

〔醸工 第44巻, 第7号, p.384~391, 1966〕

市販抗生物質の耐性ブドウ球菌に有効なる抗生物質の研究

(第2報) 耐性ブドウ球菌に抗菌力を有する放線菌 35NT 号菌の
生産する抗生物質について

田 中 達 郎

(大阪大学工学部寺本研究室)

Studies on an Effective Antibiotic Against *Staphylococcus aureus* Resistant to Commercial Antibiotics(II) A New Antibiotic Produced by *Streptomyces* 35NT Strain
Effective Against Resistant *Staphylococcus aureus*

Tatsuro Tanaka

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Osaka University, Higashinoda, Osaka)

Strain No. 35 NT of *Streptomyces* isolated from soil produces a new antibiotic which shown antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* which is resistant to commercial antibiotics.

Strain No. 35 NT has morphological and cultural characteristics resembling *Streptomyces celluloflavus*. By using a submerged culture in a suitable medium containing 1% glucose, 0.5% soybean meal, 0.5% peptone, 0.3% CaCO_3 , 0.5% NaCl, a No. 35NT substance was obtained.

For example, 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of antibiotic activity was obtained after 45hrs, using a 30 liter fermentor having an agitator speed of 300rpm and aerated at a rate of 1 vvm.

The crude antibiotic was extracted from filtrate of broth by adsorption on active carbon followed by acidic methanol elution.

Powder of the antibiotic were obtained by precipitating with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, eluting with pyridine and reprecipitating with ethyl ether. It is a slightly yellowish powder containing the nitro group and pentose. The molecular formula is $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$, and it decomposes at 238-240°C.

It is active against Gram-positive bacteria only, and inhibits growth of resistant *Staphylococcus aureus* at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

緒 論

前報で述べたごとく著者は、土壌より分離した放線菌、275 株から耐性ブドウ球菌を被検菌としてスクリーニングを行ない、グラム陽性菌にのみ抗菌力を有する群から耐性菌に有効な抗生物質を生産する放線菌 35NT 号菌

を撰択することができた。本報では 35NT 号 菌の菌学的性質, 培養条件, ならびに 35NT 号菌物質の抽出, 精製法, 理化学的性質, および抗菌性について検討した結果を報告する。

実験方法および結果

1. 35NT 号菌の菌学的性質 放線菌の分類に必要な菌学的性質 および 炭素源利用性について検討した結果はつぎのごとくである。

- 1) デンプン・ペプトン寒天培地 発育菌体は淡いクリーム色から黄色に変化する。気菌糸は白色から灰色となり, 培地中に黄褐色の色素を生産する。培地上に発生する気菌糸は, 交互に分岐し典型的な螺旋態を形成し, 胞子は楕円体である。
- 2) 合成寒天培地 発育菌体はクリーム色から橙褐色を示し, 気菌糸は灰白色から灰色に変化する。培地中に色素は生産しない。
- 3) Krainsky agar 発育菌体はクリーム色, 気菌糸は灰色, 培地中に色素を生産しない。
- 4) デンプン平板培地 発育菌体は灰色, 気菌糸は灰白色培地中に色素を生産しない。澱粉分解力がある。
- 5) リンゴ酸カルシューム寒天培地 発育菌体はクリーム色を示し, 気菌糸は白色から灰白色に変化する。培地中に灰褐色の色素を生産する。
- 6) 肉汁寒天培地 発育菌体はクリーム色, 気菌糸は白色, 培地中に淡黄色の色素を生産する。
- 7) チロシン寒天培地 発育菌体はクリーム色から灰白色, 灰色に変化する。気菌糸は灰色, 培地中に灰色の色素を生産する。
- 8) 卵培地 発育菌体は濃いクリーム色から褐色に変化する。気菌糸は白色, 培地中に黄褐色の色素を生産する。
- 9) リトマス牛乳 発育菌体は培地上部に輪状に発育し, 気菌糸は白色, 培地中に培養後 4 日目より黄褐色の色素を生産する。ペプトン化作用はあるが凝固作用はない。
- 10) 馬鈴薯培地 発育菌体は黄褐色から皺状の濃褐色に変化する。気菌糸は白色から灰色に変わり, 培地中に黒褐色の色素を生ずる。
- 11) 人参培地 発育菌体は白色から灰色に変化する。気菌糸は白色から灰色となる。培地中に淡灰色の色素を生産する。
- 12) ゼラチン培地 発育菌体は濃褐色, 培地中に色素の生産はない。ゼラチン液化作用なし。
- 13) 硝酸塩の還元性 亜硝酸を生産する。
- 14) 繊維素の分解力 なし。

なお, 18種の炭素源の利用性に関しては, NaNO_3 0.2%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.05%, FeSO_4 0.01%を基本組成にしてこれに 1%の各糖源を添加し, pH を 7.0 に調整した培地を作成し, 35NT 号菌の懸濁液を 1 白金耳接種, 32°C で培養した。培養後 2 日, 5 日, 10 日, 20 日目に菌体の発育状態を観察し, 最終的に記録したのが Table 1 である。

この菌学的性質および炭素源の利用性を基礎にして Bergey's manual of determinative bacteriology (1957) の *Streptomyces* に属している菌株と比較してみる。

本菌は菌体の色がクリーム色から橙褐色に, 気菌糸が白色から淡灰色, 続いて灰色に変化し, 有機物培地上に色素を生産しないか, 時々黄褐色の色素を生産する性質を中心にして比較したところ, 35NT 号菌に類似する性質を有する菌株としては数多くのものがあげられ, 特に菌体の色調, 気菌糸の形状, 色調の近似するものとして *S. flaveolus*, *S. celluloflavus*, *S. aurantiacus*, *S. flavogriseus*, *S. hygrosopicus*, *S. alboflavus*, *S. antimycoticus* などがあるが, 下記のごとき相違点を有している。

- S. flaveolus* : 合成寒天培地上の色調が全く類似しているが, ゼラチンを液化し, 牛乳を凝固する点で異なっている。
- S. celluloflavus* : 馬鈴薯上の発育は特に似ているが, 牛乳を凝固する点が異なっている。
- S. aurantiacus* : ゼラチン液化きわめて遅く, 気菌糸は spiral をつくり, 牛乳凝固しないで, ペプトン化する点などよく一致するが, 亜硝酸塩をつくらず馬鈴薯上褐色の色素を出す点が相違する。
- S. flavogriseus* : 気菌糸が curling type であり, 胞子楕円形, ゼラチン液化きわめて遅く, 寒天上色素を生

Table 1. Carbohydrate utilization of *Streptomyces* No. 35NT.

Kind of carbon source	Growth	Kind of carbon source	Growth
l-Arabinose	—	Inositol	++
Maltose	+++	d-Sorbitol	+
Mannitol	++	d-Fructose	+
Raffinose	++	Salicin	+
Lactose	+	d-Galactose	+
l-Rhamnose	+	Starch	+++
Inulin	++	Dextrin	++
Sucrose	++	d-Xylose	+
Glucose	+++	Glycerin	++

産しないので牛乳をペプトン化する点などきわめて多くの類似点を有しているが、馬鈴薯上で色素を生産せず牛乳培地で気菌糸を形成しない点で異なっている。

S. hygroscopicus : 房状の気菌糸をつくり、繊維素分解し、亜硝酸を作らない点が相違している。寒天上の菌色調など良く類似している。

S. albobiflavus : 菌糸が少し螺旋形を作る点、ゼラチン液化35日の点、色調、牛乳中の性質が似ているが、牛乳中の菌体が桃色の点異なり、気菌糸が白黄色にとどまる点が相違している。

S. antimycoticus : ゼラチンの液化弱く、合成培地上の色調、色素を生産しない点など良く一致しているが、Ca-malate 寒天上で緑色の色素を生産すること、馬鈴薯上の生産色素が褐色で、牛乳を凝固する点が相違している。

以上の考察よりいずれも2つまたは3つの相違点を有しているので本菌株と全く一致する菌株は Bergey の分類には見られない。したがってもっともよく菌体の色調などが *S. celluloflavus* に類似しているところからこの変異株と考え一応 *S. celluloflavus* var. 35 NT と命名した。

2. **35TN号菌物質の力価標準曲線の作成** 培養液からえた 35NT 号菌生産抗生物質を用い 1ml 当り 100 μ g, 80 μ g, 50 μ g, 10 μ g, 5 μ g, 3 μ g, 2 μ g となるように希釈し、*B. subtilis* を検定菌とするカップ法にて阻止円の直径を測定し、力価標準曲線、Fig. 1 をえた。

抗生物質力価 5 μ g/ml~80 μ g/ml の範囲にて両者の間につきの相関が見られた。

$$\alpha = 6.7 + 0.61 \log c$$

ただし、 α = カップ法による阻止円(mm)

c = 抗生物質力価 (μ g/ml)

5 μ g/ml 以下、80 μ g/ml 以上では、カップ法による検定は不可能である。

3. **35 NT 号菌の培養条件** 35 NT 号菌の抗生物質生産のための培地組成について検討した。用いた培地および培養結果は Table 2 のごとくである。

いずれも培地の初発 pH は7.0に調整した。500 ml 容量の坂口フラスコに 100ml の上記培地を注入し、30℃で72時間振盪培養を行なった。

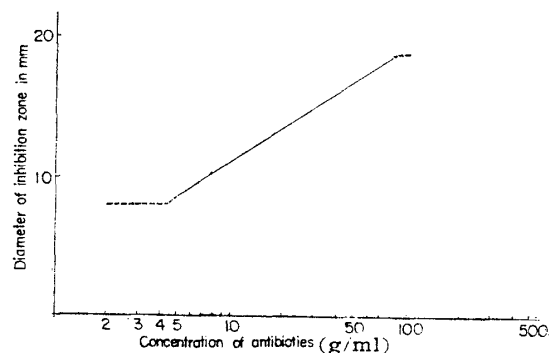


Fig. 1. Standard curve of antibiotic No. 35NT.

Table 2. Effect of medium composition on the production of 35NT antibiotic substance by shake culture.

Kind of culture medium	pH (72hr)	Potency ($\mu\text{g/ml}$) (72hr)
A	4.6	26
B	8.2	380
C	7.0	350
D	6.2	22
E	6.2	65
F	6.4	420

Composition of medium employed:

- A) { Starch 2%
Soybean meal 2%
- B) { Glucose 1%, CaCO_3 0.3%, Peptone 0.5%,
Soybean meal 0.5%, NaCl 0.5%
- C) { Starch 2%, CaCO_3 0.3%,
Soybean meal 2%,
- D) { Starch 1%, Glucose 0.5%, NaCl 0.2%
Peptone 0.7%, K_2HPO_4 0.2%, FeSO_4 0.001%
- E) { Glucose 1.0%, Beef extract 0.5%
Pepton 0.5%, NaCl 0.5%
- F) { Glycerin 2%, Glycine 0.25%, NaCl 0.1%, MgSO_4 0.05%
Corn steep liquor 0.5%, K_2HPO_4 0.25%, CaCO_3 0.1%

その結果(B), (C), (F)の培地が良好であったので, これらにつきふたび詳細なる培地組成および仕込容量の決定を行なった. 培地容量は 500ml 坂口フラスコに 3 種の (B), (C), (F)培地を 150ml, 100ml, 70ml, 50ml それぞれ分注したものをうい, 30°C で72, 96, 120時間後にそれぞれ pH および力価測定を行なった. 結果は Table 3 に示した. すなわち培地(B)においては72時間で pH 8.4 に上昇しており, 力価も最高に達するが, 96時間経過すると pH は変わらず力価は低下してくる. 培地(C)においては72時間でかなりの力価が出ているが pH が非常に不安定であり, 96時間では pH は上昇しているが力価は低下している. 培地(F)でも72時間で最高力価を示しているが, (B), (C)培地に比較して力価は低く96時間では多少 pH は上昇しているが, 力価はやや低下し, 120時間では急に pH が上昇し, 力価は経時的に低下してくる. したがって pH 変移および生産力価の安定している (B)培地を 35 NT 号菌の最適生産培地とし, 培養容量は 500ml 中 70~100ml と決定した.

このときの酸素吸収速度恒数は $5 \times 10^{-6} \sim 7 \times 10^{-6} \text{ g mol O}_2/\text{ml/hr/atm}$ である.

Table 3. Effect of culture medium and feed volume on the production of 35NT antibiotic substance by shake culture.

Kind of culture medium	Feed volume of medium (ml)	72hr		96hr		120hr	
		pH	Potency ($\mu\text{g/ml}$)	pH	Potency ($\mu\text{g/ml}$)	pH	Potency ($\mu\text{g/ml}$)
B	150	8.4	350	8.6	225	8.6	—
	100	8.4	425	8.7	400	8.8	—
	70	8.4	250	8.7	400	8.8	—
	50	8.4	200	8.7	200	8.8	—

C	150	5.4	94	5.8	70	7.2	—
	100	7.2	350	7.4	225	7.6	—
	70	7.8	400	8.2	380	8.4	—
	50	6.4	250	8.4	150	8.6	—
F	150	5.6	300	5.6	160	7.0	130
	100	5.8	380	5.8	230	7.8	170
	70	6.6	235	7.0	120	—	—
	50	7.0	35	7.0	24	—	—

つぎに前培養条件が本培養におよぼす影響について試験した。すなわち 500 ml 坂口フラスコに(B)培地 100ml を仕込んで前培養を行ない、24時間おきに生産用培地に 5 ml づつ移植して力価の測定を行なった。その結果は前培養時間を48時間、96時間としたものが本培養48時間目に最高力価がえられることを示した。両者間の生産力価の差異は認められなかったが、培養時間の短縮に有利な前者をとり以後48時間培養を採用した。つぎに通気攪拌タンクにおける培養試験を行なった。すなわち 180 l 培養槽に 100 l の(B)培地を仕込み48時間振盪フラスコ前培養を行なった培養液を 3%接種した。通気速度 1.0 vvm 攪拌機回転速度 300 rpm の稼動条件で深部培養を行なった結果の一例は Fig. 2 のごとくである。なお菌体量は培養液を遠心分離し 110°C で乾燥して求め、全窒素はケールダール法によりまた残糖は Somogyi 変法によりそれぞれ測定した。振盪培養に比較し、生産は早く通常 40時間前後で最高力価に到達する。さらに 30 l 容量のジャファーメンターに 20 l の培地を仕込み、通気量 1 vvm の一定値とし攪拌数を 200, 300, 400 rpm に変更して生産性を検討した結果は Fig. 3 に示す通りである。

すなわち 400 rpm において著しく生産が抑制されている。この操作条件下の k_d の値はそれぞれ 2.4, 6.0, 9.0×10^{-5} g mol/ml/hr/atm であり、その範囲における酸素溶解速度恒数がこのような極端な影響をあたえたと考えられず、恐らく過剰攪拌の影響によるものであろう。また培地組成濃度を 2 倍強度にして 300, 400 rpm の条件で培養した場合生産性は 300 rpm で著しく増加したが、同様に 400 rpm においては生産が抑制された。この結果は Fig. 4 に掲示した。

〔IV〕35NT 物質の抽出精製法と理化学的性質

4. 抽出精製法 培養液の pH を 7.0 に硫酸で調整し、1%活性炭を添加して、抗生物質を吸着せしめる。pH 2 の硫酸酸性メタノールでこの活性炭から抽出を行ない、メタノール溶液を pH 4.0 に調整後真空濃縮し、この濃縮水溶液に硫酸を添加し塩析を行なう。沈澱を除去し、ふたたび濃縮後メタノールに可溶性の区分を採取する。メタノール溶液は pH 2 にした後短い活性炭のカラムを数回通過せしめることにより脱色し、真空濃縮後ピリジンに溶解せしめる。ピリジン溶液を濃縮し、ピリジンを除去した後メタノールに溶解し脱水後 5 倍量のエーテルを添加し低温に維持すれば微黄色の粉末を生ずる。さらにメタノール、エタノールにて再結すれば、不定形の粉末をうる。培養液からの 35NT 物質の精製収率は約 12% である。なお着

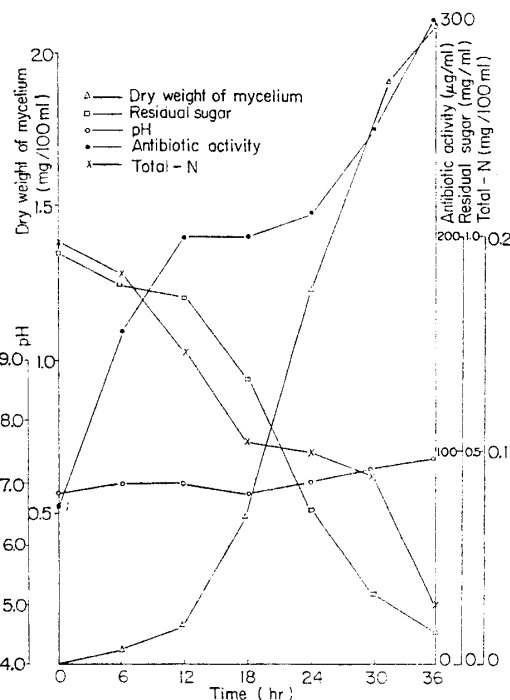


Fig. 2. Time course of submerged culture of the strain 35NT in 180 l fermentor.

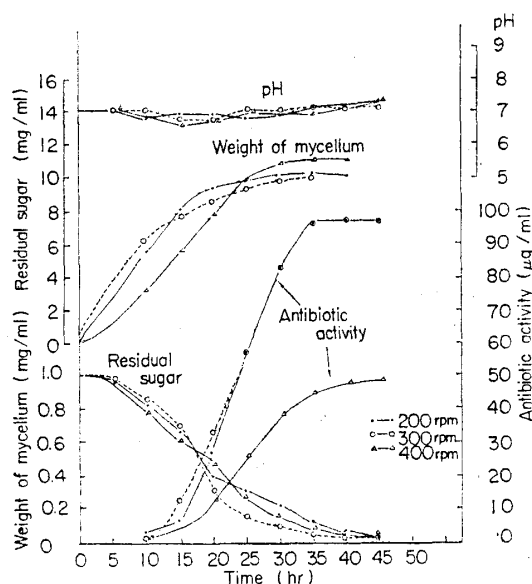


Fig. 3. The effect of aeration-agitation on the production of 35 NT substance.

Medium:		Aeration: 1vvm	
Glucose	1.0%	K_d :	
Pepton	0.5%	200 rpm	2.4×10^{-5}
NaCl	0.5%	300 rpm	6.0×10^{-5}
Soybean meal	0.5%	400 rpm	9.0×10^{-5}
CaCO ₃	0.3%	g mol/ml/hr/atm	
pH	7.0		

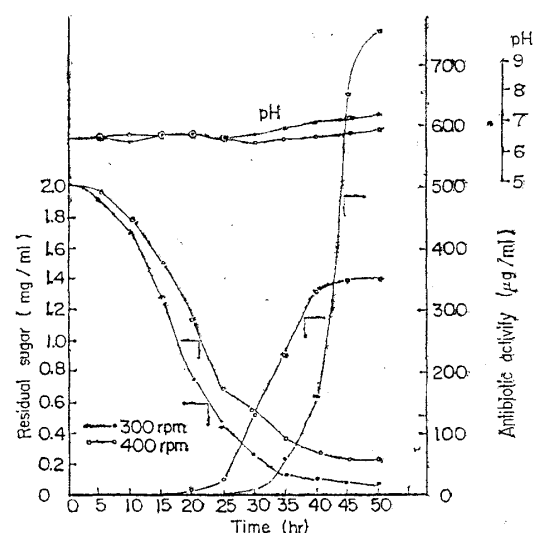


Fig. 4. The effect of agitation on the production of 35 NT substance using the concentrated medium.

Medium :		Aeration: 1vvm	
Glucose	2.0%		
Pepton	1.0%		
NaCl	0.5%		
Soybean meal	1.0%		
CaCO ₃	0.5%		
pH	7.0		

色の著しい場合には透析法で除去することができた。

2) 理化学的性質

- i) 元素分析 C : 44.39% N : 7.70%
 H : 6.62% O : 42.29%
- ii) 分子量 : 380 (水溶液使用による微量拡散法)
したがって分子式としては $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ となる。
- iii) 分解点: 238~240°C
- iv) 紫外部吸収: Fig. 5 に示すごとく, 特定の紫外部吸収は認められない。275 mμ の位置の弱い肩は NO₂ 基によるものと考えられる。
- v) 定性反応: モーリッシュ, ペントース, 第一アルコール, ニトロ基, エステル, ニトリル基アンスロン, ウロン酸メチルペントースの反応が陽性で, その他アニリン酢酸, 塩化鉄, 坂口, キサントプロテイン, ビューレット, ニンヒドリン, フェーリング, 銀鏡, エルソン-モルガン, ヘキソーズ, ケトーズ, 第二, 第三アルコールの反応はすべて陰性であった。
- vi) 赤外線吸収スペクトラム: 結果は Fig. 6 に示すごとくである。すなわち 3.35μ のピークは -CH

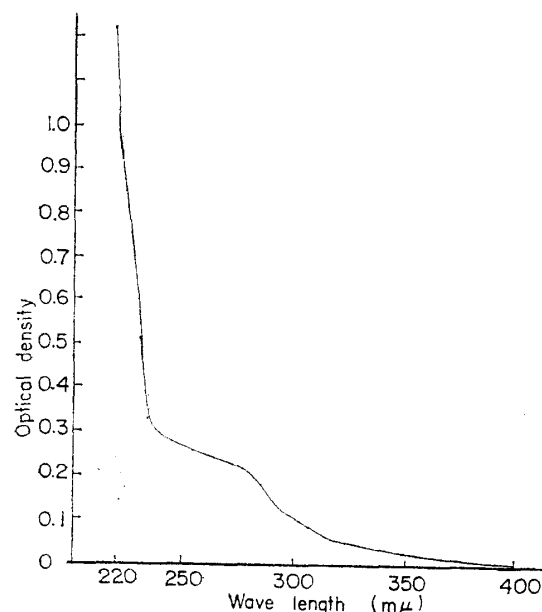


Fig. 5. Ultraviolet absorption spectrum of 35 NT substance.

の存在を, 6.0μ のピークはニトリル結合を, 6.5 , 7.0μ のピークはニトロ基の存在を示している。

さらに 9.0μ 附近のピークはエステルまたはエーテル結合の存在を示しており前述の呈性反応の結果とよく符合している。

vii) 溶解性: メタノール, エタノール, 水, ピリジンにもっとも良く溶解し, 酢酸エチル, 酢酸ブチル, クロロホルム, ブタノールにやや溶解する。しかし石油エーテル, ベンジン, エーテルには難溶である。

viii) ペーパークロマトグラム: 7種の溶剤に対する35 NT物質の summerized paper chromatogram は Fig. 7 に示すごとくである。

5. 抗菌スペクトラム 35NT号菌の生産した結晶の細菌, 酵母, 黴に対する最少発育阻止濃度は Table 4 に示す。すなわち本物質はグラム陽性菌に対し $0.5\sim 1\mu\text{g/ml}$ の範囲で抗菌力を示し耐性ブドウ菌, 標準株には同等の抗菌力を示している。

考 察

結晶として単離した 35NT 物質は赤外線吸収スペクトル, 定性反応の結果から, ニトロ基を有することを特長とし, グラム陽性菌のみに抗菌力を示す抗生物質である。したがってニトロ基をもつ既知の抗生物質と比較することとする。既知の抗生物質として chloromycetin¹⁾, azomycin²⁾, aureothin³⁾, bovinocidin⁴⁾, cereviocidin⁵⁾ があげられる。しかし, azomycin は $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2\text{N}_3$ で水に不溶性であり, aureothin は抗黴性を有しており, bovinocidin は融点が $66\sim 67^\circ\text{C}$ でエーテルに易溶であり, cereviocidin は $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_4$ でアセトン, 酢酸エチル, クロロホルムに不溶でさらに酵母に抗菌力を示す点でそれぞれ明瞭に相違している。また chloromycetin は融点が $150\sim 151^\circ\text{C}$ で $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{Cl}_2$ であり, これも明白に異なる物質である。したがって 35NT 物質は全く新しい抗生物質であると考えられる。

結 論

ペニシリン, ストレプトマイシン, クロロマイセチン, テトラサイクリン, エリスロマイシンの5種類の市販抗生物質に対して耐性を獲得したブドウ球菌に抗菌力を有する抗生物質を生産する放線菌を土壌より分離し, 菌学的性質

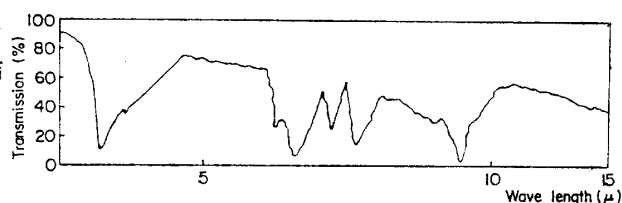


Fig. 6. Infrared spectrum of 35 NT substance (in KBr.).

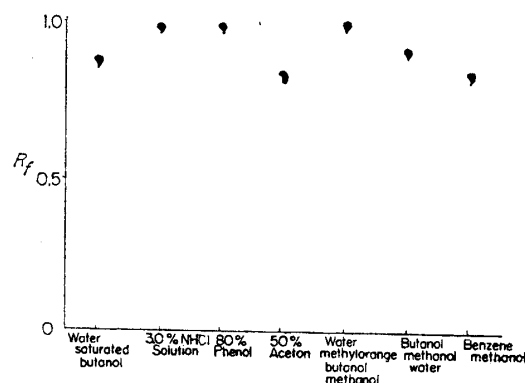


Fig. 7. Summarized paper chromatogram of 35 NT substance.

Table 4. Antimicrobiol spectra of 35NT substance.

Test organisms	Minimal inhibition concentration ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staph. aureus</i> Terashima	1.0
<i>S. aureus</i> 209 P	0.5
<i>S. aureus</i> resistant strain	0.5
<i>Sa. lutea</i> 3232	0.5
<i>E. coli</i>	>100
<i>B. megaterium</i>	25
<i>B. anthracis</i>	>100
<i>A. aerogenes</i>	>100
<i>B. subtilis</i>	0.25
<i>Ps. aeruginosae</i>	100
<i>Asp. niger</i>	>100
<i>C. albicans</i>	>100
<i>M. phlei</i>	0.5

を検討した結果, *Streptomyces celluloflavus* var. 35 NT と命名した. 35 NT 号菌の好氣的培養条件を決定し, 培養液から 35NT 号物質の抽出精製法を検討した結果, 活性炭吸着後酸性メタノールで溶解し, 塩析, ピリジン溶出後メタノール, エーテル溶媒にて 35NT 物質の粉末をうることができた. 本物質は分解点 238~240°C で, その分子量, 分子式は 380, $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ である. また構造中にニトロ基とペントーズを含有している新抗生物質であって, グラム陽性菌に対してのみ抗菌力を有することがみとめられた.

本研究の報告にあたり御指導を賜っている大阪市大医学部長, 大谷象平教授, 大阪大学工学部, 寺本四郎教授, 田口久治助教授に心から感謝の意を表します.

文 献

- 1) 住本: 抗生物質上巻 (1962).
- 2) Maeda, K. et al: *J. Antibiotics*, **6A**, 182 (1953),
Okami, Y. et al: *ibid*, **7A**, 53 (1954), Nitta
K. et al: *ibid*, **8A**, 120 (1955), S. Nakamura:
Pharm. Bull, **5**, 379 (1955), Ueda, M. Ume-
zawa, H.: *J. Antibiotics*, **8A**, 164 (1955).
- 3) Anzai, K., Okuma, K., Nagatsu, J., Suzuki,
S.: *J. Antibiotics*, **A15**, 110 (1962).
- 4) Anzai, K. et al: *J. Antibiotico*, **13A**, 121
(1960), Gorter, K.: *Gaertu, Bull, Jandin Bat*
Buitenzorg, (3) 2, 187(1920), *Chem, Abot*, 15,
575 (1921), Cater, C.L. et al; *Nature*, **164**, 575
(1949), Bush, M. T. et al: *T. Biol chem*, **188**
(2) 685 (1951), 中村: 農化, **38**, 909 (1954).
- 5) Yamashita, S. et al: *J. Antibiotics*, **8A**, 42
(1955).

(昭40. 9. 26 受付)