糸状菌の發育を選擇的に阻止する抗生物質に就て (豫報)*

小 松 榮 太 郎 (日本化成工業株式会社研究所)

昭和 25 年 8 月 29 日 受 理

On the Antibiotic Substance which Inhibits selctively the Growth of Moulds
By Eitaro KOMATSU (Chemical Research Institute of Nippon Chemical Industries Ltd.)

I. 菌の分離 1948 年 6 月 9 日著者はペニシリン生産菌 Q176 の孢子の發芽率を知ろうとして 6 日前に分散培養法⁽¹⁾を施したシャーレを取上げた。10 枚のシャーレの中には夫々約 30 個の集落が現れていたが、たまたまその中の 1 枚の中の數個の集落が明らかに發育を抑制されて變形し或は異常型を呈しているのに著者は氣づいた。これら異型の集落によつて圍まれたほぼ圓形の空地を仔細に觀察したところ、その中央に漸く認め得る程度の微小の菌絲状のものが存在することを見出した。肉眼によつて辛じて認め得るこの微小な存在が、かゝる顯著な拮抗作用の起し手であるかどうかは疑えたが、著者は試みにこの部分を鉤菌用針でつまみ破砕した寒天培地の小片をツアベック寒天、ブイオン寒天及び麹寒天の斜面上に移植した。ところがツアベック寒天には何の變化も起きなかつたが、ブイオン寒天には 5 日後 2~3mm 直徑の集落が 2 個生じた。これは殆んど無色、濕潤狀の扁平の集落で、菌絲が培地中に喰い込んで殆んど球狀を呈しているのが特徴的であつて、又これとほぼ同様であるがやや白色の集落が數個麹寒天上にも形成された。以上の實驗によつて、著者が先に認めた糸状菌様のものが果して得られた微生物であつたか、又このものが拮抗性を有するか否かは不明であるが、ともかく其處に微生物が存在したことを證明できた。

II. 分離した菌の抗微性の確認 こゝに分離し得た菌が果して Q176 株に拮抗するか否かを確める爲に次の實驗を行つた。麹寒天斜面上に分離し得た菌を麹エキスを接種し 30° に 5 日間培養した。菌は表面に發育することなく液内の下部にもやもやと塊つて藻に似た發育を示し、液は透明であつた。この培養から無菌的に得た濾液を一滴宛夫々ツアベック寒天及び麹寒天斜面上に塗布し、その上に Q176 の孢子を夫々劃線接種した。室溫に 2 日放置後、對照は明らかに特に麹寒天で盛んに發育したが、試験區では殆んど生育の狀態が見られなかつた。

即ちこゝに得られた菌の培養濾液は Q176 の孢子の發芽を抑制する何らかの物質を含むことを示すものである。よつて著者はこの菌をたまたま *Penicillin* 生産株に或は *Penicillium* の 1 株に抵抗したという意味で假に RP 菌と名づけることにした。

III. 他種の糸状菌に對する拮抗性 前項に述べたところと全く同様な方法を用いて RP 菌の培養濾液の下記各種の糸状菌に對する發育阻止作用の有無を檢した。

被檢菌株名. A(Q176 以外の *Penicillin* を產生する *Penicillium*) : 1978B2, 1951B25, PC, 233.

B(*Penicillin* を產生せぬ *Penicillium*) : P463, P1-5, P2-7.

C(*Penicillium* 以外の株) : *Aspergillus* RB1149, *Aspergillus* O8-1, *Mucor* M2, *Rhizopus* R1-4*.

以上の菌株の中 *Penicillium* の全株と RB1149 とが阻止された。但し阻止されなかつた菌と雖も、それは培養濾液によつてであつて、嚴密な試験はこのものゝ含む抗生物質を抽出して行わねばならぬことは勿論である。

IV. 各株の *Aspergillus* 及び *Penicillium* に對する發育阻止の模様 RP 菌の培養濾液を用いる簡単な豫備的實驗によつて *Penicillin* 生産株及び非生産株を含む *Penicillium* 9 株と *Aspergillus* RB1149 の發育が阻止された。後株は Black *Aspergilli* 中所謂黒麹菌に屬するが、*Asp.oryzae* の 1 種である O8-1 は阻止されなかつた。

そこで更に *Aspergillus* 及び *Penicillium* 屬の中から各型の菌株を選んで、それらに對する RP 菌の態度を明らかにすることにした。但し今回は培養濾液を塗抹する方法を取らず、所謂 Streak plate method を用いることにした。即ち麹寒天及びツアベック寒天を各 10cc 宛各別にベトリ皿内で固化させ、その中央に RP 菌を接

* 昭和 25 年 4 月 10 日 日本農藝化學會大會で講演

** これらの記號は東大坂口研究の菌株名簿によるものである。

種して 25° に 4 日間培養後、形成された集落の周囲に各試験菌株の胞子を放射状に劃線接種して 25° に 3 日間培養した後観察し、RP 菌により生育を阻止されたものについては阻止帯の長さを測定した。この結果を第 1 表及び写真 (Fig. 1. a. b. c. d. e) によつて示した。但し Fig. 1. a. b. c. d. は麹寒天, Fig. 1e. はツアベック寒天上の阻止の模様を示した。番號は第 1 表の菌株番號に一致する。なお試みに酒精酵母 1 株を用い、これを最後に加えた。

先ず麹寒天上の阻止像について見るに、*Asp. flavus-oryzae* group に屬する菌株は 1 株も阻止されるものなく、Black *Aspergilli* との著しい相違を示している。後者の中では *Asp. carbonarius* が阻止されず、*A. Usamii* 及び *A. aureus* が僅かに阻止されている。*Penicillia* の中では No. 143 及び No. 71 が阻止されず、No. 198 が僅かに阻止されている。

次にツアベック寒天の場合について見るに、こゝでは各菌株は一般によく阻止され Black *Aspergilli* 8 株中 5 株、*Penicillia* 8 株中 4 株は完全に發育を阻止された。麹寒天上では全く阻止されなかつたものも或る程度阻止を受けている。又この培地による阻止力の相違は、RP 菌の培養濾液を上記 2 種の液體培地で夫々稀釋して一定の試験菌株で效力を検定する際にも明らかに觀取される。

Table 1. Growth-inhibition of Various Strains of *Aspergilli* and *Penicillia* by the Mould RP with the Streak Method (Fig. 1a—1e)

Strain	Inhibition-zone (mm)	
	<i>Koji-agar</i>	<i>Czapek-agar</i>
Black <i>Aspergilli</i>		
1. <i>Asp. carbonarius</i>	perfect growth	9
2. " <i>niger</i> VAN TIEGHEM	21	no growth
3. " <i>Usamii</i>	3.3	10.6
4. " <i>Saitoi</i>	24	no growth
5. " <i>Inuii</i>	25.5	" "
6. " <i>awamori</i>	28.2	" "
7. " <i>aureus</i>	5.2	9.7
8. " <i>awamori</i> M	27.3	no growth
<i>Asp. flavus-oryzae</i> group		
9. <i>Asp. oryzae</i> A	perfect growth	11.4
10. " <i>oryzae</i> var. <i>microsporus</i>	" "	11.9
11. " <i>oryzae</i> var. <i>magnasporus</i>	" "	10.5
12. " <i>oryzae</i> var. <i>globosus</i>	" "	14
13. " <i>sojae</i>	" "	6.2
<i>Penicillia</i>*		
14. No. 198 (<i>P. rugulosum</i> THOM)	3.3	25.5
15. " 143 (<i>P. fasciculata</i>)	perfect growth	2.1
16. " 159(<i>chrysog.</i> group, Bivert. Assym.)	23	30.2
17. " 150 (<i>P. velutina</i>)	24	no growth
18. " 71 (Bivert. Sym?)	perfect growth	5
19. " 14 (<i>Citromyses</i> , Monovert.)	28.2	no growth
20. Q176	28.2	" "
21. Q176 pigmentless saltant	29.2	" "

* *Penicillia* の各株は東大坂口研究室、阿部重雄氏の分類研究中のものである。

RP 菌の集落の模様は、麹寒天上では写真でもわかるように隆起して棘状を呈したが、ツアベック寒天上ではそのようなことはなく、培地上を極めて薄く菌糸が擴がつた。

尚酵母 Rasse XII もよく阻止されている (Fig. 1d の 22)。

V. 培養條件と抗菌力 培地としてツアベック液、麹液 (Bllg. 8°, pH 5.8), 葡萄糖ブイヨン (葡萄糖 1%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%, 食鹽 0.5%) の 3 種を用い、これらを 70cc 宛夫々 400cc 容フラスコに分注して滅菌 (1 kg, 15 min.) し、種として RP 菌を 1 週間、25° で麹液に培養したものを各フラスコ毎 1 cc 宛用いた。

Fig.2a.

Fig.2b.

Fig.2c.

Fig 1a, 1b, 1c, 1d, 1e は本文 IV, Table 1 に,
Fig 2a, 2b, 2c, は本文 VIII に照應する。

これらを 25° で振盪及び静置の 2 方式で培養し 6 日後に各の培養濾液をとつて、Q176 及び *Asp. awamori* M に對する抗菌力を II, III に述べた方法で檢した。その際の培地はツァベック寒天及び麴寒天とした。

先ず培養の状態を見るに、静置の場合は何れの培地でも表面に發育することなく、液體内部の接種した菌絲が沈降した位置に所謂綿絮狀に生育する。培地による繁殖の優劣は明瞭でない。併し振盪培養では肉眼的に著しく形態が異なり、葡萄糖ブイヨンでは美麗な細いベレット狀を呈し、ツァベック液では短かく切れた絲屑狀となり、麴液内ではその中間型ともいふべき棍棒狀を呈した。而して生育の程度は麴液最も良く、葡萄糖ブイヨンは最も劣つた。培地の pH は培養によつて顯著な變化はないが、振盪培養の場合には幾分低下する。

抗菌力は先にも述べたように麴培地よりはツァベック培地でよく現れているが、一般に振盪培養よりも静置培養が、又培地はツァベック液と麴液が強い抗菌力を示している(第 2 表)。

Table 2. Cultural Conditions and Antifungal Activity of the Antagonist RP

Medium	Mode of culture	pH		Antifungal activity after 6 days			
		Initial	After 4 days	for <i>Pen. Q176</i>		for <i>Asp. awamori</i>	
				Czapek-agar	Koji-agar	Czapek-agar	Koji-agar
Czapek-solution	A	5.9	5.7	卅	卅	卅	卅
	B		5.4	+	—	卅	—
Koji-extract	A	5.5	5.5	卅	卅	卅	卅
	B		5.4	卅	—	±	+
Glucose-bouillon	A	6.0	5.9	±	—	±	—
	B		5.4	—	—	±	—

A : stationary culture, B : shaken culture, 卅 : no growth, + : partial growth, ± : scant growth, — : normal growth

この菌は培養液の内部に喜んで繁殖することより、酸素に對する要求量少なく、これを振盪培養して空氣との接觸をはかることは、液の流動による繁殖を多少助長することはあつても、これにより發育形態を異にし、培地の pH を低下せしめて、抗菌價の生成を不利にするものである。又培地はツァベック液のような合成培地で充分抗菌力を發揮し、ツァベック液による稀釋 3000 倍以上を以てしても *Asp. awamori* に尙阻止力を示した。

VI. 酵母に對する阻止作用 IV の項に所謂 Streak plate method に於ける RP 菌の酒精酵母 Rasse XII に對する拮抗作用について言及したが、こゝに同酵母に對する RP 菌の培養濾液の抗菌力を稀釋法によつて檢定しようと試みて次の結果を得た。

RP 菌をツァベック液に 23~25° で 10 日間培養して得た濾液を麴液 (Blig. 8°, pH=6.6) で稀釋し次の系列を得た。×22, ×51, ×231, ×441, ×561, ×1071, ×1331, ×2541, 對照。(×22 は 22 倍の意味)。之等の各に Rasse ×II の培養(麴液, 25°, 1 日)を 1 白金耳量宛接種し 25° に置いて其の後の變化を觀察した。その結果は 1 日後、對照は醱酵, ×441< は液濁濁。2 日後、×441< は醱酵。3 日後、×231 醱酵。4~5 日後、×51 醱酵。6 日後、×22 醱酵。の結果となり、稀釋度の低いところでは非常に遅れるけれども結局繁殖、醱酵を行つた。その醱酵を行うまでの経過を見るに、先ず白色の沈澱物(酵母細胞の集積)が次第に増し、或る量に達すれば液が濁りを帶びて遂に醱酵を始めるようになる。このように酵母の發育が一時停止するが、或る時間の後に回復することは、結局 RP 菌の產生した活性物質が酵母細胞増殖を一時抑制してもこれを死滅せしめる力なく、やがて該物質が自然に崩壊して酵母の發育を可能にするか、或は酵母が之に耐性を獲得するか、或は積極的に分解する力を備えるに至る爲か何れかであろう。

VII. 細菌類に對する作用 RP 菌の培養濾液を稀釋法によつて、*Staphylococcus aureus* (F.D.A. 209-P), *Bacillus subtilis* (NRRL 558), *Escherichia coli* に對する抗菌力を檢したが見られなかつた。

VIII. RP 菌の形態に關する 2.3 の知見

培養的特徴 (Fig. 2 a. b. c.)

1. ツァベック寒天上 (Fig. 2a). 豊富に發育せず、集落を形成する。菌糸は薄く四方に擴がりほぼ圓形の集落となり、中部は白色を呈する。併し氣菌糸を形成せず、半透明の極めて薄い菌苔のこともある。このように表面發育は貧しいが菌糸は深く培地に喰入つて毯狀の集落を形成するのがこの菌の顯著な特徴である。培地と試験管壁の間に發育することもある。集落の裏面に僅かに褐色の色素を出す場合がある。

2. KELLNER-MORTON* の培地(Fig. 2b). 前掲の培地よりもよく表面發育するが、培地に喰込む程度は少ない。褐色の色素をやゝ出し易い。

3. 麹液(Fig. 2c). 表面に發育することなく、液の内部に所謂綿絮狀發育を爲す。併し之を數ヶ月も放置するときは、表面濕潤狀、裏面暗褐色の堅固な厚い菌蓋を形成する。

顯微鏡下の形態

1. 麹液培養の菌糸。ゆるやかにうねり、所々適度に分歧し、隔膜なく、幅 2.4μ の長い菌糸で、先端に長さ約 $2.4\sim 4.2\mu$ の橢圓形を呈したものが見える。又菌糸の内部に中空の部分と、橢圓狀乃至桿狀の明暗部が見える。

2. 麹寒天上培養。培養部を切斷して薄片をつくつて檢鏡したるに、 $1.2\times 1.5\mu$ の Subglobose 乃至 Elliptical の孢子らしきものが少數散見した。これは菌糸の先端に生じるらしく、他に子實體を發見しなかつた。

又同培養では白色の氣菌糸の外に、濕潤狀の棘狀物を形成した。これは檢鏡すれば菌糸の束となつて見える。ツアベック寒天上ではこのような特徴は見られない。

終りに當り坂口教授並びに朝井教授の御指導と同教室の飯塚、阿部、田村の諸氏の御好意を深謝する。又本研究の發表を許可された桑田社長、高橋研究所長に感謝したい。

* *Streptomyces griseus* の sporulation medium として普通用いられる。

(1) 小松：微生物の一新分離法及び其の應用について(第1, 2, 3 報),

日本農藝化學會講演(昭 22, 23 年)。近く農化誌に發表豫定。

Summary

The author has isolated a fungus-like organism (RP) which grew scantily but showed inhibitory action among the colonies of *Penicillium chrysogenum* Q176 on a CZAPEK's agar plate. The culture filtrate of RP, besides Q176, retarded the growth of several strains of *Penicillia* and a strain of black *Aspergilli*, but had not activity against a strain of each species of *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus*, and *Mucor*. Furthermore several type cultures of *Aspergilli* and *Penicillia* were tested for RP by the so-called streak plate method on koji-extract agar. It was found that all strains of *Aspergillus flavus-oryzae* group, only one of the black *Aspergilli*, and two of *Penicillia* were not inhibited. Then classification of *Aspergilli* or *Penicillia* would be possible in view of their behaviors towards RP or its active substance(s). Even the strains considered as insensitive here, however, are also inhibited to a certain extent on CZAPEK's agar by RP. This fact suggests that the active substance(s) produced by RP might inhibit the early stages of the cell-material syntheses by the above organisms from inorganic salts contained in the medium.

RP is willing to grow submerged in synthetic liquid media, such as CZAPEK's one, instead of surface growth, producing antifungal substance(s). Three thousand times dilution of the culture filtrate is not enough to make it inactive against a strain of black *Aspergilli*. The shaken culture have little advantage both on the growth of RP and on the formation of active substance(s). On the synthetic solid media, RP shows scant growth but develops deeply into the agar. RP has long and branching hyphae, of ca. 2.5 microns, having no septa. The masses of hyphae, namely the flocculent colonies, in liquid media, do not submit to lysis for a long time, and the culture broth is clear and not liable to change in reaction. Sporulation has not been definitely recognized.

Against bacteria, that is, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, the culture filtrate of RP is not active.

The isolation of the active substance(s) and the more detailed study are to be reported in the following papers.