

高田培地につき基礎的臨床的にその価値を検討し、又同時に最近分離した真菌の薬剤感受性を測定した。

### 1. 水野・高田培地 (MT 培地) 試用成績

#### A. 保存株による基礎実験

*Candida* 諸株は本培地に大体 24 時間後発育を始め、48~72 時間後にはかなり著明な増殖を示した。*Torulopsis* は発育がおくれ 10 日後もその増殖の度は弱かつた。又、*Aspergillus* など他の真菌中に 24 時間後より良好な発育を示すものがあつたが、しかしその多くは発育がかなり遅れた。コロニーの着色状態は多くの *Candida* で 24 時間後早くも淡褐色ないし褐色となり、時間の経過と共に黒褐色ないし黒色となつた。

*Torulopsis* は 24 時間では着色せず、48 時間後には銀色となるが、その後は時間の経過と共に着色が強くなる様なことはなく、又、その他の真菌の多くは乾燥したコロニーを生じるから鑑別の目標となり得る。

MT 培地には薬剤耐性株を含む細菌保存株はいずれも発育しなかつた。

#### B. 臨床試用成績

本年度本院外来患者 261 例の膿内容より真菌の検出されたものは 75 例、即ち検出率 28.7% であつた。この結果は同時に行なつた。寒天培地による成績と大差なかつた。コロニーの着色状態は同種の保存株に比し、やや弱い様であつた。

SABOURAUD 寒天培地では膿内容より 31.2% に細菌を検出したが MT 培地では 1 例にのみ検出された。それゆえ本培地は多くの真菌も発育するけれども *Candida* 検出に便利な特徴を有し、且つ細菌の発育を殆んど阻止する利点があることがわかつた。

### II. 最近分離した真菌の抗生物質感受性

#### A. 保存株の薬剤感受性

教室保存の *Candida* 21 株、*Torulopsis* 3 株の薬剤感受性は 0.2~3.12 u/cc (又は mcg/cc) であり、菌株による感受性の範囲にかなりの幅を認めた。

#### B. 分離株の薬剤感受性

本年度分離した *Candida* 56 株、*Torulopsis* 25 株の感受性は、*Candida* で Trichomycin 3.12 u/cc, Amphotericin-B で 0.78 mcg/cc の部分に Peak を示した。

*Torulopsis* では Trichomycin 3.12~6.25 u/cc, Amphotericin-B 1.56~3.12 mcg/cc に Peak があつた。

従つて本年度分離した *Candida*, *Torulopsis* にはまだ耐性を得ていないものと思われる。

#### 〔追 加〕

加藤 獻(大阪医大泌尿器)

水野一高田培地は細菌の発育を抑圧して *Candida* のみの発育をゆるし特有な灰白色、褐色、あるいは黒褐色

のコロニーを生じ *Candida* の判別に便である。48 時間~144 時間に *Candida* は良好な発育を示し臨床的の使用に便である。サブロー培地に比し *Candida* の発育のみについて優劣は決定しがたいが、細菌類の発育を抑圧して *Candida* のみを発育させ、判定に便な色調を呈する点がサブロー培地に優るものと考える。

#### 〔追 加〕

阿多実茂(名大細菌)

患者喀痰 30 例、糞便 10 例、および外来患者の胃液 10 例につき水野・高田培地によるカンジダ属の分離を行ない、次の成績を得た。

- 1) 本培地はカンジダ属分離培地として抗生物質加サブロー培地に優るとも劣らない。
- 2) 細菌の発育は極度に抑制される。
- 3) カンジダ属の集落は灰色から黒色となる。
- 4) 細菌発育抑制因子は真菌に対しても大なり小なりの影響を及ぼす。特にクリプトコツカス、トリコフィトン、ミクロスボロン、ゲオトリウム等は本培地に発育をみない。
- 5) サツカロミセス、ロドトルラ、トルロプシス等の集落もカンジダ属のそれの着色と区別しにくい。アスペルギルスも黒色化する。
- 6) カンジダ・アルビカンスの同定には本培地より更にそのための諸試験を必要とする。

#### 〔座長追加〕

中山太木(大阪医大微生物)

MT 培地や GS 培地など特選培地の意義やその実用性の向上は興味あるところであるが、赤痢菌における SS 培地と普通寒天培地使用のように、病的材料の塗抹量の吟味と留意が大切であることから考えて、サブロー培地を併用して右のような留意で検討することが必要であると思う。これとともに、耐性や感性の問題も菌量の問題をもう少し厳密に検討する要があると思う。

### (9) Trichomycin 並びに Amphotericin B の溶血性吟味

青河寛次・松下光延

京都府立医大産婦人科

抗真菌性抗生物質たる Trichomycin 及び Amphotericin-B (Am) の溶血性を *in vitro*, *in vivo* で基礎的研究を行ない、次の知見をえた。

#### A) Trichomycin.

1. *In vitro* で Tm 濃度が家兎赤血球に対し 6.0 u/cc 以下、ヒト O 型赤血球に対し 15 u/cc 以下では溶血を来さない。

2. Tm を 1 日 500 u 6 日間、計 3,000 u、家兎に静注しても、血液所見には殆んど変化を来さない。しか

し Tm 1 日 2 回 1,000 u 6 日間、計 6,000 u 静注では、赤血球抵抗性及び赤血球数よりみて、溶血の発生を推定させるが、これ以外の因子（白血球数・血色素量・ヘマトクリット）は正常範囲内の動搖である。

3. Tm は從来溶血がかなり強いと云われていたが、上述の知見は Tm の静脈内投与の可能性を示唆するものと思われる。

#### B) Amphotericin-B :

1. *In vitro* で Am 濃度が家兎赤血球に対し 50 mcg/cc、人赤血球に対し 250 mcg/cc 以下では溶血を来さない。

2. Am 1 日 1 mg、計 6 mg 家兎静注では、血液所見に変化はなかつた。

Am 1 日 5 mg 6 日間、計 30 mg 投与時、家兎 5 羽中 3 羽が死亡した。しかし、生存家兎では著しい白血球增多以外には赤血球抵抗性その他に著変なく、又、斃死家兎にも認むべき病理組織学的変化がなかつた。

### (10) 皮膚白癬症に対する Griseofulvin の使用経験

山口武津雄

大阪市大皮泌科

皮膚白癬症は皮膚科疾患のうち、最も頑固なもの 1 つであり、往々種々の皮膚科的処置に抵抗し、且一時的に軽快しても再発を繰り返して我々を悩ませる。即ち浅在性白癬では通常、菌は表皮基底層を越えて真皮内に侵入する事はなく、多くは極く表在性の角質層に寄生すると云われており、古くから白癬の治療法として菌が存在する角質層を剥離せしめ、同時に菌に対して殺菌的或は静菌的に作用する薬剤を配合した種々の軟膏や溶液が用いられて來たにも拘らず、所期の目的を達し得なかつた。而るに是に Gaiseofulvin なる物質が出現し、大なる成果を収めつつある。

本剤は 1936 年 OXFORD, SIMONAT 等が Penicillin griseofulvum から分離した。白色、無臭、中性、熱に安定な抗生物質で、1952 年 GROVE 等により構造式が決定された。

本剤を人間の白癬に始めて用いたのは RIEHL と云われ、其後欧米に於ては WILLIAMS, BLANK 等、本邦に於ても、高橋、樋口、村田始め多数の報告があるが、吾吾も昨年来本剤を用いて各種皮膚白癬症に対して臨床実験を行ない、その一部は本年 7 月、皮膚科学会大阪地方会に於て発表したが、今回はまとめて報告する。

実験対象としては本科外来及び入院患者で、皮膚白癬症と診断されたもののうち、菌学的に白癬菌を証明した

もの、頭部白癬 3 例、班状小水疱状白癬 3 例、頑癬 12 例、汗疱状白癬 24 例、爪白癬 9 例の計 51 例で、内服量は大人 1 日 1 g、小児 0.75 g、幼児 0.5 g として 2 ~ 4 回に分服せしめ、約 1 週間毎に臨床経過及び菌の検出を繰り返した。菌の検出は鏡検及びサブロー培地による培養を併用し、効果判定は菌の陰性化及び臨床所見の消失したものと治癒とし、菌の陰性化が見られても、観察期間中に皮疹の完全消失に至らなかつたものを有効とした。

頭部白癬に就ての成績で、搔痒感は 6 ~ 16 日で、丘疹は 14 ~ 22 日、落屑は 20 ~ 25 日で消失し、病巣内の菌は 14 ~ 34 日で消失、全例副作用なく治癒した。

班状小水疱状白癬では搔痒は 4 ~ 18 日、小水疱は 9 ~ 12 日で消失、病巣内の菌は 10 ~ 17 日で陰性化して治癒しておる。

頑癬 12 例では搔痒は 4 ~ 18 日、丘疹は 7 ~ 32 日で消失し、菌は 9 ~ 34 日で陰性化して治癒している。代表的な 2 例に就ては、治療前、8 は本剤内服 30 日後、9 (転幹) は内服前、10 は内服 26 日目のものである。

汗疱状白癬 24 例は、搔痒は 5 ~ 18 日、紅斑は 8 ~ 29 日、浸軟は 11 ~ 29 日で消失、菌の陰性化は 15 ~ 38 日で見られるが 1 例のみ 50 日を要したものがあり、40 ~ 60 日間本剤を投与しても尚皮疹の完全消失に至らなかつたものが 4 例あつた。

爪白癬に本剤を内服させると 3 ~ 6 週目から混濁肥厚した病変部の根部に桃紅色の健常爪の発生が見られ、之は徐々に伸びて行くが、9 ~ 10 週目に於て健常爪の発育は停止するかに見えるが、この時期に内服を中止しても 3 ~ 5 カ月で病変部は完全になくなり治癒する。

次に副作用は 52 例中 20 例に見られる。即ち後頭部鈍痛、下痢、食思不振が主なものであるが、何れも早期に発現し、且軽度で一過性であり、頭痛及び嘔吐の甚だしかつた 1 例を除いて内服を中止したものはなかつた。又この中にはペニシリン過敏症の既往歴を有するものが 1 例含まれているが軽度の頭痛を訴えたに過ぎない。

再発に関しては治癒に至つたもの 47 例中、頭部白癬、頑癬各 1 例、汗疱状白癬 3 例に再発を見た。この 5 例中 4 例は菌陰性化後 10 日以内に本剤内服を中止したもので、10 日以内に内服を中止した 8 例に就て見るとかなり高率を示している。

経過期間と治療日数との間には特別の関連性はなかつた。

これ迄報告された欧米の文献には、本剤内服による搔痒の消失に就ての記載は非常に少なく、又紅斑、丘疹、落屑等の他覚的症状に就ても詳細な記載は見られない。其等によると内服開始後 3 ~ 7 日で搔痒の軽減が見られ

るとしているが、我々の例では搔痒の消失には4~18日を要し、10日以上を要したもののがかなり見られた。一般に本剤の内服によつて搔痒の急速な減退は認められるが、消失には多少の日時を要する様である。而し高橋等の報告する如く、臨床症状が殆んど消失する迄搔痒が持続した例は見られなかつた。

他覚的症状の改善に要した期間は各症例によつてかなりの差があり、一般に本剤投与前の臨床症状の強さに或程度関連している様に思われる。菌の陰性化に就ても症例によつて相当の差が見られ、50日間の内服によつて始めて陰性化が見られたものすらある。かかる症状改善に要する期間の差は汗疱状白癬に於て特に著しいと思われるが、この様な差異は角質増殖の差異、紅斑、丘疹等の強さが関係を有する事は否めず、又個体に於ける薬剤の吸收、角質に於ける薬剤の濃度、菌の性状等が関係していると考えざるを得ないが、この点に関しては詳しく述べは検討が加えられておらない。

頑癬の治療に要する期間は汗疱状白癬に比して短かい。

爪白癬の治療経過に関しては ROBINSON 等は趾爪は指爪に比して経過が緩慢で相当の差のある事を指摘しているが、我々の例では彼等程の差はないと思われる。而し、WILLIAMS の云う如く爪白癬の治癒速度は爪の発育速度に關係があると思われる。

副作用に関しては BLANK, SULZBURGER, 高橋等の報告と我々の例とは大差なく、全症例の  $\frac{1}{3}$  以上に副作用を認めたが、何れも軽度で、且つ一過性であつた。

ペニシリン過敏症と本剤副作用との関係に就ては ROBINSON, BLANK 等はかかる既往歴を有する人に投与しても何等副作用認めず、1例に於て本剤内服後ペニシリン注射部位に発疹を見た例を報告しており、高橋等は恶心、嘔吐、下痢の甚しかつた例を報告しているが、我々の1例に於ては軽度の頭痛を訴えたに過ぎなかつた。この問題に関しては更に症例を重ねることによつて解決されるであろう。

再発に関しては、菌学的に陰性化が見られてから10日以内に本剤内服を中止した8例中4例に再発を見ており、高橋も同様の事実を報告している事は注目してよいと思う。又之等再発は内服中止後13~22日と云う早期に起つており、治癒と認められてから10日以上内服を続けた症例に於ては内服中止後3~11カ月間で再発を見たものは1例に過ぎず、遠隔成績は目下検討中であるが以上の事実から再発か再感染かの問題とも併せて今後更に検討を要すると思われる。

## 第2日

### (11) 地衣成分の抗腫瘍作用に関する研究(第3報)

中沢昭三・小松信彦・浜田 雅・山本郁夫  
東大伝染病研究所

藤川福二郎・平井邦夫  
京都薬科大学

前回に引続き Psoromic acid の抗腫瘍作用並びに毒性、更に化学構造と抗腫瘍作用との関係及び芳香族地衣成分中のデプシドーン及びデプシド類の抗腫瘍効果の比較検討を行なつたので報告する。

1) マウス EHRLICH 腹水癌接種後2日目より初回1mg/マウス、次いで6日間毎日0.5mg/マウスの腹腔内注射を行なつた結果、非常に著明な延命効果を認めた。

2) マウス EHRLICH 固型癌接種後1日目より12時間互いに8回腹腔内注射し7日目に腫瘍を摘出、対照の無処置群腫瘍の重量と比較すると約1/3であつた。

3) マウス Sarcoma 180(固型)接種後1日目より1日1回7日間各2mg/マウスを静脈内に投与し更に7日間放置次いで摘出、重量の比較を行なうと対照群の約1/2であつた。

#### 4) 血清による不活性化の問題

50%馬血清に Psoromic acid を含有しマウス EHRLICH 腹水癌を治療したが全く無効であつた。又50%血清加 Psoromic acid と Psoromic acid 単独の CAP法による阻止帯を調べると著しく減弱している事が分つた。

5) 化学構造と抗腫瘍作用との関係について検討しているが未だ結論は出ていない。

6) 芳香族地衣成分中オルチン系デプシドーンに属する  $\alpha$ -Collatolic acid 及び  $\beta$ -Collatolic acid は Psoromic acid に次いで有効である。

又オルチン系デプシド中2, 3有効なものがあり、次の機会に報告する。

#### [質問]

小俣順一(阪大微研)

- 投与には遊離酸の形で用いているか。
- 抗腫瘍スペクトラムをぜひ検査したい。

#### [回答]

中沢昭三(東大伝研)

1. プソローム酸は現在0.1%の重曹水に溶解して使用している。K塩についても検討している。

2. エールリッヒ、ザルコマ 180以外の腫瘍細胞に對しては、吉田肉腫に對しては私共の研究室で、その他はミシガン大学、スロンケッタリング研究所のはうへ依頼した。

## (12) Gramicidin J の抗菌作用機序について

一とくに菌体成分の漏出作用を中心として—

奥田 清・三木吉春・大谷象平

大阪市大医学部生化学教室

Gramicidin J (Gr. J) は Valine, Proline, Phenylalanine, Leucine, Ornithine より構成された環状の Peptide であり、強い生物学的な活性、ことにグラム陽性菌群に対するほぼ撲滅的な抗菌作用をもつている。ペプチド性抗生物質の作用機序に関しては Gramicidin, Tyrocidin, Polymyxin 等に若干の報告がみられるが、尙不明の点を多く残している。幸いにして Gr. J は活性が強く、且純粋に得やすく、更に化学構造が完全に解明されている等、他のペプチド性抗生物質が類似ペプチドの混合物として用いられているのに比し、有利な点が多い。今回演者らは、Gr. J をその感受性菌である黄色ブドー状球菌の 1 菌株に作用せしめた場合に、その菌体に由来すると考えられる E 260 m $\mu$  吸収物質を多量に菌体外へ遊離せしめる事実を認め、更に詳細な検討を試みた結果、その遊離物質には菌体酸溶性ヌクレオチドの過半量を含む事を確認し得たので、他の作用機序に関連した 2, 3 の事実と共に報告する。

### 実験材料及び方法

#### 被検菌

- 1) 黄色ブドー状球菌 209 P 株 (S 株)
- 2) S 株より液体培地移植法によつて得た耐性株 (R 株, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>) 株は夫々 Gr. J に対してほぼ 10, 20, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の耐性を有する)
- 3) 大腸菌、微研株 (E 株)

これら被検菌に対する Gr. J の最小発育阻止濃度は S, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, E 株に対して夫々、1~2, 8~10, 18~20, 25~30, >30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり (R 株の発育が遅延するため接種菌量を増し、判定時間を延長した。通常の条件では S 株に対して 0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  前後である), S 株に対する静菌作用域は 0.6~5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である。このように静菌作用域の比較的狭いことは Gr. J の抗菌作用が殺菌的傾向のつよい事を示すものと考えられる。興味あるのは R 株は何れもグラム陽性を保持したまま耐性を獲得しており、また原株である S 株に比し、ether, ethanol 可溶性部分が増量している事実である。尙これら被検菌は何れも Gr. J をよく吸着するが、吸着ないし吸着部位に関しては次に上村らの報告にゆずる。

その他実験材料、或は方法の詳細は詳報 (大阪市立大学医学雑誌、9 卷、11 号、213~225 頁、昭和 35 年)

を参照されたい。

### 実験

#### [I] Gr. J による E 260 m $\mu$ 吸収物質の漏出について

S 株の対数増殖期中期の洗滌菌体を磷酸カリ緩衝液 (0.02 M, pH 7.0) 中で Gr. J と共に 2°C, 30 分間 incubate した後、4,000 r.p.m. 10 分間遠沈し、その遠沈上清の紫外外部吸収曲線を測定すると、260 m $\mu$  を中心として強い吸収が認められた。

##### 1) 260 m $\mu$ 吸収物質の漏出条件

このような漏出現象は 0°C でも充分行なわれ、30°C 前後まで温度の上昇に関係なく、30°C 以上では温度の上昇に従つて漏出量も増加するが、Gr. J を添加しない対照にも全く同じ傾向が認められるので、この高温部に於ける漏出の増大は Gr. J 自身の作用に直接関係のないものと考えられた。

漏出の時間的経過は S 株と Gr. J とを接触後直ちに遠沈を開始した場合にも充分認められ 2 時間の incubation を通じて殆んど変化をみとめなかつた。

このように低温下、短時間で充分観察される事は、この現象が核酸分解酵素活性の促進や、核酸合成阻害に基づくヌクレオチドの蓄積の如き複雑な代謝過程を経たものとは考え難く、むしろ physical な反応であることの可能性を強く示すものと思われた。

次に漏出と Gr. J 濃度との関係を検討した所、漏出は 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  前後より始り、7~8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  前後までは Gr. J 濃度の増加に比例して漏出量が増大し、8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上、少くとも 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  まで漏出量の増加は殆んど認めなかつた。実験条件は異なるが漏出の開始及び最大に達する Gr. J 濃度が、S 株に対する最小発育阻止濃度及び殺菌濃度に夫々ほぼ一致することは Gr. J の抗菌作用との関連性の深い事を推測せしめた。

##### 2) 漏出物質の同定

上記の如き漏出現象に際して、漏出した E 260 m $\mu$  値を、同じ菌体の冷 PCA 可溶性分画の総量と比較すると、Gr. J による漏出はその 80~90% にも達し、而もその総量との差は Gr. J 处理後の菌体からほぼ完全に回収される事から、漏出した E 260 m $\mu$  吸収物質として酸溶性ヌクレオチドを予想し、Dowex 1 を用いた SIEKEVITZ, POTTER の法に従つてイオン交換クロマトグラフィーを行ない、漏出したヌクレオチドの同定を試みた。その結果、ピリジン、アデニンヌクレオチド等、少くとも分析し得たものについては、その漏出は一様であつて種類による漏出量の相違は少く、平均して 80% 以上に達した。

##### 3) 耐性菌及び大腸菌に対する漏出作用

上述の如き、生活に必須と考えられるヌクレオチド或

はこれに伴う他の各種菌体成分の漏出は Gr. J の抗菌作用を理解する上に有力な示唆を与えるものと考えられたが、更に耐性菌に対する Gr. J の漏出作用を検討することによつてこの漏出作用が Gr. J の抗菌作用に関連の深いことを知り得た。即ち、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> の各耐性株に Gr. J を作用せしめた場合、各株はその耐性度に応じて Gr. J の漏出作用に抵抗を示し、同様な現象は大腸菌に於いても認められた。

#### [II] プドー糖酸化に及ぼす Gr. J の影響

以上の菌体成分の漏出作用から Gr. J が菌代謝に重大な影響を及ぼす事が当然予測され、その1例として各菌のブドー糖酸化反応をとり上げ、Gr. J の影響を検討した結果、S 株は Gr. J の低濃度から強い阻害をうけるのに反し、E 株ではその阻害に比較的大量を要し、R 株はその中間の態度を示した。阻害は何れも不可逆的であるが、少量の lecithin の添加によつて Gr. J の阻害はみられなくなつた。尚、E 株に対する酸化阻害は基質の添加に先立つて Gr. J を添加するか、少くとも同時に添加した場合に限られるのに反し、S 株に対する酸化阻害はその添加時期の関係なく強い阻害が観察された。

〔質問〕 川俣順一(阪大微研)

1. 耐性菌ではグラミシジン J の作用下でも 260 m $\mu$  吸収物質の漏出がないというわけであるから、グラム染色性も変わらないわけか。

2. グラミシジン J 耐性は細菌細胞の表面の性質の物理化学的变化が大きい因子であると考えてよいわけか。

〔回答〕 奥田 清(阪市大生化)

1. まだ検討していないが、この Gramicidin J によつて漏出される E 260 m $\mu$  吸収物質とグラム陽性物質との関係は全く不明である。

2. そのように考える。

〔質問〕 荒谷春恵(広島大薬理)

200 m $\mu$  物質が漏出後の Gram 染色性の変化は。その機序について。

〔回答〕 奥田 清(阪市大生化)

グラム陽性菌では Gramicidin J と 10~30 分の接触によつてグラム染色は陰転化する。漏出後の菌についてまだ検討していない。

### (13) Gramicidin J の作用機序に関する研究

—放射性 Gramicidin Gr. J の作用部位について—

大谷象平・上村 勇・陳 成基

大阪市立大学医学部生化学教室

Gr. J は、奥田が紹介した如く、*B. brevis*(永野株) の

產生する環状 Polypeptide で、グラム陽性菌に対して特異的に作用する塩基性抗生物質である。

当教室の橋本は、この Gr. J の作用機序解明の一端として、強力な螢光を有する Gr. J の mono-1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonate を合成し、*B. megatherium* に作用せしめ、螢光顕微鏡的に作用部位を検し、その結果を報告した。

演者等は第 118 回日本抗生物質学術協議会研究会で報告した如く、可なり Specific activity の高い C<sup>14</sup>-Uniform labelled Gr. J を得た。本物質は化学的並びに生物学的には Gr. J と同一の態度をとる点より考えて、Gr. J の螢光導体よりも Gr. J の作用機序、特に Gr. J が菌体に作用する部位を解明するのにより適当な材料と考えられるので、本実験では、上記の放射性 Gr. J を *B. megatherium*, *B. subtilis*, *Staph. aureus* 及びそれ等の耐性株及びグラム陰性菌 *Escherichia coli* に作用させ、若干の成績を得たので報告する。放射性 Gr. J の製法：*B. brevis*(永野株) を Gr. J 構成の 5 種のアミノ酸 Leucine, Phenylalanine, Valine, Proline 及び Ornithine, 無機塩、更にグルタミン酸及び Yeast extract を含む合成培地で振盪培養を行ない、夫々の培養基に時間を変えて C<sup>14</sup>-phenylalanine 又は C<sup>14</sup> で uniform に labelled されたアミノ酸混液を加え、培養開始 24 時間後に菌体を集め、菌体中より Gr. J を alcohol にて抽出し、この抽出液を、ブタノール：醋酸：水 (4:1:1) の溶媒系で展開して得た Radiopaperchromatogram の Gr. J の部分を cut し、アルコールにて溶出し、その溶出液中の Gr. J の Radioactivity を、ガスフローカウンターにて測定した。その結果、培養開始後 7 時間に放性アミノ酸を加えた場合に、Gr. J 中への incorporation の率が最も良い事を知つた。

この様にして得た放射性 Gr. J の純度を知る目的で、1 g の結晶 Gr. J を加えて稀釈し、数回再結晶を繰り返しても、比放射能の低下を認めなかつた。又、10 N 塩酸で 72 時間加水分解した加水分解物をブタノール：醋酸：水の溶媒系で展開して得た Radiopaperchromatogram は Gr. J 構成アミノ酸に一致して、5 個のニンヒドリン陽性 spot を認め、培養中に C<sup>14</sup>-Phenylalanine を加えたものでは Phenylalanine の位置にのみ、C<sup>14</sup>-アミノ酸混液を加えたものでは全ニンヒドリン陽性 spot に一致して放射能を検出する事が出来た。

本培養開始後 7 時間に、C<sup>14</sup> で uniform に labelled したアミノ酸混液を加えて培養した菌体より、specific-activity 178,000 c.p.m./mg の放射性 Gr. J を得たので、これを *B. megatherium*, *B. subtilis*, *Staph. aureus* 及びそれ等の Gr. J 耐性株、グラム陰性菌 *E. coli* 等の

Growing cells, Resting cells に対し最少発育阻止濃度で作用させ、菌体での放射性 Gr. J の分布をみた。

ここに用いた Resting cells とは、各菌をブイヨン中で 15 時間振盪培養を行なつた後、遠沈で菌体を集め、充分に生理食塩水で洗滌後、0.03 モル濃度の Phosphate Buffer (pH 7.0) に dry weight 1 mg/ml に suspend したものを用い、Growing cells は、上記培養菌体 5 cc を新しいブイヨン中に加え、再び振盪培養を行ない、混濁度が前者と同じになる迄培養を続けたもので、その各々に放射性 Gr. J を 20 分間作用させた後、遠沈にて菌体を集め、生理食塩水にて洗液中に根跡の放射能をも認めなくなるまで繰り返して洗滌した後、その菌体の一部を取り、そのアルコール抽出液をブタノール：醋酸：水の溶媒系で展開して得た Radiopaperchromatogram は、Gr. J の Rf に一致した所にのみ放射能を検出する事が出来た。この事から作用せしめた Gr. J が分解されずに菌体に吸着されている事がわかつたので、*B. megatherium*, *B. subtilis*, *E. coli* は Lysozyme 处理により Cell wall を除き、得られた Protoplast を osmotic shock により細胞膜を破壊し、14,800×g, 15 分の遠心沈澱にて細胞膜と Cytoplasma に分離し、更に 14 万×G, 60 分の遠沈で沈澱、いわゆる Ribosome と上清に分離し、*Staph. aureus* は、MICKLE の disintegrator を用いて菌体を破壊した後 Grass beads を除き、1,000×g 15 分、14,800×g 15 分の沈澱及び Cytoplasma の分割に分け、更に Cytoplasma 14 万×g, 60 分の遠沈で Ribosome と上清に分離し、夫々の Fraction について Radioactivity, 蛋白質量, 核酸量を測定した。核酸は OGUR & ROSEN の方法で抽出し、RNA は Orcinol 反応で発色させた後、660 mμ の吸収を測定し、DNA は Diphenylamine 反応を行なつた後、600 mμ の吸収を測定する事により定量した。蛋白質量は、乾燥重量を測定した。

Gr. J 感受性菌 *B. megatherium* に対して、1 cc 当り 0.77, Total count 24624 c.p.m. の放射性 Gr. J を 20 分間 37°C で作用せしめた後、遠沈分割を行ない、各分割の放射能を測定した結果、休止菌並びに増殖菌共、約 90% に相当する放射性 Gr. J が菌体に吸着されるが、その大部分、約 83% が 140,000×g, 60 分の遠心沈澱分割、換言すれば、Ribosome 分割に吸着されている。先に橋本は、Gr. J の螢光誘導体を作成させた同菌を mechanical に破壊し、各遠心沈澱分割の螢光を測定した結果、この顆粒分割に最も強く螢光を認めていたが、この成績と全く一致している。

*B. subtilis* の Gr. J 感受性株に於ても、ほぼ同じ成績を得た。即ち、同様に放射性 Gr. J を作用せしめた結果

果、約 80%~90% の Gr. J が菌体に吸着され、しかもその大部分が RNA を多く含む Ribosome の部分に集つている。所が同菌の Gr. J 耐性株を同様処理した結果、吸着率が著しく低下し、加えた Gr. J の 25~30% が吸着されており、更に感受性株との著しい違いは、その大部分が、即ち約 60% が Cell wall に吸着されて居り、Ribosome には殆んど吸着されて居ない。

*B. subtilis* の Gr. J 感受性株と耐性株との間には、以上の如く、Gr. J の吸着率及び吸着部位に差異がある事を知つたので、更に *Staph. aureus* の Gr. J 感受性株と耐性株とについて比較し、ほぼ同様の成績を得た。即ち、感受性菌では加えた Gr. J の 85~95% が菌体に吸着され、その大部分即ち 70~75% が Ribosome の分割に吸着され、耐性株では Gr. J の吸着率は低下し、Ribosome には殆んど吸着されずその大部分は、Cell wall 及び Cell membrane を含んだ部分に吸着されている。

この事から、両菌の Gr. J 耐性株は耐性獲得と同時に、Cell wall に何らかの変化をうけているのではないか、少くとも、Gr. J の透過性が低下している事は明らかであると思われる。Gr. J に感受性の低いグラム陰性菌 *E. coli* に Gr. J を作用させた場合は、Gr. J の吸着は非常によいが、Growing cell, Resting cell 共にその 50% が Cell wall の部分に吸着され、Ribosome の分割には約 35% が吸着されている。この事は、グラム陰性菌の Cell wall は相当量の Phospholipid が存在する事から、これに吸着されているのではないかと思われる。以上 6 菌株共 Gr. J を作用せしめずに同様処理した対照と比較して、蛋白質量、RNA 量の増加は認めないが、DNA のわずかな増加を認めた。とまれ、細菌に作用させた放射性の分布はグラム陽性菌、その Gr. J 耐性株、グラム陰性菌によつて異なる事は明らかである。

#### 〔質問〕

川俣順一(阪大微研)

耐性菌においては、放射性グラミシジン J は主として細胞壁に吸着されることを明らかであるから、充分量の薬剤が作用部位に達しないために耐性であると解釈できるが、出来得れば予め分割された各成分による吸着性に耐性株と感受性株との間に差があるかどうかを明らかにし得れば、一層興味あるのではないかと思われるが。

#### 〔回答〕

大谷象平(阪市大生化)

その点はまだ実験を行なつていない。我々は耐性獲得の 1 つの現象として細胞壁の変化を重要視しており、耐性菌の場合はグラミシジン J に結合するなんらかの物質が生じ、グラミシジン J の細胞質内への取り込みをさまたげていると考える。御発言のような実験を行なえば、この点を確実に実証できると考える。