

# 抗生物質產生放線状菌の研究 第2報

## F 1001 號株の培養及びその抗生物質に就いて

### Studies on the Antibiotic Producing Actinomycetes II On the Identification, Culture Condition and Antibiotic Substance of F 1001 Strain

大槻 虎 男 (Torao Ohtsuki)

今井百里江子 (Morieko Imai)

Botanical Laboratory, Faculty of Science  
Ochanomizu University

(Received April 30, 1952)

#### Resume

Among numerous *Streptomyces*-strains isolated from soils, F 1001, so-called in our laboratory, exhibited the widest inhibition zone against pathogenic bacteria in the course of our screening-tests. The fact suggests that this strain has an ability to produce the antibiotic in a large amount. Spirals are formed at the ends of hyphae only on the agar-media extremely poor in nutrients. The hyphae excrete brown pigments that diffuse into the media, when a protein component such as meat extract or peptone is added. From this the strain seems to be of Chromogenus type. Judging from several taxonomic characteristics, we have identified it as one strain of *Streptomyces aureus* (Waksman and Curtius) group.

Cultivation of the strain on 6 kinds of media of different compositions showed the glucose bouillon medium, rendered semicollodial by adding 0.25% agar, as most suitable for the production of antibiotics. Optimum pH of the broth for growth as well as for potency is 7.0, and optimum temperature for growth is 24°C, while that for potency is 30°C. Broth filtrates inhibit the growth of *Staph. aureus* in about 20,000,000 dilution, *Escher. coli* in about 200,000 dilution.

Next we tried to extract active substances out of broth by the usual method and have got a white powder with pale yellowish brown tincture. As a solvent for elution of active substances from charcoal, methanol acidified by hydrochloric acid (pH 2) is excellent, and methanol acidified by sulfuric acid (same pH) falls behind. The powder gives brown colored Sakaguchi-reaction, and forms crystalline reineckate as well as helianthate. It is able to inhibit the growth of all the three groups of pathogenic bacteria i. e., Gram positive, Gram negative and acid-fast bacteria (*Mycobacterium tuberculosis* bovine type). Lytic action

upon bacterial bodies is not so conspicuous. Concerning heat stability, it is indifferent to 3-minute heating at 100°C, while the potency decreases considerably by 5-minute heating at 100°C.

我々の研究室では 1944 年以降抗生物質を産生する菌類に関する実験を続け、今日に至っている。初期には糸状菌によるもの、主にペニシリン産生に関する実験を行い報告をしたが<sup>(1)</sup>、1946 年以降は放線菌による抗生物質産生に就いて実験を行つた<sup>(2)</sup>。試験菌としてはグラム陽性菌、グラム陰性菌と共に抗酸性菌を供した。初めは冷血動物の結核菌を使用した。後にはこれが人型と甚だしく性質を異にすることから、牛型或は人型結核菌を使用するようになった。

先ず土壤中から放線菌を分離し、その中から上記の諸菌に抗菌性あるものを選出し、その種類を同定し、適当な培養方法を定め、抗生物質の抽出を行つた。人型結核菌に拮抗性を示す F 20 号菌の分離、培養及びその抗生物質に就いては既に報告をした<sup>3)</sup>。続いてここに報告する F 1001 号株は F 20 号株に比して格段に抗菌性が強く、従つて有効成分の抽出も比較的容易である。グラム陽性、グラム陰性及び抗酸性菌に拮抗性を示す。

米国に於いては Streptomycin を初めとして多数の抗生物質が放線菌の培養液中に発見され、その中 Aureomycin<sup>(4)</sup>、Terramycin<sup>(5)</sup>、Chloramphenicol<sup>(6)</sup> 等は人体の細菌病治療に実用されている。我国に於いても梅沢、細谷、相磯、秦、緒方の諸氏により、Aureothricin、Reticulin<sup>(7)</sup>、Flavomycin<sup>(8)</sup>、Luteomycin、Dextromycin 等の Streptomycin 様物質或は Streptothricin 様物質が単離され、試験されつつある。我々が F1001 号菌から得た抗生物質は、後に報告する如く、Streptothricin 様物質群に入る。

**種類の同定** 本菌は土壌から分離し、平板培養で選別培養をするため試験菌に対する阻止輪試験を行つと、類菌中最も幅の広い阻止輪を造つた。合成培地では色素を溶出しないが、肉エキス或はペプトンを添加すると褐色の色素を培地中に溶出するから、Chromogonus type に属する。F 20 号菌より気中菌糸造成は旺んでない、外見粉末状に孢子を生ずる。培地の種類により、又同一培地に長く継代すると、変質し、屢々粘液状となり、孢子造成が悪く、播種用に適しなくなる。既往の文献を調査すると *Streptomyces (Actinomyces) aureus* Waksman and Curtius に類似する。

一般に放線菌の性質は培地組成に左右されることが著しいから、我々は次の諸培地を造つて本菌を培養し、その性質を Waksman 等の記載と比較した<sup>(10)</sup>。第 1 表。

上表から注意すべき点を取り出して説明する。

1. 螺旋の造成は養分に乏しい寒天培地にのみ起る。しかも常に生ずるとは限らない。併し生ずると多数で形態も顕著である。
2. 分生子 (Conidia) は極めて小形、螺旋或は菌糸が切れて 10-20 個位気生菌糸の端に生ずる。菌糸は 0.5-1  $\mu$  の幅で、基生菌糸と気中菌糸とに区別される。初め基生菌糸が培地表層に残り、穿入せず、やがて気中菌糸を出す。菌蓋は薄く、分生子を生ずると粉末をまいた如く見える。
4. 菌蓋の色は初め白色を呈し、段々灰色がかかる。
5. 鶏卵培地には基生菌糸が粘液状に生ずるのみ。気中菌糸は生じない。溶出色素褐色で著明。Waksman の紫色とするのと相違する。

第 1 表

Waksman 等の記載	F. 1001 号株
形態 螺旋 合成寒天培地上に多数, 長さ17-20 $\mu$ —4-5 $\mu$	同左 多数 12-30 $\mu$ —5-6 $\mu$
分生子 合成寒天培地上多数, 球一卵形, 径 0.5-1.4 $\mu$	同左 多数 球一卵楕円形, 径 0.5-1 $\mu$
培養 合成寒天培地 薄, 無色, 拡大性, 穿入性 気菌糸薄, 表面粉状, 灰一白色, 溶出色 素なし	薄, 無色, 拡大性, 浅生, 気菌糸多, 粉末, 白色一灰色, 溶出色素なし
葡萄糖寒天培地 拡大性, 穿入性気菌糸粉 状, 縁辺黄	薄, 無色, 拡大性, 浅生, 気菌糸多, 粉状, 白一牡丹色
鶏卵培地 37°C, 薄, 気中菌糸なし, 溶出 色素集落周辺に紫色	32°C 気中菌糸なし, 粘液状, 溶出色 素淡褐色
じゃがいも切片 生長良好, 白色後灰色, 接触部のみ黒色	生長良好, 白一灰色, 菌糸生ず, 後褐 色素を溶出す
にんじん切片 生長薄, 黒色溶出色素	薄, 気菌糸少, 溶出色素なし,
膠培地 生長良好, クリーム色後褐色, 気 菌糸なし, 時に白色のつき布を生ず, 溶 出色素褐色, 膠液化 +	生長良好, 気菌糸直ちに沈下す, 溶出 色素褐色, 膠液化 +
硝酸還元 + 蛋白質分解 + 中程度 反応変化 蛋白培地でアルカリ性 澱粉分解 + 良	++ + 同左 + 良

6. にんじん切片上には色素溶出なし。Waksman は黒色と記す。

7. 膠培地上の性質は両者よく一致する。

上記の如く大部分の性質は *Streptomyces aureus* に類似し, 数個の点で相違するが, 我々はこれを *Streptomyces aureus* 群に属するものとする。

**培養** 抗生物質産生が本研究の重要な課題なるゆえ, 抗生物質を多量に産生する液体培地組成を発見しようとした。そのために次の6種類の処方培地を造り, 培養を試みた。

各培地に於ける本菌の発育状況は, 糸状菌に比すると頗る不良であるが, 放線菌としては中等度を示す。好気性で専ら液表に発育し, 液内に沈下すると以後は殆ど大きくなりな。動揺等により孢子或は菌糸体が液中に沈むことは避ける。寒天を少量添加するとこの目的が達せられる。培養容器としては約 500 cc 容の空瓶(アルコール等の)を利用し, これに 130 cc の液体培地を入れ, 綿栓を施し, 殺菌後水平に近く横たえ, 放線菌孢子を接種し, 30°C の温度に保ち, 発育を観察し, 又随時殺菌ピペットで無菌的に約 1 cc の培地を取り出し, 抗菌性を *Staphylococcus aureus* (Terashima-Strain) と *Escherichia coli* の 2 種を試験菌として検定した。発育は第 2 表に見る如く 1, 5, 6, が比較的良好的な発育を示し, 2, 3, 4 は特に不良である。抗菌力検定は接種後 5 日に始まり, 隔日に行い, 28 日に及ぶが, 数字をあげることを省略し, 曲線を以て示すに止める。葡菌発育阻止試験の結果は第 1 図に示す如く, 第 1 培地に於て最も強力で, 300 万倍稀釈阻止の如きは他に余り類例を見ない。他の 5 種の培地ではこれには劣るが, その 20 万倍阻止力と雖も普通の抗生物質の培養単位に比して遜色がない。

1.	千代田肉エキス	1%	2.	葡萄糖	1.5%
	葡萄糖	1%		ペプトン	1%
	ペプトン	0.5%		第2 磷酸カリ	0.5%
	食塩	0.5%		塩化アンモン	0.5%
	寒天	0.25%		グリセリン	1%
	pH 7.0			寒天	0.25%
				pH 7.0	
3.	レンダー肉エキス	1%	4.	硝酸ソーダ	0.3%
	ペプトン	1%		第2 磷酸カリ	0.1%
	食塩	0.5%		塩化カリ	0.5%
	葡萄糖	1%		硫酸マグネシウム	0.05%
	pH 7.0			硫酸鉄	0.001%
				乳糖	1%
				ペプトン	0.5%
				pH 7.0	
5.	澱粉	1%	6.	葡萄糖	1%
	ペプトン	0.5%		ペプトン	0.5%
	第2 磷酸カリ	0.2%		第2 磷酸カリ	0.2%
	食塩	0.2%		食塩	0.2%
	硫酸鉄	0.001%		硫酸鉄	0.001%
	寒天	0.25%		寒天	0.25%
	pH 7.0			pH 7.0	

第2表 (K...発芽, +...菌糸, M...菌糸体)

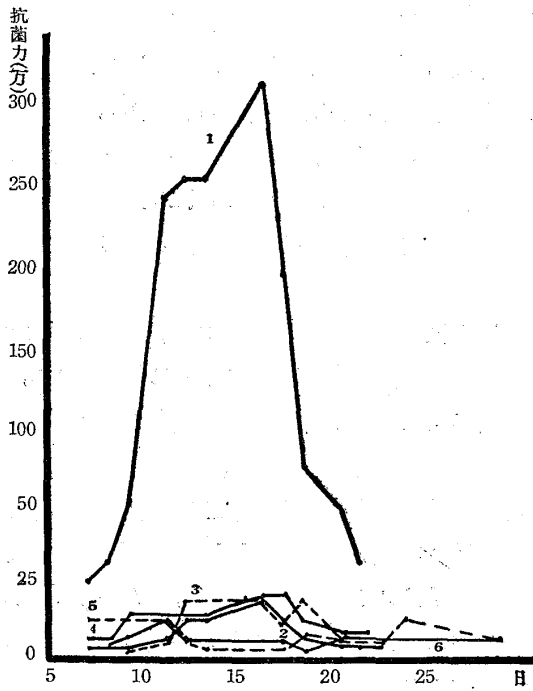
培養日数	1	2	3	4	5	6
4	+	K	+	+	##	##
10	2M	+	##	+	4M	3M
17	4M	##	##	##	4M	5M

大腸菌発育阻止試験結果は第2図に示す。格段に葡菌のそれよりも弱い。最高5000倍位で、同じく第1培地が最適、次が4,3,6,5,2の順で減弱する。

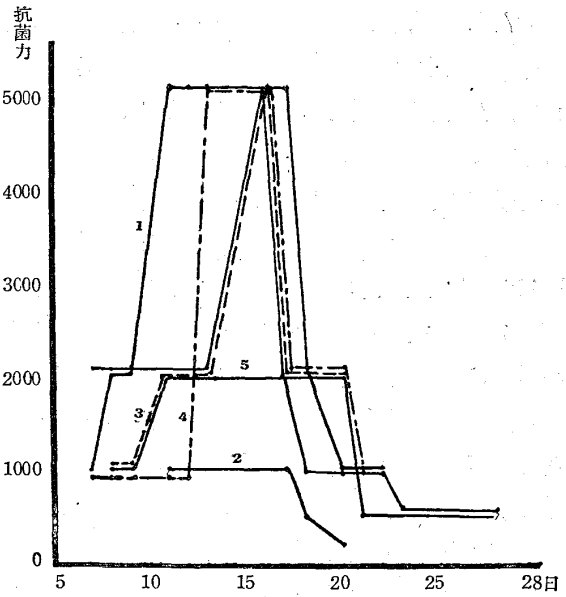
pHは初め6.2, 5.6, 5.6, 6.4, 5.6, 6.2が、22日培養の後夫々7.8, 5.8, 8.0, 6.8, 6.4, 6.2とアルカリ性に変化するものが多い。抗菌価の大なる培地が強くアルカリ性に変じ、それは同時に有機窒素化合物を窒素源として含む培地である。

**培地の起始pHと抗菌力** 培地pHと菌の発育及び抗菌力の関係を詳にするために、次の実験を行う。容器及び培養方法は前述の如し。接種用前培地としては、米粒表面に孢子の生じたものを使用した。

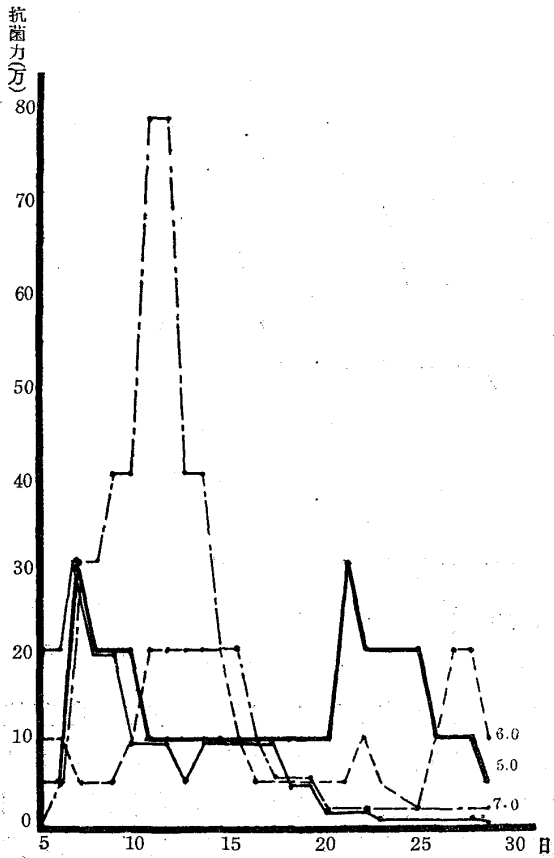
起始pHは4種類、即ちpH5.0, 6.0, 7.0, 8.0とした。発育はpH8.0で最良なることが見られた。葡菌及び大腸菌両試験菌による検定の結果は、第3図及び第4図にグラフとして図示する。



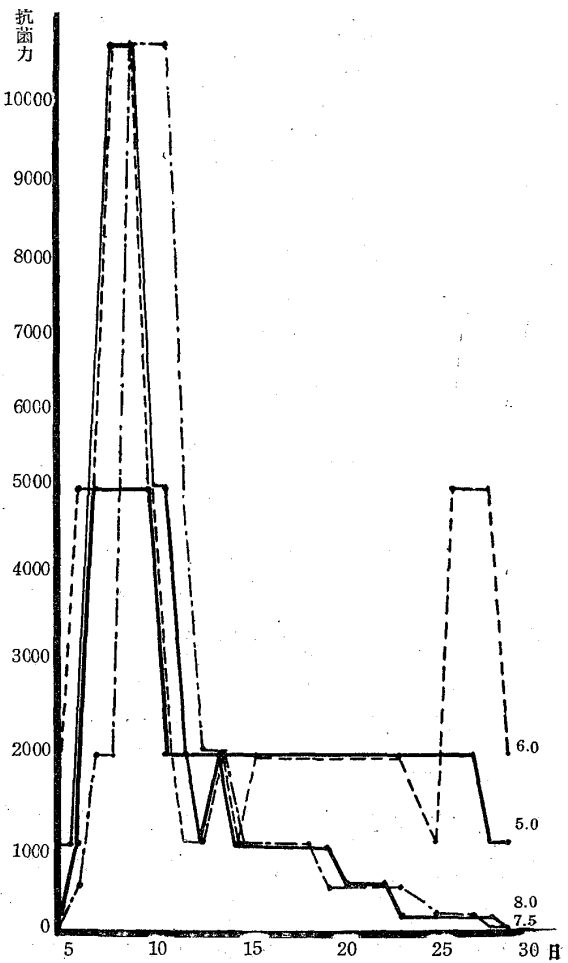
第1圖 各培地に於ける抗菌力(葡萄菌)



第2圖 各培地に於ける抗菌力(大腸菌)



第3圖 起始 pH と抗菌力(葡萄菌)



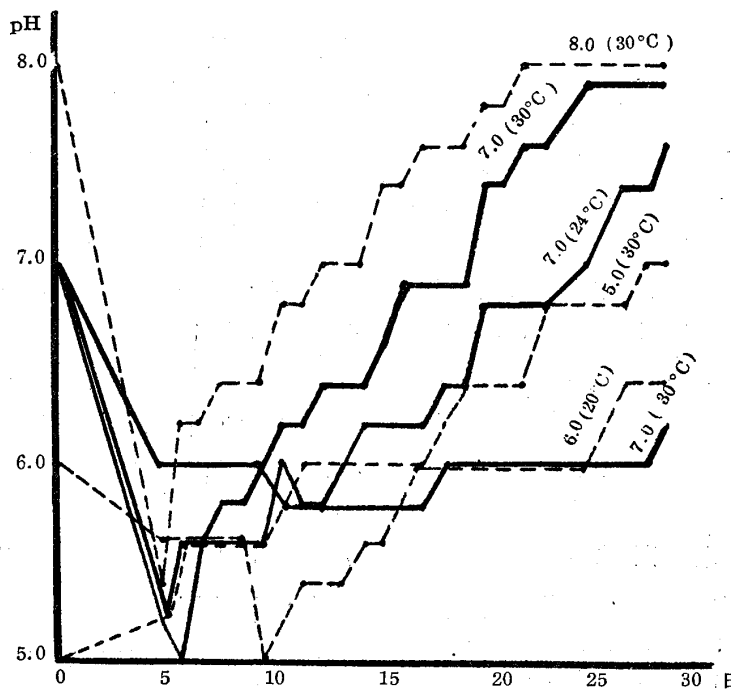
第4圖 起始 pH と抗菌力(大腸菌)

菌発育は pH 8.0 で最もよく、表面一杯に菌蓋を形成し、pH 7.0 では通常の発育を示し、pH 6.0 これに次ぎ、pH 5.0 で最も不良である。気中菌糸形成も pH 8.0 が最良、pH 7.0 が劣り、pH 6.0, 5.0 両者には培養 15 日を経過しても遂に見られない。

葡萄菌に対する抗菌力は、最高を示したのは pH 7.0 の培地で、接種後 12 日-13 日にして 80 万倍を与え、pH 8.0 には 7 日目に 30 万倍を与え、pH 5.0 には最高 30 万倍で、接種後 7 日と 22 日に両頭を示し pH 6.0 には接種後 11 日目と 28 日目に 20 万倍の両頭を示した。

大腸菌に対する抗菌力は、pH 8.0 と pH 7.0 とはほぼ同等の価を示すが、pH 8.0 の培地に於てやや速かに最高 (1 万倍) を出し、pH 7.0 では 1 日遅れて同じ価を示す。pH 6.0 には接種後 6-10 日で抗菌価の頂点を現わし、27-29 日後に同程度の頂点を再び現わし、両頭曲線を示した。

**培養中の pH 変化** 前実験に見る如く、我々は pH 7.0 (起始) に於て抗菌力が最大であることを知った。次に起始 pH が培養中いかに変化するか、抗菌力との関係がどうか、を知るために次の実験を行つた。温度を 3 種として (24°C, 30°C, 37°C), 培地 pH (起始 7.0) の変化を辿り、起始 pH 5.0, 6.0, 8.0 の 3 つの培養は 30°C の場合のみに就いて実験を行つた。結果は第 5 図にグラフを以て示す。



第 5 圖 培地 pH の培養中の變化

pH はすべて一定の変化を見せる。即ち培養初期には pH 値は一様に低下し、接種後 5-10 日頃に最低を示し、後漸次増大してアルカリ性となる。Pen. notatum のペニシリン生産培地中の pH 変化とほぼ一致する。この傾向の曲線を描く原因は、菌体増殖初期は培地中の炭素源の分解が旺んに起り、有機酸の造成が伴い増殖が一定時期に達すると造酸作用停止し、逆に菌体の老衰に伴う蛋白分解反応が増大し、アルカリ性を呈するに至る

にある。37°C に於ける培養にこの変化の著明でないのは、比較的高温のために増殖が速かに起り、造酸と自己消化が近接したためと解せられる。

第3表 培地 pH の変化と抗菌力

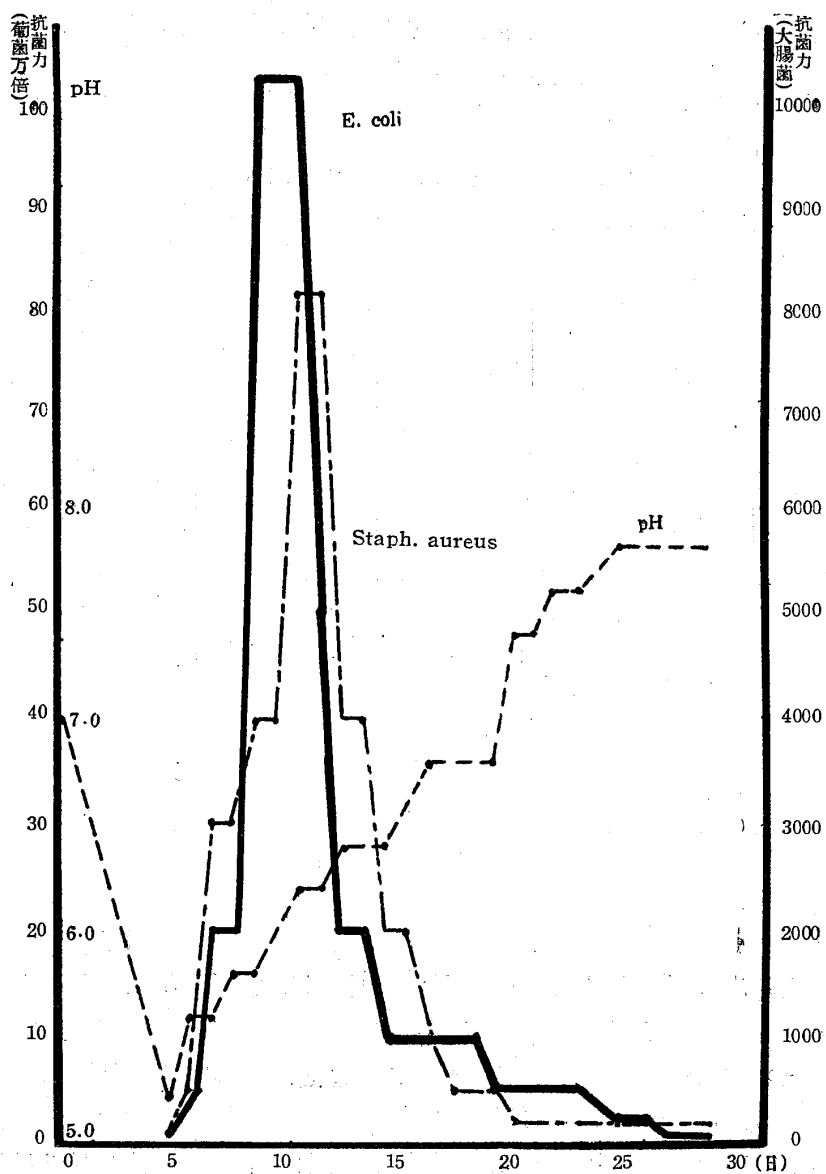
培養温度	24°C			30°C			37°C			30°C			30°C			30°C		
起始 pH	7.0			7.0			7.0			5.0			6.0			8.0		
培養日数	pH	C	S	pH	C	S	pH	C	S	pH	C	S	pH	C	S	pH	C	S
7							6.0	1000	10万	5.6	5000	30万				6.2		30万
8										5.6	5000		5.6	1万		6.4	1万	
9				5.8	1万					5.6	5000		5.0	1万		6.4	1万	
10	5.6	1万		6.0	1万					5.6	5000							
11	6.0	1万	50万	6.2	1万	80万							5.4		20万			
12				6.2		80万							5.4		20万			
13	6.8	1万											5.4		20万			
14													5.4		20万			
15													5.6		20万			

**pH 変化と抗菌価** pH 変化のいかなる時期に抗菌価が最大を示すかを見ると、次の事実が分つた。第3表に見る如く、葡萄菌に対する抗菌性は pH 6.0-6.4 のとき最高を示す。但し pH 5.0, 6.0 のときは pH 5.6 位の時に最高を示し、再び低下し、培養後期に pH 6.0 位になつたとき 2 度目の頂点を示す。大腸菌に対しては、初期に 1 回 pH 5.6-6.4 の際に最高を示すのみである。何れの場合にも最高抗菌価を示す時期は pH が最低に下り切り、再び上昇する途次、pH 6.0 附近に見られる。この事実は抗生物質を抽出するときに重要である。即ち培養 10 日位、pH が 6.0 附近となつたときに培養を打切り、有効成分抽出にかかることとなる。尚 pH 変化と抗菌価の関係を第6図に図示し、概観に便する。

**培養温度と發育及び抗菌価** 本菌の抗生物質産生に最適な温度条件を知るために次の実験を行う。培地及び培養容器等前出の実験に同じ。温度は 24°C, 37°C, 30°C の3種類とする。接種後 5 日に初まり以後毎日抗菌性の検定を、葡萄菌及び大腸菌を試験菌として行う。結果は第7図に図示する。

図より明かに看取されることは、37°C では両試験菌何れに対しても抗菌価最も低く、24°C がこれに次ぎ、發育は最良好であるが抗菌価は 30°C に劣る。30°C にては速かに最高点に達し、而も 24°C より大である。抗菌価の点からすれば、30°C を以て最適としなければならない。

但し發育に対する温度の影響は、必ずしもこれと一致しない。第4表に液体、固体両培地上の發育に対する温度の関係を示す。固体培地上の發育は液体培地上とやや異り、やや高温の方にずれている。即ち 30°C が最良で、37°C がこれに次ぎ、24°C が最も劣る。

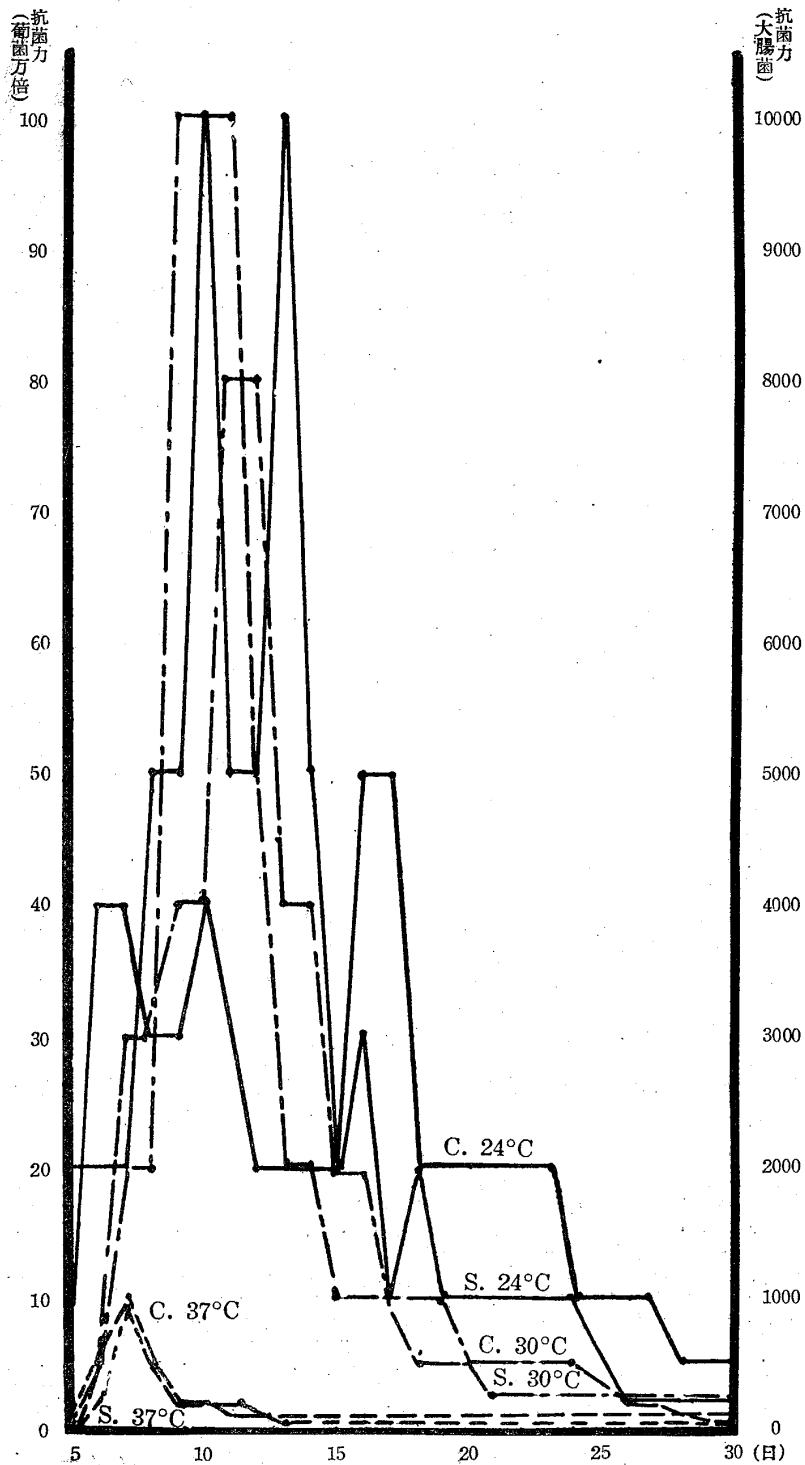


第6圖 培地 pH の變化と抗菌力

第4表 温度と発育

接種 後日数	固 体 培 養						液 体 培 養		
	24°C		30°C		37°C		24°C	30°C	37°C
	ワクスマン 培地	麥芽培地	ワクスマン 培地	麥芽培地	ワクスマン 培地	麥芽培地			
1	K	K	K	K	K	K		K	
3		±	+	±			+	+	K
5	+	+	++	++	+	±	+	++	K
10	+	+	+++	++	++	++	++	++	+
15	++	+	+++	++	++	++	+++	+++	+





第7圖 培養温度と抗菌力

培養濾液の抗菌スペクトル 培地種類は第1培地，起始 pH 7.0，培養日数 13 日 (pH 6.4) の後濾紙濾過し，3 分間湯浴で heat shock を与え，肉汁培地に任意に稀釈し，試験菌 15 種を接種して発育限界濃度を検する。結果は第 5 表に示す。

以上の培養濾液は葡萄菌に対し 20 万倍希釈を以て発育を阻止した場合で，本菌の培養単位としては高い方でないが，各菌に対する抗菌力の割合は知ることが出来る。葡萄菌 (寺島

株) に対する抗菌力との比を第 3 列にかかげた。後出の抽出粉末との比較に資するためである。

第 5 表 培養濾液の抗菌スペクトル

	試 験 菌 種	抗 菌 力	
		稀 釈 倍 数	葡 菌 と の 比
グ ラ ム 陽 性 菌	1. <i>Staph. aureus</i> (寺島株)	200,000	1
	2. „ Heatley	50,000	1/4
	3. „ FDA 209 P		
	4. <i>Staph. albus</i>	300,000	1.5
	5. <i>Mycobac. tuberculosis</i> (蛙型)	500	1/400
	6. <i>Bac. anthracis</i>	10,000	1/20
	7. <i>Bac. mesentericus</i>	5,000	1/40
	8. <i>Bac. Natto</i>	5,000	1/40
	9. <i>Bac. subtilis</i>	5,000	1/40
グ ラ ム 陰 性 菌	10. <i>Escher. coli</i>	5000	1/40
	11. <i>Bac. typhi</i>	5000	1/40
	12. „ <i>paratyphi</i>	5000	1/40
	13. <i>Pseudom. aeruginosa</i>	25	1/800
	14. <i>Bac. prodigiosum</i>	2000	1/100
	15. <i>Proteus vulgaris</i>	500	1/400

抗生物質の抽出及精製 Streptomycin 或は Streptothricin を培地から抽出する際の常法に従う。先ず濾紙濾過し、濾液に 1.5% の割合に活性炭を加え、20 分間器械的に攪拌して吸着を完了する。次に炭末を濾過によつて分ち、炭末に半量の塩酸酸性メタノール (pH 2.0) を加えて 7 時間攪拌する。溶出した母液は炭末と分ち、苛性ソーダを加えて pH 4.0 に修正し、flash evaporator を用いてメタノールを除去する。生じた粘稠性水溶液に 5 倍容のアセトンを添加して生ずる沈澱を乾燥して、帯褐色の白色粉末を得る。斯くして得た粉末には屢々食塩を夾雑する。これを避けるには、メタノールを酸性とするために硫酸を使用し、後の中和に炭酸石灰を使用するのがよい。他の操作は塩酸法と同じ。炭末は武田薬品工業会社の製品を主に使用し、時に丸五其他の製品を供試した。操作途中の単位損失を考慮し、各段階に於ける単位検定を行つた。抽出の数例を次に表示する。

6 表から塩酸法が硫酸法に勝ることが知られる。硫酸法によれば食塩夾雑は免かれるが、単位の損失が甚だしい。炭末は武田製が最良を示す。得られた粉末の抗菌価は区々たる価を示し、或ものは葡菌 1 億稀釈でも阻止し、或ものは葡菌 2 万稀釈阻止に止まる。

上記粗製粉末を元として更に精製を企てた。この目的に粉末の 6 倍量乃至 10 倍量の

塩酸酸性メタノール (pH 2.0) を以て 20 時間振盪しながら放置し、その傾瀉液に更にメタノールの半量のエーテルを加えて沈澱を作り、その傾瀉液には更に等量のエーテルを加えて沈澱を取る (第 1 回メタノール溶出)。この際不溶解の物質には更に塩酸酸性メタノールを前と同量加えて、有効物質の溶出を計り、その傾瀉液に等量のエーテルを加えて沈澱を作る (第 2 回メタノール溶出)。第 2 回溶出後の残渣には、殆ど效力を存しないものと相当に存するものがある。残渣の量は原物質の 37%-50% に及ぶ。第 7 表には粗製粉末精製操作の経過を示す。原粉末の単位は数回の抽出粉末を混合したものゆえ、計算した平均値が記されている。

第 6 表 抽 出 記 録

No.	培養日数	綜合濾液			炭末吸着		溶 出		最終液		粗 製 粉 末				
		pH	抗菌力	cc	製造時間	濾液	溶媒量	時間	cc	抗菌力	アンセット量	重量 g	抗 菌 力		
												C	T	S	
1	39	8.0	<10万	300	武田 30分	100-	150cc	20	42	2万	220	1.31	5万	5万	200万
2	25	8.4	20 "	480	" "	100+	240	18	57	150 "	285	2.45	5 "	5 "	50 "
3	11	6.4	400 "	250	" "	2000-	205	18	18	800 "	90	0.94	1000 "	500 "	1億
4	17	6.6	200 "	430	" "	5000-	215	21	31	600 "	155	5.46	50万	20 "	6000万
5	14	6.2	50 "	500	" "	5万-	250	18	66	600 "	330	0.523	5 "	5 "	100 "
6	18	6.2	100 "	580	" "	10 "-	290	17	10		50	0.154	1 "	1 "	20 "

第 7 表 粉 末 再 精 製 経 過

No.	原 粉 末				第 1 回 メタノール溶出				第 2 回メタノール溶出				残 渣 g		
	総 量 g	抗 菌 力			メ タ ル ノ cc	時 間	エ ー テ ル	沈 澱	エ ー テ ル	沈 澱	メ タ ル ノ	時 間		エ ー テ ル	沈 澱
		C	T	S											
1	2,136	42万	21万	1260万	20	20	10	0.125	10				10	0,160	1,385
2	6,273	77 "	17 "	2500 "	40	20	20	1.55	40	0,094	40	20	40	1,662	3,164
3	9,896	50 "	35 "	6000 "	60	20	30		60		60	20	60	0,614	3,665
4	5,549	10 "	2 "	500 "	30	20	15		30				30	0,285	1,893

この程度の精製粉末には尙 2 種以上の抗生物質の混在が懸念されるが、一応比較的良好に精製された物質に就いて抗菌スペクトルを取つて見た。

この場合も葡菌發育阻止力を 1 として各菌の抗菌力を現わした。その比率を培養濾液のそれと比較すると、甚しい懸隔が認められる。培養濾液に於いては諸種の抗菌性に影響

する因子の存することが推せられる。粉末に保存されるもの以外の因子が葡萄菌以外の菌、例えば大腸菌などの発育を阻止すると推せられる。

第8表 粉末の抗菌スペクトル

	試 験 菌 種	阻 止 力	
		稀 釈 倍 数	寺島株との比
グ ラ ム 陽 性 菌	1. <i>Staph. aureus</i> (寺島株)	8000 0000	1
	2. „ Heatley	3000 0000	3/8
	3. <i>Staph. albus</i>	8000 0000	1
	4. <i>Mycobact. tuberculosis</i> (蛙型)	500 0000	1/16
	5. <i>Bac. anthracis</i>	200 0000	1/40
	6. <i>Bac. mesentericus</i>	200 0000	1/40
	7. „ <i>Natto</i>	50 0000	1/160
	8. „ <i>Subtilis</i>	20 0000	1/400
グ ラ ム 陰 性 菌	9. <i>Escher. coli</i>	100 0000	1/80
	10. <i>Bac. typhi</i>	200 0000	1/40
	11. <i>Bac. paratyphi</i>	1000	1/80000
	12. <i>Pseudom. aeruginosa</i>	1000	1/80000
	13. <i>Bac. prodigiosum</i>	1000 0000	1/8
	14. <i>Proteus vulgaris</i>	500 0000	1/16

本粉末は坂口反応で褐色調を呈する。又結晶状のライネツケート、ヘリアンテートを造る。又ブタノールを展開剤としてペーパークロマトグラフィーを試みると、2つのスポットが現われ、同等の抗菌力を葡萄菌に対して示す。此等の方法による精製は将来に譲る。

又 Streptomycin 抵抗大腸菌, Streptothricin 抵抗大腸菌, 大腸菌, 枯草菌, 脾脱痘菌, 葡萄菌 (寺島株) によるペトリシヤール上の劃線スペクトル試験に於いては、すべてに発阻止力を有し、ただ Streptothricin 抵抗菌に対してのみ弱い阻止力しか示さなかつた。Streptomycin 加培地 (Czapek-Dox に肉エキス 1% 添加したものに 1cc 当り 100  $\gamma$  を加える) に F 1001 号株を接種すると、対照の Streptomycin 無添加培地では 2 日位で発育が認められ、3-4 日では気中菌糸の旺んな造成が認められたのに対し、実験に於いては遂に発育が認められなかつた。これは本菌が Streptomycin 生産株ならざることを示す。

抗酸性菌発育阻止に関しては、蛙型結核菌は試験が簡単で、ほぼ葡萄菌と同様に行うことが出来るのに対し、牛型、人型は発育が極めて緩慢なるため常法に頼ることが出来ない。しかも蛙型と人型とはその性質が著しく異なるから、蛙型に対し有効な物質が人型にも有効と断ずることは危険である。それ故我々は岡、片倉培地に両者を接種し、その間に生ずる拮抗作用を観察する方法を取つた。但し結核菌、放線菌或はその抗生物質を最初から同時に植え或は塗布したのでは、結核菌の発育の顕現には少くとも 2 週間を要する事実から適当でない。従つて試験管内斜面培地に先ず牛型結核菌を接種し、約 20 日間 37°C の定温器に放置し、集落成生の徴候が明かになつたときに斜面中央に放線菌の孢子接種を行い、再び綿栓及び Paraffin 被覆を行つて培養を継続する。3-7 日の後放線菌集落が肉眼的大

さに達し、同時に結核菌集落も肉眼的に明かとなる。そこに現われた拮抗現象から抗生物質の存否を判断する。この方法によつて我々は、F 1001 号株集落周辺に結核菌の発育阻止帯が生じて発育阻止作用の存することを認めた。ただ更に長期 (60 日) に亘つて培養を継続すると、阻止帯が再び消失するのが認められた。これは F 1001 号種の産生する抗生物質に対し抵抗性を獲得した證左である。

岡、片倉培培地に牛型結核菌を接種し、集落発生を見ないうちに 1001 号菌から得た粗製粉末を稀釈して塗布し、37°C に保つた結果は次の如くである。

第 9 表 牛型結核菌発育阻止試験

培養日数	1 万倍稀釈	5 万倍稀釈	10 万倍稀釈	20 万倍稀釈
6	-	-	-	-
7	-	-	+	-
10	+	+	+	-
15	+	+	+	+

又粉末を水に稀釈し試験管に入れ、それに牛型結核菌懸濁液を加え、37°C の孵卵器に保ち、溶菌の有無を肉眼的に对照と比較する。同様の実験は大腸菌、蛙型結核菌、葡菌の 3 試験菌に関しても行われた。对照と比較して透明となつたものを以て溶菌が起つたとした。結果は本抗生物質は発育阻止作用の強大なるに拘らず溶菌作用は微弱で、F 20 号菌より遙かに低度である。大腸菌、葡菌には殆ど起らず、牛型死菌と蛙型生菌とに僅かに認められた。

**耐熱性試験** 有効成分の抽出、粉末の精製の際、加熱がどの程度可能であるかを知るために培養濾液及び粗製粉末の両者に就いて温度の影響を検した。試験菌としては大腸菌、結核菌 (蛙型)、葡菌の 3 者を供した。煮沸湯浴中に 3 分、10 分、30 分、60 分保ち、更に圧力釜中に 15 ポンドで 15 分保つた。結果は第 10 表に示す。

第 10 表 粉末及び濾液の耐熱性試験

粗製粉末	試験細菌	加 熱 時 間					
		0	3 分	10 分	30 分	60 分	15ポンド15分
粗製粉末	C	10000	10000	5000	2500	2500	<2500
	T	5000	5000	2000	2000	<2000	<2000
	S	50000	50000	50000	20000	5000	<1000
培養濾液	C	20000	20000	20000	2000	1000	<100
	T	1000	1000	250	250	250	<100
	S	300000	200000	200000	100000	5000	1000

これから見ると耐熱性は弱い方であるが 100°C 3 分加熱は殆んど効力に無関係である。5 分を超えると効力の低下が現われ初めて来る。

本研究には文部省科学研究費を当てたことを附記する。

#### 文 献

- (1) 大槻虎男及び共同研究者：ペニシリン **1** (1947), 205, **1** (1947), 342, **1** (1947), 348, **1** (1948), 576.
- (2) 大槻虎男・今井百里江子：J. Antibiotics **5** (1952)
- (3) 大槻虎男・熊田久子：J. Antibiotics **5** (1952), 67-71
- (4) Duggar：Ann. N.Y. Acad. Sci. **51** (1948), 177
- (5) Finlay, Hobby et al.：Science **11** (1950), 85
- (6) Ehrlich, Barz et al.：Science **106** (1947), 417
- (7) 細谷, 添田, 小松, 園田：J. Antibiotics **3** (1950), 66
- (8) 相磯, 高木, 柳沢, 新井, 林：J. Antibiotics **3** (1950), 87
- (9) 秦, 樋口, 佐野, 沢近：J. Antibiotics **3** (1950), 313
- (10) S. A. Waksman：Soil Science **8** (1919), 71