

# 日本化学療法学会第8回総会一般講演要旨

昭和35年7月16日(第1日)

## (1) Marinamycin の生産に関する研究

神子謙

自衛隊中央病院研究部

住山弘・三富守

防衛庁技術研究本部第2研

奥村重雄

徳島大学工学部

添田百枝

防衛庁技術研究本部第2研

1957年演者等の1人添田が東京都自由が丘の土壤から抗癌性を有する1新株を見出し、その生物学的性状を明らかにし、*Streptomyces mariensis* (S-34)と名づけた。昨年11月、千葉大学腐敗研究所の新井正教授によつて新株であることが認められた。

この菌株の産生する物質は抗癌性のみならず sarcoma 180 および Yoshida sarcoma 等に対してもその抗腫瘍性が認められるので、Antimalignant tumor substance という意味から、Marinamycin (略称 M<sup>2</sup>)と命名した。

本株は non-chromogenic type に属し、organic medium 上に色素を作らない特徴があり、胞子は美しい白色粉末状で、1週間以内に死滅するし、胞子形成は従来の *Streptomyces* group のようにいづれの培地にも自由を作るわけではないので、この前培養を意味する sporulation medium の研究も仲々難事であつたが、幸にも constant に美しい白色粉末状の conidia を産生させることに成功した。即ち Nz case 1%, NaCl 0.5%, Bactobeef-ext. 0.3%, Glycerin 1%, agar 2% に蒸溜水を加えて、加熱溶解せしめ高圧滅菌後 slant として用いる。この前培養基を用いることによつて長期間の移植をくりかえしても、抗腫瘍性の生産に影響がないことが分つた。

Marinamycin の生産培地：

振盪培地として現在迄に検討された種々なる Peptone, Extract および塩類、糖類等の組合せによる培地の数は 202 種類に及んだが、最近に到り一応の目安がついたので以下代表的なものについて順を追つて報告する。

本研究の当初は、戦時中ペニシリン研究のために入手

したカツオエキスをを用いた関係上この中の成分の何が有効であつたか、第1報に報告したような有効単位が得られたが、このカツオエキスが絶えてから思うような単位が出ず長年月苦勞した。

吾国において市販されている Peptone についても出来るだけ検討したが、現在の処 Polypeptone が最も適していることが分つた。

米国製品としては Difco peptone 6 種類 (即ち (1) Tryptose-Bacto, (2) Bacto-peptone, (3) Tryptonone Bacto, (4) Proteose peptone difco, (5) Casitone Bacto, (6) Proteose peptone No. 3), "Slieffeld" の Nz case および Tryptocase の 8 種類を選び、種々なる組合せについて検討した結果、Difco-manual に示された4つの Peptone の Typical Analysis の表が参考となつた。即ち培地中に chlorine が少ない peptone を用いた場合よりは、chlorine の多い即ち塩素イオンの多い peptone を用いた方が、有効単位が確実に constant に dilutions unit で2倍に上昇することが見られた。

吾国製品の poly-peptone 及び Ehrlich ext. を用いた結果、Ehrlich ext. の量が少ない方がむしろ有効単位が高く産生されることが分つた。

今迄に述べた成績を総合すると、proteose peptone 0.2% の添加によつて現在の処最高の単位が得られ、proteose の濃度を増しても単位が高く出なかつた。

これ等の結果から、大量生産培地の cost を下げるために Bacto-beef-ext. の代りに Ehrlich ext. の検討を行つた処、Ehrlich ext. 0.5%, Polypeptone 1%, NaCl 0.75%, Glucose 0.5%, Starch 2% に proteose peptone 0.2% を添加した培地が現在の処大量生産に用いられる廉価にして高い有効単位を示す培地であることを確かめることが出来た。

以上 28°C に於て3日間振盪培養後 *in vitro* によつて検定した単位を示した。

検定方法：

1957年添田が考案した *in vitro* activity の方法を用いた。即ち Ehrlich ascites cancer cells 100 万個 per ml を dilution method により 37°C 1 時間で呼吸作用の停止する量を1単位と定めた。この単位は 24 時間後には 10 倍に上昇することが分つたので参考までに記載した。その理由は有効単位出現阻害物質が培地中に多量に含まれる場合に参考となるためである。この問題に関

しては後日にゆずる。

以上の抗腫瘍性物質 Marinamycin は *in vitro* および動物実験によつて、各種 malignant tumor cells にも作用することが分つたので報告する。検定方法は Ehrlich ascites cancer cells によつて検定する方法にならつて腹水中の malignant cells の浮游液の呼吸作用を阻止する濃度を dilution method によつて確かめた。

Marinamycin crude powder 1mg 中の *in vitro* activity について Ehrlich ascites cancer cells と他の malignant cells との有効度を比較した。又動物実験で有効性を確かめたことについては各々の研究者から紹介された。未発表のものは追つて紹介される。

#### 総 括

1) *Streptomyces mariensis* の孢子は死滅しやすく出来にくい、発育がよく、空中気菌株のよくつく Sporulations medium を考案した。

2) Marinamycin の高い単位が得られる大量生産培地を考案した。

3) 各種 malignant tumor cells に対し、Marinamycin の有効性について記載した。即ち Ehrlich ascites cancer cells のみならず Hepatoma cancer (Sasaki), Hepatoma cancer AH 13 及びその nitromin fast strain, Hepatoma cancer AH 7974 及びその nitromin fast strain, sarcoma 180, Yoshida sarcoma に対し *in vitro* activity を記載した。

本稿を終るに臨み、最高の御支援を賜つた自衛隊中央病院長 小島憲先生に対し深甚なる謝意を捧げ、防衛庁技術研究本部長 青山秀三郎博士、第2研究所所長 石館文雄博士並びに研究部長 松野正徳博士に感謝する。

## (2) Marinamycin の化学的研究 (第1報)

Marinamycin の精製について

奥村 重雄

徳島大学工学部

添田百枝・住山 弘

防衛庁技術研究本部第2研究所

私共の1人 添田が1957年東京都目黒区自由ガ丘附近の土壌より分離した放線菌の1新株 *Str. mariensis* の培養ろ液中に抗癌性を示す物質が産生されることを見出し、その物質を Marinamycin と命名した。

この Marinamycin は有機溶媒系に移行せず、又 Amberlite IR 4B, Duolite A-30, Duolite A-2 等の塩基性樹脂、Dowex 50, IRC 50, XE 64 等の酸性樹脂に対し

ても、不純状態に於ては吸着されないという知見を得た。

そこで Marinamycin の抽出、精製に当り、この点に着目し、イオン交換樹脂により不純物の除去を行ない、又菌体外毒素精製法に用いられる部分的濃縮法との組合せにより精製濃縮を行ない高単位の精製粉末を収率よく生産する方法を確立したので発表する。

#### 実 験

新放線菌株 *Str. mariensis* を培地組成プロテオゼペプトン 0.2%, ポリペプトン 1%, エーリッヒ肉エキス 0.5%, 食塩 0.75%, 葡萄糖 0.5%, 澱粉 2% の培養基に接種し 27~30°C にて、3~4 日振盪培養する。この培養液を Brothout しろ紙ろ過によつて菌体を除去し褐色透明の Broth を得る。Broth は培養状態により一定ではないが pH 7.4~9.0 程度のアルカリ性に傾く。

次にその精製法を説明する。まずこの Broth を陰イオン交換樹脂 Duolite A-30 Cl type の Column を通す。使用 Resin の量は通過液量の 1/5 Volume 流出速度 30 ml/min, Resin の大きさ 50 mesh 附近のものとする。流出液の pH は酸性側 (pH 5 附近) に傾く。これをイオン交換樹脂 Amberlite IRA 400 Free type を用いて pH 7.4~7.8 に修正を行ないこれに約 30% の塩化亜鉛水溶液を流出液量の 1/20 Volume 添加、しばらく放置した後、生じた絮状沈澱を Decantation 及び遠心分離により集める。この沈澱を 10% 第2磷酸ソーダ溶液で pH 8.0 にいたるまで攪拌しつつ添加溶出を行ない、のち遠心分離により磷酸亜鉛の白色沈澱を除き褐色透明な水溶液を得る。ここに於て液量は原 Broth の約 100 分の 1 となる。

次にこの濃縮液 (I. r. w.) 中に含まれる塩類を除去するため、陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 及び陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 の Free type を液の pH が 5.0~8.0 の間に保たれるように注意しつつ両樹脂がその総和に於て液量の約 1/5 となるまで加え最終 pH 7.2~7.4 とする。ろ過によりこの樹脂を除く。

このろ液を次に陰イオン交換樹脂 Duolite A-2, Cl type 100 mesh の Column を通す。樹脂量は通過液量の 1/5, 流出速度 1 ml/min. この際流出液の pH は酸性側 (pH 5.0 附近) に傾く。これを Amberlite IRA-400 Free type で pH を 7.6 附近に修正ろ過により樹脂を除く。続いて Duolite A-2 Cl type 通過, IRA 400 による pH 修正の操作を更に3回繰返し、最後の pH 修正の際、陽イオン交換樹脂 Amberlite IR 120 陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 Free type をその総量が液量の約 1/5 となるまで添加し最終 pH 7.2 とし塩類除去及び pH 修正を兼ねる。樹脂をろ過により除去。

この最終精製液 (IInd. rich water) を凍結乾燥し帯

黄白色の粉末 (IInd. rich water) を得る。

この粉末はこれまで試みた種々の方法により得られた粗粉末の 5 倍~10 倍の効力を示す。又収率も非常に良い。

その性状は、酸よりアルカリに対して不安定である。熱に対しては、50°C に於て効力の減少が著しく、100°C に於いてはそれほどでないという結果をみた。これは何か他の要因を考慮する必要がある。酵素 Protenase の作用を受ける。膀胱膜、セロファン・チューブにより透析されない点からみて高分子物質と考えられる。

### 結 論

ここに示したイオン交換樹脂使用による新精製法は Marinamycin の精製に当つて非常に有効な方法である。なおこの方法により得た精製粉末より結晶化のパイロットテストに成功したことを附言する。なお単位の検定は添田の特殊 Screening test により行なつた。

本稿を終るに臨み、非常な御支援を賜つた自衛隊中央病院長 小島憲先生、並びに防衛庁技術研究本部長 青山秀三郎先生、第 2 研究所所長 石館文雄博士、部長 松野正徳博士に対し深甚な謝意を捧げる。

## (3) Purine 系 sulfone 類の *Trichomonas* 及びカビ類に及ぼす作用 (誌上)

(Kinetine の生物化学的研究 第 4 報)

奥村重雄

徳島大学工学部

添田百枝

自衛隊中央病院研

演者はさきに *Trichomonas vaginalis* として浜田義雄博士の分離にかかわる TV<sub>49</sub> 1099 株を用いて Kinetine など 15 種の Kinetine 誘導体について、抗 *Trichomonas* 性を検討した結果、6-Benzyl sulfonyl purine のみが有効で、他のものはすべて無効であることを報告した。

1) Benzyl sulfonyl purine の抗 *Trichomonas* 作用は合成剤としては可成り強力で TV<sub>49</sub> 1099 株の発育を 6.25 mcg/ml の濃度で阻止する。

抗酵母性を検定するために、*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* を用いたが、50 mcg/ml の濃度では無効であつた。

以下 4 種の derivate については *Trichomonas faetus* (Hamada) について 2) 6-(Decyl)-sulfonyl purine, 3) 6-(Octyl)-sulfonyl purine, 4) 6-(heptyl)-sulfonyl

purine, 5) 6-(hexyl)-sulfonyl purine についても検討した結果、2) 6.25 mcg/ml, 3) 3.125 mcg/ml, 4) 12.5 mcg/ml, 5) 3.125 mcg/ml の阻止効果を示した。

抗 *Candida* 性については *Candida albicans* M 10 株、*Candida albicans* Yu 1200 株を用いたが、2), 3) は 50 mcg/ml, 4)-5) は 100 mcg/ml では発育阻止されなかつた。

*Cryptococcus neoformans* についても同様であつた。興味あることは *Trichophyton* に対する態度でこの derivate の内 1) 6-(Benzyl) sulfonyl purine は 50 mcg/ml で完全発育阻止し、4) 6-(Heptyl) sulfonyl purine は 100 mcg/ml の濃度で発育阻止し、他の 3 derivate (2) と 3) は 50 mcg/ml, 5) は 100 mcg/ml の濃度で無効であつた。

既知抗 *Trichomonas* 剤のカルバミゼン、チアゾール誘導体は抗 *Trichomonas* 性であるが、Trichomycin は抗 *Trichophyton*, trichomonacidal, 抗 *Candida* 性抗生物質であり、Nystatin 等は高い抗 *Candida* 性のみを示し、抗 *Trichomonas* 性でなく、Griseofulvin は抗 *Trichomonas* 性なく *Trichophyton* に作用を示す。

以上報告されたものは何れも従来の文献に記載のない新化合物であつて、抗 *Trichomonas* 性で *Trichophyton* に有効であることは興味深い。

## (5) 抗生剤による細菌細胞の構造と生理機能の変動について

### 1) 抗生剤の細菌透過性について

中村典男・吉田耕作

高橋昌己・木村義民

日本医大細菌

実験方法: *E. coli* O-6 及び *Staphylococcus aureus* の培養各時期の菌を一定濃度に suspend し 1 ml 当りの菌数を一定とし、これに SM 1 mg/ml 又は Pc 100 u/ml を加え、37°C 30 分 incubate し、これらの抗生剤の菌に対する吸着ないし透過性を検討するため、sonic oscillator を用いて *E. coli* は 2 分及び 30 分溶出分画及び沈渣とした。*Staphy.* は 10 分及び 40 分溶出分画及び沈渣として各分画中の SM 及び Pc を測定し、これに  $v_n/V$  を乗じて一定菌数当りの薬剤量を求めた。測定の方法は従来行なわれている cup 法の変法を用いた。即ち 2~3% 普通寒天を以て基礎平面を作つた後、cup を立てその周囲に SM 測定には *Bac. subtilis* の spore, Pc には *Staphy. aureus* 209 P を混釈した 1% 普通寒天を注ぎ、寒天凝固を待つて cup を抜き取り、そこに出来た

径 8 mm の hole に検体を満して培養し、そこに現われる菌発育阻止帯の直径を標準曲線から算出し測定値とした。この方法に於ては同一条件の cup 法に比較して、阻止帯が広く測定感度を高める事が出来た。

実験結果： 先ず SM については *E. coli* O-6 感性菌 (Sens.) に於ては 18 時間培養の菌に最も多く SM が含有されている。沈渣即ち sonic 30 分で溶出ししない分画については培養時間の短い lag phase の菌に於て最も多く 6.8 mcg が証明された。SM 耐性 (R.) については、その stationary phase の sonic 30 分の分画に於て 23.0 mcg と多量に証明出来た。又 PcR. の菌については比較的表面の sonic 2 分の分画に多量の SM を認めた。又 209 P についても Sens. 18 時間培養に比較的多く含有され、PcR. として用いた wild の No. 72 株には全体に SM 含量が多く認められた。一方 Penicillin については、209 P Sens., SMR. 及び PcR. である No. 72 について何れも Pc の透過性弱く、僅かに sonic 10 分に於て認められるものがあつた。又 *E. coli* についても PcR. の 18 時間培養のものに極く僅か認められたのみで、他には証明出来なかつた。他方抗生剤と菌の接触時間の関係について検討した所、SM については非常に短時間ですでに菌体の深部にまで透過していると思われる成績を得た。しかし *E. coli* の場合に於て 10 分 incubate するとむしろ SM 含量の減少を来すことは興味ある知見である。又同様 Penicillin については sonic 10 分溶出分画に於ては認められるけれども、その他には証明出来なかつた。但し No. 72 に於ては Medium 中に加えられた 100 u/ml の Pc は急速度で減少し incubate 10 分にしてすでに証明出来なくなることは、Penicillinase の産生を思わしめるものである。*E. coli* については 10 分作用の場合に少量の Pc が各分画に証明出来た以外は *Staphy.* の場合と異り sonic 2 分の表在性の分画にも証明出来なかつた。次に *Micrococcus lysodeikticus* を用いて SM の透過状態を細胞構造の上から検討した。即ち細菌細胞に吸着ないし透過されて残つたものを Fr. (1) とし、lysozyme に依つて溶解された cell wall と protoplasm の水溶性部分を Fr. (2)、その遠心沈渣即ち cell membrane と考えられる部分は全量の 16% であつた。これを sonic に依り破壊して得た水溶性部分を Fr. (3) とし、残渣を Fr. (4) とした。更に lysozyme を用いる事なく SM 作用後の菌を直接 sonic で oscillate し、その上清を Fr. (5)、沈渣を Fr. (6) として、各 Fr. の SM 定量を行なつた結果、100 mg の菌に含有される SM 量は 13.5 mcg であり、Fr. (3) 即ち cell wall 及び protoplasm 中に 8.5 mcg、Fr. (3) 即ち cell membrane 中に 5.6 mcg の SM を証明した。そして各 Fr.

の乾燥重量 1 mg 当りに換算すると Fr. (3) が最も濃厚に 0.312 mcg であり Fr. の 0.014 mcg に比較して約 20 倍量であつた。同様の実験を SMR. の菌についても試みたが、感性菌、耐性菌の間には有意の差を認めなかつた。

結論 1) SM は *E. coli* Sens., SMR. 及び PcR. の 3 者共良く菌体内部にまで短時間で透過し、特に感性菌及び PcR. の 18 時間培養菌に於て著明であつた。2) 同じく SM は *Staphy. aureus* にも良く透過するが wild の PcR. No. 72 株に於て特に明瞭であつた。3) Pc については *E. coli* Sens., PcR., SMR. 及び *Staphy. aureus* Sens., PcR., SMR. 何れに於ても細胞構造中に入り得ないか、又透過しても微量であつた。4) 薬剤との接触時間については、SM は非常に短時間に、Pc は比較的長く約 20 分まで徐々に透過する。5) Wild の PcR. *Staphy. aureus* のうちには Penicillinase 産生菌と非産生菌が認められる。6) *Micrococcus lysodeikticus* を用い SM の透過部位を lysozyme に依つて分画した所、cell membrane に最も多く 1 mg 当り 0.312 mcg であつた。しかし SM Sens. と SMR. の菌の間には有意の差を認めなかつた。

## (6) 抗生剤による細菌細胞の構造と生理機能の変動に関する研究

### 2) チトクローム系呼吸酵素並びに核酸量について

新井義夫・鈴木広造・木村義民

日本医科大学細菌学教室

私達は今回、同一菌種の感性菌及び耐性菌について夫々の生理機能を検討する一端として音波処理菌体の各分画についてチトクローム系呼吸酵素及び RNA, DNA について検討した結果を報告する。

高等動物のチトクローム系呼吸酵素については古く藤田によつて、それらの吸収スペクトルにより a, b, c 型に分類されているが、最近 CHANCE, SMITH 等の新しい知見と共に電子伝達系の研究の進展に関連して多くの菌種についてチトクローム系呼吸酵素の更に細分された吸収スペクトルが検討されている。

各菌体はブイヨン 24 時間培養を行なつたものについて、15,000×g の連続遠心により菌体を分離し、更に 10 KC の音波振盪器により 30~40 分間にわたり溶出せしめた菌体抽出液を更に 20,000×g の遠心により上清と沈渣に分け凍結乾燥を行なつた各分画について、Cytochrome, RNA, DNA について検討を行なつた。

使用した菌種は *E. coli*, O-6 感性株及び SM 耐性株、*Staphylococcus aureus* 209 P 感性株並びに CM, SM,

Pc の多剤耐性株, *Shigella dysenteriae* A 2 感性株並びに CM, SM, Pc の多剤耐性株, *Micrococcus lysodeikticus* 感性株並びに SM 耐性株である。

Cytochrome の測定については各菌体抽出液の上清と沈渣を CARY の自記分光光度計により酸化型と還元型の吸光度の差による difference spectrum として記録した。還元剤として hydrosulfite を使用し、沈渣については之を苛性カリにて加水分解を行なつたものについて測定を行なつた。

DNA の定量は WEBB & LEVY の比色定量法により行なつた。即ち各検体を SCHNEIDER の方法により酸可溶性及びエタノール可溶性成分を除き、5% トリクロール酢酸(以下、TCA と略)を加え、100°C、30 分にて加水分解後、更に 3 ml の 5% TCA を加え、振盪し、遠心により TCA の層 2 ml を分離し、0.5% *p*-nitrophenylhydrazine エタノール溶液 0.1 ml と共に更に 100°C、20 分間加熱し、冷却後酢酸ブチル 10 ml を加え振盪し、有色物質を酢酸ブチル層に移行せしめ之を分離する。下層の TCA 1 ml に 99% エタノール溶液 3 ml 5% NaOH 0.5 ml を加えることにより赤色に発色したものについて直ちに 570 m $\mu$  にて比色定量を行なつた。回収率は 95~105% で測定範囲は 10~200  $\mu$ g であつた。

RNA の定量法は WEBB の比色定量法により行なつた。即ち DNA 定量の場合と同様に、各検体について酸可溶性及びエタノール可溶性成分を除き、5% TCA を以つて加水分解を行ない、遠心後加水分解液 1 ml について Xylene, 8 NHCl 各 1 ml を加え、更に食塩の結晶を飽和に加え、100°C、3 時間加熱し、冷却後更に Xylene 2 ml を加え、充分に振盪した後 Xylene 層 2 ml を分離し、2.5% *p*-bromophenylhydrazine 塩酸エタノール溶液 2 ml を加え、37°C、60 分間作用せしめた後 470 m $\mu$  にて比色定量を行なつた。

*E. coli* 感性株及び SM 耐性株について見ると、感性株、耐性株共に 432 m $\mu$ 、530、593 に夫々特異的吸収が認められたが、特に相違した吸収は認められなかつた。

同じ菌株の菌抽出液の沈渣について特に著しい変化は認められなかつた。

*Staphylococcus aureus* 感性株及び CM, SM, Pc 耐性株の上清については 432, 530, 560 に夫々特異的吸収を認めた。

同様の菌株の沈渣についても大腸菌の場合と同様に感性株及び耐性株共に大差を認めなかつた。

*Shigella dysenteriae* A 2 の感性株及び CM, SM, PC 耐性株については 432, 560 に夫々著明な吸収を認めた。

*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体 10 mg/ml に lysozyme 100 mcg/ml を作用せしめたものについての吸

光度の変化は共に 432 に特異的吸収を認めたが、感性株では 480 又耐性株では 470 に夫々特異的にスペクトルが認められた。

又核酸量については大腸菌、ブドウ球菌共に全菌体量では RNA, DNA 共に増加の傾向を示したが、各上清及び沈渣の分画については分画方法の不充分なためか大差を認めなかつた。

以上の如く今回、大腸菌、ブドウ球菌等の感性株及び耐性株の生理機能ないし代謝機能の相違について特にチトクローム系呼吸酵素及び RNA, DNA について検討を行なつたが、チトクローム系呼吸酵素にはほとんど差を認めず lysozyme 作用後の *Micrococcus lysodeikticus* についてのみ相違を認めた。

尚培養時間、菌体分画の方法等について種々検討を加える必要があると思われる。

## (7) 抗生物質作用下の *Bacillus* 属菌の形態変化に関する電子顕微鏡的研究

鈴木成美・菅沼 惇・谷野輝雄  
重松保弘・本田 功・望月成大  
京都府立医科大学微生物

EAPF (1954) は枯草菌、大腸菌などの各菌に阻止濃度以下の SM, AM, TM 及び Pc を作用せしめた場合の形態変化を電顕的に観察し、AM, TM は細菌細胞核に直接的な影響を与えないが、SM は細胞核の機能障害を来し、Pc は細胞分裂を抑制すると同時に細菌細胞核数の著しい増加を惹起すると述べた。われわれも各種抗生物質作用下の *B. subtilis* (PCI 219 株), *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa (BMM 菌), *B. anthracis* などの *Bacillus* 属菌の形態変化をカーボンレプリカ法、超薄切片法による電顕的観察を行なつた。

セロファン寒天に培養した正常な枯草菌のカーボンレプリカ像においては菌体の中央に Nuclea site に一致する窪み (depression) を認め、この窪みは培養経過に伴い種々形態変化を示す。また正常 *Bacillus* 属菌の切片像においてはラセン状に巻いた 2 本の chromosome-like structure を認める。

Pc (0.025 u/ml) 添加パイオンで 18 時間培養した枯草菌は snake form を示し、TM (0.8 mcg/ml) 添加のさいは軽度の溶菌像を示したが、CM (1.5 mcg/ml), SM (0.1 mcg/ml) 添加のさいは著明な菌体変化はみられなかつた。

次に正常枯草菌の芽胞は表面に数条の rib の形成がみ

られたが、Pc (0.012 u/ml) 添加後3時間培養したものでは spore coat の表面は膨化して無構造となりその一部は裂開を示した。同濃度の Pc 添加後6時間のものでは栄養形となつたものの溶菌像がみられた。

BMM 菌を Pc (0.025 u/ml) 添加ブイオンで12時間培養したさいは菌体の延長又は溶菌像をみとめた。Pc (0.025 u/ml) 添加培養菌の切片像では菌体の著明な延長と細胞質顆粒の溶解又は凝縮像を認め、Nuclear apparatus の消失又は萎縮像を認めた。

正常炭疽菌のカーボンレプリカ像ではきれいな Cross septa の形成と菌体内に1個づつの窪みを認めたが、Pc (0.05 u/ml) 作用菌では菌体の延長と菌体内に蛇行した細長い窪みが認められた。

Pc 作用菌の切片像では細胞質顆粒の一部溶解又は Nuclear apparatus の消失又は萎縮像がみられた。

SM 作用菌の切片像では、plasmolysis の像が認められ、極めて細長い細菌細胞の出現もみられた。

次に Pc の対照として Colchitin 誘導体の Demecolcin (Colcemid) を *Bacillus* 属菌培養に添加したところ、Demecolcin のさいは Pc より核分裂の異常が著しく、Pc 作用菌より更に長い snake form を示し、1細胞中に20数個の核が密接して存在するのがみられた。

[7 追加] *Aspergillus fumigatus* の微細構造と Nystatin の作用機序

平賀洋明 布施祐輔

札幌医科大学結核科 (主任教授 立野誠吾)

真菌症に関する基礎的研究として、*Candida* と *Aspergillus* の正常微細構造及び抗真菌性抗生物質である Trichomycin, Nystatin の真菌に対する影響について観察してきたが、今回は *Aspergillus* に対する Nystatin の影響についての電顕的観察所見を報告する。*Aspergillus* の頂囊部原形質中に糸粒体、小水泡膜様構造物を、梗子・分生子の原形質は極めて電子密度の高い微細顆粒の集積よりなり殆んど内部構造は認められない。抗真菌剤 Nystatin は梗子に最も強く作用し、次いで菌糸に作用し、分生子には殆んど影響を与えない様で、これは芽胞に相当して新陳代謝を必要としない分生子と原形質構造を有する梗子との差であると思う。又原形質に始め作用し内容空虚にするが、厚い膜にはなかなか影響を与えない様である。即ち Nystatin は殺菌剤ではなく、静菌的に作用する薬と思う。

## (8) クリプトコックス髄膜炎の実験的研究 (第3報)

村上精次・池本秀雄・寺田文夫

宮本 薫・高山英一・中沢信八

浪久利彦・塩川優一

順天堂大学第一内科

我々は *Cryptococcus neoformans* 堀江株の髄腔内注入により、犬の実験的クリプトコックス髄膜炎を惹起せしめ、同時にその発症に及ぼす副腎皮質ホルモンの影響並びに髄液の生化学的变化及び菌の形態学的変化について先に報告したが、更に実験例を追加して検討を加えたので報告する。

実験方法は前回同様犬14頭を使用し、主として後頭下穿刺により菌液を接種し同時にハイドロ コーチゾン を注入した。ただ採取しうる髄液の量及び採取回数極めて制限されているため検査対象は適宜選択した。

実験成績。菌とハイドロ コーチゾンの髄腔内同時接種例では症状、経過は急激で5~10日後に全例が死亡した。

菌のみの接種例では菌接種後一時全身状態が不良となるが数日後には次第に回復した。2例の死亡例中の1例は菌接種前より全身衰弱が強く、髄液及び脳よりの菌培養及び病理学的所見よりして髄膜炎による死亡とは考えられなかつた。なおハイドロ コーチゾン加培地上において莢膜の少い本菌は幾分莢膜を獲得する傾向がみられたが、対照に比較して特に有意の差は認められず、一応副腎皮質ホルモンの本菌自体に及ぼす影響は殆んどないものと考えられる。

髄液の細胞数は菌接種後4日頃より主に多核球の増加による細胞増多がみられ、これにおくれて7日頃よりバnジー反応が陽性となるようであつた。

髄液糖量は程度の差はあるが減少を示し、NiCLAUX 法によるアルコールの定性反応は、糖量の減少にも拘らず全例陰性であつた。アンモニア量は、特に髄膜炎を発症して死亡した例では増加の傾向がみられた。尿素量は増加の傾向を示し、塩素量は特に有意の差はみとめられなかつた。

細菌性並びに漿液性髄膜炎の臨床例では、化学療法の開始前、開始後ともアンモニア量に殆んど変化がなく、尿素量も正常値を示し、アルコールの定性反応も陰性であつた。

髄腔内に接種された菌が血中に証明されるのは稀れで、たとえ証明されたとしても接種後短時日で、また一過性であると考えられる。髄液よりの培養は菌とハイド

ロ コーチゾン同時接種例では全例が全経過を通じ陽性を示し、また剖検時脳よりの培養も陽性を示したが、菌のみの接種例では第2例のみ死亡するまで陽性を示したほかは接種後7~10日後にすべて陰性となり、脳よりの培養も陰性を示した。他の主要臓器の培養は全例が陰性を示した。なお一般細菌は全例とも証明されなかつた。短時日で死亡した7例では菌は髄液中で著明な莢膜を有することが証明された。

病理組織学的変化は主として軟脳膜にみられ組織球性反応及びリンパ球、プラズマ細胞の浸潤をみとめ、その中に巣状に *Cryptococcus neoformans* をみとめ、一部に巨細胞に貪食された菌体を見とめた。脳実質には一般に変化が少く1例に嚢胞状に *Cryptococcus neoformans* をみとめた。他の臓器には変化をみとめなかつた。

以上の実験成績よりしてコーチゾンは少量とくに一般に臨床で使用されているような少量でも、しかもただ1回の注入によつて発症を促進するという悪影響がみられた。

アンモニア量は一般に軽度の増加がみられたがこれは本菌のもつ尿素分解酵素によるものと考えられ、一方細菌性及び漿液性髄膜炎では殆んど変化なく、このことよりしてクリプトコックス髄膜炎の診断の補助になるのではないかと考えられ臨床例において更に検討する必要があると考えられる。

また病理学的所見及び培養所見よりして本菌は脳、特に軟脳膜に基だ強い親和性を有するものと考えられる。

## (9) *Candida* の増殖に対する細菌培養濾液の影響

小口 圭太郎

順天堂大学医学部産婦人科学教室

*Candida* 出現の1要因として、体内一般検出菌による *Candida albicans* (*C. alb.*) の増殖抑制について調べ、また細菌の産生産物が *C. alb.* の増殖に対する影響を求めて、その作用機転並びに化学的性状について実験、検討した。

### 実験方法

1) 混合培養法: *C. alb.* 標準株 (DUKE 株), *Klebsiella* 標準株 (*Kl.*), *Escherichia* O-9 標準株 (*Es.*) 及び *Proteus vulgaris* (*Pr.*) の夫々を1% glucose-peptone 水 (1% G-P 水) 中に0.033 mg づつに加えて混合培養し、24, 48, 72 時間後に *C. alb.* の菌数を算定、同時に pH を測定、細菌を混合しないものを対照とした。別に3種細菌の glucose 消費量を SOMOJIYI 氏法で定量した。

2) 試験管内増殖に対する阻害実験: *C. alb.* の1%

G-P 水菌浮遊液と3種細菌培養濾液を4:1に加え、37°C で培養、24, 48, 72 時間で光電光度計を使用して透光率を測定。対照には1% G-P 水を用いた。

(附) 細菌培養濾液作製法: *Pr.*, *Es.*, *Kl.* の3菌を1% G-P 水に37°C で培養し、24, 48, 72 時間に細菌濾過器で濾過、全9種の濾液の glucose 含有量を1,000 mg/dl に調製した。

3) 呼吸測定法: *C. alb.* を集菌、洗菌し、KRP 菌浮遊液 (pH 7.2) を作り、この菌液に基質として glucose を  $10^{-2}M$  に加え、*Pr.* 72, *Kl.* 24, *Es.* 24 時間培養濾液を作用させ、1% G-P 水を対照にとり Warburg 検圧計を使用して酸素消費量を測定した。

4)  $P^{32}$  の菌体内導入阻害実験: *C. alb.* を集菌、洗菌し、1% G-P 水菌浮遊液 10 mg/ml に培養濾液を0.5 ml づつ注加し、対照には1% G-P 水を用い、 $P^{32}$  428  $\times 10^3$  c. p. m./0.1 ml を加え、37°C、2 時間静置後洗菌、菌体の放射活性を G-M counter で測定した。

5)  $S^{35}$ -methionine の菌体内導入阻害実験  $S^{35}$ -methionine 80.1  $\times 10^3$  c. p. m./0.1 ml を加え、前実験と同じくし、洗菌の後加水分解を行ない、放射活性を gas flow counter で測定した。

6) 適応酵素形成阻害実験: 酵素材料には *C. alb.* の洗滌菌体を用い、基質には galactose, mannose を夫々終末濃度 10  $\mu M$ 、緩衝液には pH 7.0 の磷酸緩衝液を終末濃度 M/30 となるように用い、Warburg 検圧計により基質添加直後より酸素消費量を測定した。更に galactose, mannose 適応菌及び *Pr.* 72 時間培養濾液と基質とを共に振盪させた菌とにつき同様酸素消費量を測定した。

7) 抗カンジダ物質の化学的性質の決定: *C. alb.* の1% G-P 水菌浮遊液を *Pr.* 72, *Kl.* 24, *Es.* 24 時間培養濾液のセロファン透析内外液、透析外液の100°C、30 分間加熱液、非加熱液及び炭化溶出液とを夫々4:1に加え、37°C で培養、24, 48, 72 時間で透光率を測定した。

### 実験成績

1) 混合培養: 24, 48, 72 時間培養時の対照の *Candida* の菌数を夫々100% として混合培養における菌数との百分率をとつて比較すると、*Es.*, *Pr.*, *Kl.* 混合は24 時間培養時に夫々15%, 0%, 0% となり、48 時間では28%, 15%, 2%, 72 時間では42%, 13%, 5% となり、3菌とも *Candida* の増殖阻害を示す。pH の変化は *Candida* の増殖に影響がない範囲にとどまつた。細菌の glucose 消費量は *Kl.* を最高として *Es.*, *Pr.* の順位である。

2) *C. alb.* の試験管内増殖に及ぼす培養濾液の影響:

Pr. 培養濾液添加では各濾液とも対照に較べて透光率が高く、増殖阻害を示しており、特に 72 時間培養濾液が最高で、*Kl.*, *Es.* 培養濾液添加では各時間の濾液とも阻害効果を見るが両者共 24 時間培養濾液が最高阻害を示した。

3) 呼吸に及ぼす培養濾液の影響：酸素消費量はいずれも対照と変わらず、呼吸に対する影響は認められなかった。

4)  $P^{32}$  の菌体内導入に対する培養濾液の影響 2 時間で約 10.4% の  $P^{32}$  が菌体内に導入され、培養濾液添加においてはすべて菌体内放射活性は低値を示し、各濾液の培養時間による  $P^{32}$  の導入阻害率は Pr. では 72 時間培養濾液添加時を最高として、48, 24 時間培養濾液の順となり、*Kl.*, *Es.* においては 24 時間培養濾液が最高である。なお  $P^{32}$  添加後 2 時間の反応時間の反応時間中に菌量の変化はなかった。

5)  $S^{35}$ -methionine の菌体内導入に対する培養濾液の影響：2 時間の反応時間中に *C. alb.* の菌量の変化はなく、菌体内放射活性が対照 (5.1%) よりも濾液添加において低値であることは methionine の菌体内摂取が阻害されていることを示すものであり、これは蛋白の合成に対する阻害と解釈することが出来る。各培養濾液の導入阻害率の順位は  $P^{32}$  の場合と同様であるが、 $P^{32}$  よりも高い値を示した。

6) 適応酵素形成能に及ぼす培養濾液の影響：Galactose, mannose を基質とした場合、夫々の誘導期は 15 分及び 8 分であるが、基質と adapt させた菌では基質チップ後直ちに呼吸を開始し、これは適応酵素が形成されたものと考えられる。これが透過性適応でないことは、磷酸緩衝液中で 2 時間振盪 (starvation) した菌を基質に入れて呼吸の開始時間をみた所、starvation 前と変化のないことで知り得る。更に適応酵素形成期に濾液を共存させた場合はなお誘導期が認められ、これは適応酵素形成阻害が行なわれたことを意味するものと思われる。

7) 抗カンジダ物質の化学的性状：透析外液にのみ阻害効果がみられ、加熱液と非加熱液との間に増殖の差異を認めず、濾液を炭化することにより阻害効果が消失したこと等から本物質は耐熱性の低分子有機化合物と思われる。

#### 考 按

3 種細菌の *Candida* 発育抑制作用は糖の消費の他に代謝産物である抗カンジダ物質が関与していることが推定される。その作用機序として、 $P^{32}$  の菌体内導入が阻害され、これは呼吸阻害、染色性、形状等が不変であることから、抗カンジダ物質を加えることによつて菌体内の磷酸の流出速度を早めること、或は磷酸の透過性阻害

ではなく、一応菌体内の酸化的磷酸化阻害であり、*Candida* は栄養物を摂取、酸化することは出来るが、エネルギーを獲得出来なくなり、従つて増殖が抑制されたものと思われる。 $S^{35}$ -methionine の導入阻害率は  $P^{32}$  のそれよりも上廻るが、生体の代謝にはある程度の安全率があるから、ATP level が軽度に低下しても蛋白合成の速度にはあまり影響がなく、従つて適応酵素形成阻害を含めて、蛋白合成の阻害が発育障害の直接原因になっているものと想像される。

#### 結 論

*Candida* と共存する細菌の減少、消失は *Candida* の栄養源を増加させ、Pr., *Kl.*, *Es.* の消失は直接的抑制作用の消失ともなつて *Candida* 出現の 1 要因となるものと考えられる。

### (10) Chloramphenicol 及び類似化合物の抗菌機序

田子勝彦・矢島行賢・本江博子  
北里研究所

我々は芳香族  $\alpha, \beta$  不飽和カルボニール化合物の  $\alpha$  位に Br を置換すると抗菌活性が著るしく増強される事実、及びアルデヒド化合物はグラム陽性及び陰性両菌種に抗菌活性を有するのに反して、ケトンにはグラム陽性菌にのみ抗菌力を示すことを指摘して来た。今回はこれら一連の化合物の抗菌機序を蛋白合成阻害と酵素阻害の両面から追究した結果について報告する。

1) 蛋白合成阻害：*E. coli* F 103 の菌体を凍結融解した無細胞押出液にエネルギー源として ATP 及び HDP を加え、蛋白合成に必要な 20 種のアミノ酸の存在下に 37°C に 1 時間放置後三塩化酢酸にて合成された蛋白を沈澱し NESSLER 法で定量した。乾燥菌量 1 mg 当りの蛋白合成量は 50 mcg で CM (50 mcg/ml) で 60% が阻止される。芳香族化合物では Cinnamaldehyde が 4%、同 Br 置換体が 48%、paranitro 誘導体も同様で Br 置換により蛋白合成阻害が強化された。

2) [ $^{14}$ C] Glycine incorporation の阻害：蛋白合成阻害の実験に用いたアミノ酸溶液の内から Glycine を除き  $C^{14}$  で label した Glycine を各管に 10  $\mu$ c 加えた。1 時間孵置後三塩化酢酸で沈澱した沈澱の Radioactivity を測定すると、抗菌剤を加えない対照が 366 count/min で CM は 45% を阻害、 $\alpha$ -Bromo-cinnamaldehyde は最強で 52% の阻害を示した。この場合も Br 置換体は母化合物に較べて遙かに高い阻害力を示した。

3)  $\beta$ -Galactosidase induction の阻害：*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside が本酵素により *o*-nitrophenol