放射状菌に関する研究*

ジヒドロストレプトマイシンを生産する *Streptomyces humidus* nov. sp. について

中沢鴻一, 柴田元雄, 田辺一雄, 山本弘一 (財団法人醸酵研究所)

昭和 32 年 9 月 2 日 受理

緒 言

1944 年 Waksman⁽¹⁾ のストレプトマイシン発見について, 1946 年 Peck 等⁽²⁾ はストレプトマイシンを化学的に還元することによってジヒドロストレプトマイシンを得, これが広く結核の臨床に応用されて今日に至っている。

爾来ジヒドロストレプトマイシンはストレプトマイシンを化学的に処理して得られる物質として知られていたが, 微生物の培養によって, その培養液中にジヒドロストレプトマイシンが直接生産されるという事実は未だ知られていない。我々は竹尾結核研究所と協同のもとに抗結核菌物質生産株を追究中に, 1955 年 5 月, 山口県下の土壤中より分離された放射状菌の 1 株, 23572 株がその培養液中に直接ジヒドロストレプトマイシンを生産するという新事実を見出した。23572 株は分類学的には現在迄知られているストレプトマイシン生産株とは明らかに異なる *Streptomyces hygroscopicus* 群に属する 1 新種である事を認め, 本菌株を *Streptomyces humidus* nov. sp. と命名し, その生産物の確認並に動物試験の結果の概要は既に報告⁽³⁾ したところであるが, 本報告に於ては *Streptomyces humidus* の菌学的性質及びその抗菌性について述べる。

菌学的性質 23572 株は 1955 年 5 月, 山口県岐波の土壤中より分離されたもので菌株の分類学的特徴としては, グルコース, アスパラギン寒天斜面上に分離培養後数日にして気菌糸の表面が湿ってきて, 外観上黒色を呈するという特異的性質を示し, 明らかに *Streptomyces hygroscopicus* 群に属する菌株であることを認めた。

23572 株の各種培養基上に於ける性質は次の通りである。

気菌糸: 螺旋形 0.8~1.2 μ

分生子: 卵形, 1~1.5×1.5~2.0 μ

ツアベック寒天:

基生菌糸 無色

気菌糸 白色

グルコース, アスパラギン寒天:

基生菌糸 無色, 裏面 Cream-Buff (Rdg. XXX, 19''-d)⁺ 或は Cartridge Buff (Rdg. XXX, 19''-f) 後に Chamois (Rdg. XXX, 19''-b)

気菌糸 白色→Smoke gray (Rdg. XLVI, 21'''-d) 或は Vinaceous Buff (Rdg. XL, 17'''-d)

培養数日後, 気菌糸は湿りを帯び出しそれが全表面に拡がり外観上異色を呈するに至る。

澱粉寒天:

基生菌糸 無色, 裏面 Cream Buff (Rdg. XXX, 19''-d)

気菌糸 白色→Pale smoke gray (Rdg. XLVI, 21'''-f)

林綺酸カルシウム寒天:

基生菌糸 無色, 後に Buff Yellow (Rdg. IV, 19-d) となる。

気菌糸 発育わずか, 白色

グリセリン, ナイトレート寒天:

基生菌糸 無色

気菌糸 発育わずか, 白色

デキストロース, ナイトレート寒天:

基生菌糸 無色

気菌糸 発育わずか, 白色

肉汁寒天:

基生菌糸 発育良好, 無色

気菌糸 無し

葡萄糖加肉汁寒天:

基生菌糸 発育良好, 無色

気菌糸 白色

ゼラチン: 液化しないか或は弱し, 然し肉汁ゼラチンでは中等度

馬鈴薯切片:

基生菌糸 無色

気菌糸 白色→Smoke gray (Rdg. XLVI, 21'''-d)

湿った黒色の斑点が観察される。可溶性色素なし。

人参切片:

基生菌糸 無色

気菌糸 白色→Smoke gray (Rdg. XLVI, 21'''

* Studies on Streptomyces. *Streptomyces humidus* nov. sp., the Source of Dihydrostreptomycin. By Kôiti NAKAZAWA, Motoo SHIBATA, Kazuo TANABE and Hiroichi YAMAMOTO (Institute for Fermentation, Osaka)

-d)

湿った黒色の斑点が観察される, 可溶性色素なし.

酵母エキスを寒天:

基生菌糸 無色, 裏面 Chamois (Rdg. XXX, 19''-b)

気菌糸 白色→Light drab (Rdg. XLVI, 17'''-b)

一部湿って黒色となる.

全卵培地:

基生菌糸 無色

気菌糸 白色

牛乳: 表面に無色の発育を示し, 気菌糸は白色. ペプトン化緩徐, 可溶性色素生産せず.

葡萄糖加肉汁: 表面に無色の発育を示し, 気菌糸は白色.

グリセリン, アスパラギネート寒天:

基生菌糸 無色

気菌糸 白色→Smoke gray (Rdg. XLVI, 21'''-d)

硝酸塩ペプトン水: 硝酸塩を還元する.

澱粉分解力: わずか.

+ Ridgway: Color standards and Color nomenclature.

糖の利用度については Pridham 等⁽⁴⁾の方法に従い次表の結果を得た.

キシロース	卅	イヌリン	一	アラビノース	卅
マンニトール	卅	ラムノース	卅	ソルビトール	一
フラクトース	卅	ズルニトール	一	ガラクトース	卅
イノシトール	一	シュクロース	一	ザリシン	卅
マルトース	卅	ナトリウムアセテート	一	ラクトース	卅
クエンサンソーダ	土	ラフィノース	一	コハクサンソーダ	一
対照	一				

一: 発育せず, 土: 発育緩弱, +: わずかに発育, 卅: 発育良好, 卅: 発育良好

本菌株と Bergey 記載の *Streptomyces hygroscopicus* とは肉汁寒天, グルコース, アスパラギン寒天, 馬鈴薯等に於て基生菌糸並に気菌糸の色, 可溶性色素の有無及び硝酸塩還元, 糖の利用度等を異にし, 又 *Streptomyces hygroscopicus* の生産する抗生物質として報告されている. Hygroscopin⁽⁶⁾, Hygromycin⁽⁶⁾, Carbornycin⁽⁷⁾, Angustmycin⁽⁸⁾等とは明らかに異なるジヒドロストレプトマイシンを生産するので *Streptomyces hygroscopicus* 群の中の 1 新種と認め *Streptomyces humidus* nov. sp. と命名した.

抗菌性 23572 株を常法により, ブイヨン寒天, グリセリンブイヨン寒天に割線培養して生菌抗菌像と, 又ブイヨン寒天上の割線培養から agar-disc を作り, pH 6.0, pH 8.0 の *B. subtilis*, *Mycobacterium* 607 の寒天平板で pH による抗菌力 (阻止円) の変化を調べた. 結果は第 1 表, 第 2 表の様に, 本菌抗生物質はグラム陽性菌, グラム陰性菌, 抗酸性菌に広く抗菌力を示すが, ストレプトマイシン耐性鳥型結核菌を全く抑制せず且又塩基性側で抗菌力が大きく, 生理的塩基性物質であろうと考えられる.

従来グラム陰陽両性菌, 抗酸性菌に有効な塩基性物質としては, ハイドロオキシストレプトマイシン, ストレプトマイシン, ネオマイシン, ストレプトスライシン群物質等が知られている. 之等の物質を生産する菌株と本菌との相互阻止像をみると, 第 3 表の様に即ちストレプトマイシン生産株 X-28 株以外を良く抑制した.

グラム陰陽両性菌, 抗酸性菌を抑制しストレプトマイシン耐性菌に無効な生理的塩基性物質で, 又相互阻止像に於いてもストレプトマイシン生産株を抑制しないことは, 本菌の抗生物質がストレプトマイシンか或は之と極

第 1 表 生菌抗菌像

被験菌	抑制帯 (mm)				
	ブイヨン		グリセリン ブイヨン		
<i>E. coli</i>	25	24	24	8	9
<i>P. vulgaris</i>	23	21	22	5	6
<i>B. subtilis</i>	31	31	32	13	15
<i>M. aureus</i>	26	26	26	6	7
<i>B. cereus</i>	24	24	22	4	5
<i>Ps. aeruginosa</i>	10	11	13		
<i>S. marcescens</i>	28	29	30		
<i>M. flavus</i>	17	18	19		
<i>Mycobact. 607</i>				14	15
<i>Mycobact. avium</i>				11	13
<i>Mycobact. avium</i> (S.M.-resistant)				0	0

第 2 表 pH による抗菌力の変化

<i>B. subtilis</i>			<i>Mycobact. 607</i>	
pH 6.0	pH 8.0		pH 6.0	pH 8.0
24, 24.5	27, 26 (mm)		33	40 (mm)
24, 24.5	26, 26.5		29	38
26.5, 26	28, 28		30	38

第 3 表 相互阻止像				
16087 ハイドロオキ シストレプト マイシン	X-28 ストレ プトマ イシン	2252 ネオマ イシン	700 ストレ プトス ライ シン	138-A ストレ プトス ライ シン
23	0	23	21	10 (mm)
25	0	25	22	13
24	0	24	23	14

第 4 表 ストレプトマイシン其他との比較

	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
23572	10	5	5	1(γ/cc)	
23572+システイン	10	10	5	1	
X-28	>100	>100	50	10	
X-28+システイン	>100	>100	>100	>100	
ストレプトマイシン	ハイドロオキシストレプトマイシン	ジヒドロストレプトマイシン	23572	ストレプトスライシン	ネオマイシン
坂口反応	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
マルトール反応	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
23572	>0.1	0.05 (γ/cc)
ストレプトマイシン (S. M.)	>0.1	0.05
ジヒドロストレプトマイシン (D. S. M.)	>0.1	0.05
セミカルバチド	>20	20
23572+セミカルバチド	0.2	0.5
S. M.+セミカルバチド	>0.2	>0.2
D. S. M.+セミカルバチド	0.2	0.05

	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
ストレプトマイシン	10	5	5 (γ/cc)
ジヒドロストレプトマイシン	50	5	5
23572	50	5	5

めて近縁の物質であろうと想像された。この為ストレプトマイシンの特異性として知られる諸性質を検討した。即ち抗菌力の Cystein による不活性化、カルボニール試薬⁽⁹⁾による抗菌力の低下、チフス菌に対する抗菌力⁽¹⁰⁾を調べ、又坂口反応マルトール反応を上記の諸塩基性抗生物質と比較した。結果は第 4 表の様に本菌の培養液抗菌力は Cystein を 1 mg/cc になるよう添加しても不活化せず、本菌の粗抗生物質の坂口反応は典型的なストレプトマイシンの色調を呈し、ストレプトスライシン群物質の呈色と異なる。又マルトール反応陰性で、ストレプトマイシン、ネオマイシン、ハイ

ドオキシストレプトマイシン、ストレプトスライシンとは異なる事が明らかになった。

更に本菌抗生物質の精製粉末について、セミカルバチド、チフス菌に対する態度を市販ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシンと比較した所、ジヒドロストレプトマイシンと同様の結果を得た。なお第 4 表、第 5 表中の抗菌力は寒天稀釈法による最小阻止量を以て示した。

其後三宅等により本抗生物質の硫酸塩結晶が得られ、理化学的にジヒドロストレプトマイシンであることが確認されたが、この硫酸塩結晶の抗菌力を市販ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシンと比較した結果、抗菌力の点でもジヒドロストレプトマイシンと確認された。

第 5 表 抗 菌 ス ペ ク ト ル

	ストレプトマイシン	ジヒドロストレプトマイシン	23572		ストレプトマイシン	ジヒドロストレプトマイシン	23572
<i>P. vulgaris</i>	5	5	5	<i>M. flavus</i>	5	2	2
<i>E. coli</i>	5	5	5	<i>S. typhi</i>	10	50	50
<i>M. aureus</i>	1	1	1	<i>Mycobact. 607</i>	1	1	1
<i>B. subtilis</i>	0.5~0.2	0.5~0.2	0.5~0.2	<i>Mycobact. avium</i>	1	1	1
<i>B. cereus</i>	2~1	2~1	2~1	<i>Mycobact. avium</i> (S. M.-resistant)	>100	>100	>100
<i>S. marcescens</i>	2	2	2	<i>P. notatum</i>	>100	>100	>100
<i>Ps. aeruginosa</i>	10	10	10	<i>Asp. niger</i>	>100	>100	>100
<i>M. flavus</i>	2	1	1	<i>Ca. albicans</i>	>100	>100	>100
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	0.5	0.5	0.5	<i>Sacch. cerevisiae</i>	>100	>100	>100

要 約

23572 株の菌学的性質を調べ、本菌株が *Streptomyces hygroscopicus* 群の中の 1 新種であることを認め、*Streptomyces humidus* nov. sp. と命名した。又本菌抗生物質の諸性質を諸塩基性抗生物質と比較検討して、ジヒドロストレプトマイシン近縁物質であろうと推定した。其後得られた硫酸結晶は市販ジヒドロストレプトマイシンと同様の抗菌力を示し、別報⁽¹¹⁾の理化学的性質と相俟って、抗菌力の点からもジヒドロストレプトマイシンなることが確認された。

終りに終始御指導を賜った酸酵研究所長佐藤喜吉博士に感謝すると共に、振盪培養機の使用を許可された本研究遂行に多大の便宜を与えられた神崎川織田工場長、藤原課長に深謝する。又本菌株の分離された土壌を採取さ

れた広島出張所植松渉氏に深甚の謝意を表する。尚スクリーニングに協力された竹尾結核研究所武田研究所第2部第5研究室の方々に感謝する。又終始実験に協力された徳井安雄, 東進, 藤井健次郎, 和田和男, 札軒富子, 佐別当幸子, 藤原慶子の諸氏に謝意を表する。

(1) A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman :
<i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 55, 66(1944).	Mekee : <i>Antibiotics & Chemotherapy</i> , 3,
899 (1953).
(2) R. L. Peck, C. E. Hoffhine, K. Folkers :
<i>J. Amer. Chem. Soc.</i> , 68, 1390 (1946).	(8) H. Yünsten, H. Yonehara, H. Ui : <i>J.</i>
<i>antibiotics</i> (A) VII, 113 (1954).
(3) A. Imamura, M. Hori, K. Nakazawa, M.
Shibata, S. Tatsuoka, A. Miyake : <i>Proc.</i>
<i>Japan Acad.</i> , 32, 648 (1956).	(9) Q. R. Bartz, J. Controulis, H. M. Crooks,
M. C. Rebstock : <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> ,
68, 2163 (1946).
(4) T. G. Pridham, D. Gottlieb : <i>J. Bact.</i> ,
56, 107 (1948).	(10) S. A. Waksman : "Streptomycin" The
Williams & Wilkins Co. Baltimore (1949).
(5) 中沢鴻一, 隠岐金藏等 : 本誌, 28, 296(1954).	(11) S. Tatsuoka, T. Kusaka, A. Miyake, M.
Inoue, H. Hitomi, Y. Shiraishi, H. Iwasaki,
M. Imanishi : <i>Pharm. Bull.</i> , 5, 343(1957).
(6) R. C. Pittenger, R. N. Wolfe et al. :
<i>Antibiotics & Chemotherapy</i> , 3, 1268(1953).	
(7) J. F. Pagano, M. J. Weinstein, C. M.	

放射状菌に関する研究*

ジヒドロストレプトマイシン並にビタミン B₁₂ の生産について

中沢鴻一, 柴田元雄, 山本弘一, 神崎俊彦, 東出栄治, 浜田義雄 (財団法人醸酵研究所)

三宅 彰, 岩崎英介 (武田研究所)

昭和 32 年 9 月 2 日 受理

緒 言

菌の培養液中に直接ジヒドロストレプトマイシン(DSM)を生産する一放射状菌, *S. humidus* が本邦土壤から発見されたことはすでに報告⁽¹⁾した通りである。一方 *S. griseus*^(2,3,4,7), *S. antibiotics*^(3,4), *S. aureofaciens*^(3,5), *S. olivaceus*^(3,6,7) などをはじめとして多くの放射状菌がビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と記す) 又はその同族体を生産することが知られているので, *S. humidus* について B₁₂ 活性をもつ物質の生産能の有無を検討した所, B₁₂ を必須栄養素として要求する *E. coli* mutant に活性な物質が生産されていることが認められ次いで三宅, 井上等により *S. humidus* の培養液をシアン処理することにより B₁₂ が得られることが確認された。我々は DSM を工業生産にまで至らしめる一助とするため, DSM 生産に最適な培地を探索すると同時に B₁₂ 生産性もこれと平行して吟味, 検討したのでここに報告する。

実 験 方 法

A. 菌株 *S. humidus* H-120, Q-97 の 2 株を用いたが, 実験 A にのみ H-120 株を用い他はすべて Q-97 株によって実験した。両株とも生産能の低い原株から種々の処理によりスクリーニングした結果得られた比較的 DSM 生産能の高いものであり, 又いずれも殆んど同じ処理を経て得られたものである。

B. 培養条件 種菌は *S. humidus* をグルコース・アスパラギン斜面寒天に 4~5 日間, 28° で培養し, 冷蔵庫中に保存したものをを用いた。この種菌から我々の用いている 3m 培地 (グルコース 2%, ペプトン 1%, 肉エキス 0.6%, 食塩 0.6%, CaCO₃ 0.3%, pH 殺菌前 7.0) 約 50 ml に 1 白金耳接種し, 毎分 120~130 往復, 振幅 5 cm で 28±1°, 48 時間振盪培養した後, 各実験用振盪フラスコにこの 1 ml を接種した。培養試験は 300 ml の振盪フラスコを用い, これに培地 50 ml を分注, 圧力 20 ポンドで 15 分間加圧滅菌した。培地の pH は東洋濾紙 pH 試験紙で殺菌前 10% NaOH で 7.0 に調整した。

* Studies on Streptomycetes. On the Production of Dihydrostreptomycin and Vitamin B₁₂.
By Kōiti NAKAZAWA, Motoo SHIBATA, Hiroichi YAMAMOTO, Toshihiko KANZAKI, Eiji HIGASHIDE, Yoshio HAMADA (Institute for Fermentation, Osaka), Akira MIYAKE, Eisuke IWASAKI (Research Laboratory attached to Takeda Pharmaceutical Industries Ltd.)