多く、この意味で著者が確立した新方法のごとく実用性ある新抗生物質の探索に役立てることを主旨としたものはみられない。特にその意味で溶血試験と毒性との関連に着目し、鑑別の効果を既知抗生物質のみにとどめず新抗生物質の判別にも応用できるということは意義深いものと考えられる。

本研究に際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) **McGuire, J.M. et al.** : Antibiotics, **2** 281

- (1952)
- 2) **Tanner, F.W. Jr. et al.** : Antibiotics, **2** 441 (1952)
- 3) **Corbaz, R. et al.** : Helvet. Chim. Acta, **39** 304 (1956)
- 4) **Donin, M.N. et al.** : "Antibiotics Annual, 1953-54" Medical Encyclopedia, Inc. New York (1954) p. 179
- 5) **Waksman, S.A. et al.** : J. Biol. Chem., **142** 519 (1942)
- 6) **Ueda, M. et al.** : J. Antibiotics Ser. A, Tokyo, **7** 125 (1954)
- 7) **Thorne, C.B. et al.** : J. Biol. Chem., **176** 413 (1948)
- 8) **Mold, J.D. et al.** : J. Am. Chem. Soc., **72** 1847 (1950)
- 9) **Hata, T. et al.** : J. Antibiotics Tokyo, **3** 313 (1950)
- 10) **厚生省編集** : 抗菌性物質製剤基準 昭28 B 3 頁 C 4 頁
- 11) **Ishida, N. et al.** : J. Antibiotics Tokyo, **4** 505 (1951)