

好気性孢子形成桿菌類の抗生性に関する研究 Ⅲ ※

B. prausnitzii T. の1変株の抗生物質

松本宗人 (農産製造学研究室)

Muneto MATSUMOTO

On the Antibiotic Activity of Some Bacilli

(Ⅲ) Isolation and identification of the antibiotic
of a strain of *B. prausnitzii* T.

緒 言

前報^{1,2)}に於て、著者は好気性孢子形成桿菌類にしばしば観察される低度抗菌性に関心を抱き、たまたま「酵素肥料」から分離した、*B. prausnitzii* T. の1変株とみられる菌株の抗菌性を慎重に検討して来たが、引続き該菌株の抗生物質の分離を試み、抽出性を検討して活性物質を追跡した結果、抗生力の主体をなす物質を分離してジピコリン酸と同定したのでその経過の大約の概略を報告する。

この実験は前報と同当時のもので、御指導を賜った恩師片桐教授、北原助教授(当時)に対して、また、物質分離に当り種々御教示御援助頂き器具をお貸し下さった三井、中島両先生に対して深く感謝申し上げる。

実験と考察

1. 抗菌力の検定

前報^{1,2)}とほぼ同様に、供試液は水溶液としpHを中性付近に調整して、ゼイツ無菌ろ液として、肉汁の稀釈法で、すべて黄色葡萄球菌寺島株について行った。抗生物質を追跡するための便法として、抗生物質(または抗生物質群)の量を表わす単位を設定した。すなわち、対照試験管の寺島株の繁殖混濁度を(3+)、対照無接種管の濁度を(-)として、供試管の濁度が(±)(0.5)²⁾のとき、この管内の液の抗生物質濃度を1ml中に1au存在するものと仮定した。従って、この場合の試験管が2倍稀釈液であれば、試液の抗生物質濃度は上記の2倍で1ml中2auであり、また、10倍稀釈の試験管の繁殖混濁度が(±)(0.5)であればこの管の液は1auで試液の抗生物質濃度は10auとなる。さらにこの表示法を拡大して、繁殖混濁度が0.5以上の場合にも適用しうる

こととした。例えば、試験管の濁度が(+~2+) (1.5)であれば $0.5/1.5 = 1/3$ とみて $1/3au$ とし、(±~+) (1.0)ならば $0.5/1.0 = 1/2au$ とした。実例は下記の如くである。

試液 A (培養液ろ液) の抗菌力

稀 積 率	2 倍	5 倍	10倍
繁 殖 濁 度	±	+~2+	3+
試験管液の抗生物濃度	1 au	1/3 au	0au
試液の抗生物濃度	2 au	1.7au	/

試液 B (或る抽出液) の抗菌力

稀 積 率	5 倍	10倍	20倍	40倍
繁 殖 濁 度	-	±	+~2+	3+
試験管液の抗生物濃度	/	1 au	1/3au	0au
試液の抗生物濃度	/	10 au	7au	/

すなわち、この方法では、抗生物質の抽出前後の精密な収支算定は困難であるが大凡の見当は確実に示しうる。なお、抗生物質の絶対量を表わすためAUの単位を用いることとした。すなわち、1auの液10ml中の抗生物量は10AUとするが如くである。

2. 抽出性

供試液：加糖ペプトン水(ペプトン2%、ガラクトース0.5%、食塩0.5%、水道水、pH7.0)の1ℓを3ℓ容フェルンバック瓶に入れ(表面積：液容量=1.5強)、1気圧30分間加圧殺菌し、これに予め20ml肉汁に培養せるK8菌^{1,2)}を加えて、37°C2日間培養せる液をガーゼで菌体(膜)を除いて供した。この液の抗菌力は約2auであった。

予備的抽出実験：先づ予備的に2~3の溶剤による抗

* 納豆菌に関する生化学的研究, Ⅲ

生物質の抽出性を験したところ、中性エーテル抽出ではほとんど抽出されず、酸性エーテル抽出物には約20時間抽出で供試液の全抗菌力の約80%が抽出され、この場合抽出開始後17~18時間（液体連続抽出器）頃に受器エーテル溶液中に菊花状の小粒結晶を認め、分離して融点230°C付近（分解してピリジン臭を発す）なる物質であった。n-ブタノール抽出によっても抗生物の相当量が抽出され、ベンゼン、クロロフォルムでは抽出されなかった。

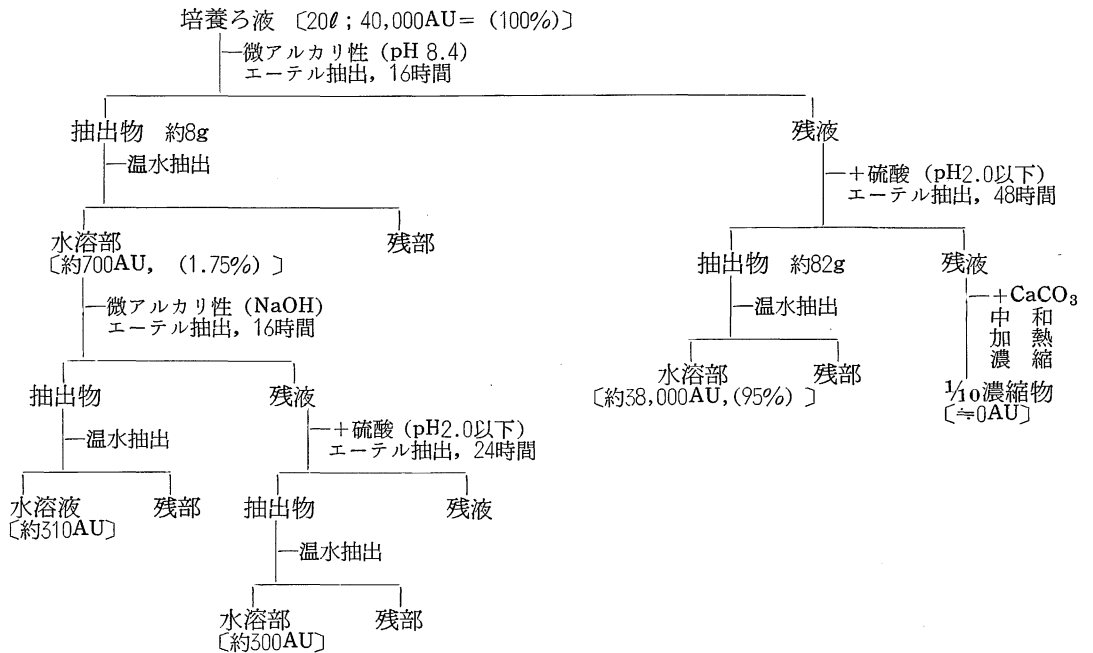
酸性エーテル抽出速度：上記の如く予備実験で、培地の抗生物の大部分が酸性エーテル抽出で分離しうることが分かったので、その抽出速度をしらべて、以後の操作に資した。すなわち、培地 115ml を供して液体抽出器で抽出して毎10時間の抽出物について抗生物抽出状況を観察した結果は次の如くであった。これによると、最初の10時間の抽出で約2/3を分離し、以後の抽出量は漸減す

供試培養液 (115ml)	全抗菌力	230AU	(100)
最初の10時間抽出物	"	140"	(61)
次の	"	40"	(17) (計78)
"	"	10"	(4) ("81)
"	"	7"	(3) ("84)
"	"	7"	(3) ("87)

るか50時間抽出後も約10%の抗生力が抽出されない。

系統抽出：Staudinger³⁾の方式を参照して試みた。先づ、微アルカリ性（培養液をそのまま、pH 8.4）でエーテル抽出して抽出性物質を除いてから酸性エーテルで抽出し、酸性エーテル抽出物の以後の処理を容易にした。京大農産製造学研究室型の1ℓ容連続抽出器を用いて微アルカリ性で16時間、酸性で40~48時間抽出して、培養ろ液1ℓより微アルカリ性抽出物を0.7~0.8g、酸性抽出物を7~9gを得た。抽出を重ねて種々検討した結果を綜合模式図すると第1図の如くになった。すなわち、供

第1図 培養ろ液の抽出と抗菌力の追跡 (1)

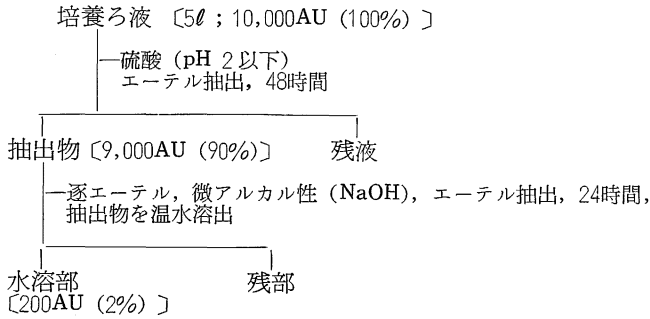


試培養ろ液の抗生力はほとんど全部 (95%) が酸性エーテル抽出物中に来ることを確認した。

アルカリ性エーテル抽出物：エーテルを逐って温水溶出せる水溶部 (pH 約6.0) は第1図に示す如く元の培養ろ液の抗菌力の約2%に相当する程度の抗菌力を持っていた。培養ろ液を直ちに硫酸酸性にしてエーテル抽出した抽出物を NaOH でアルカリ性にしてエーテル抽出

し、その水溶出液の抗生力を調べても、元の培養ろ液の約2%に相当する力価があった (第2図)。また培養ろ液を先づアルカリ性抽出せる抽出物の抗菌力の約半分が、このものの酸性エーテル抽出物中に来る (第1図) こと等から、抗生力ある中性物質の存在も考えられ、エステルの如きを想定して、培養ろ液を加熱加水分解したものを、別々にアルカリ性または酸性でエーテル抽出を行っ

第2図 培養ろ液の抽出と抗菌力の追跡(2)



てみたが、水解しない培養ろ液の抽出物の場合とそれぞれ同程度の抗菌力が認められた(培地を水解したものの酸性エーテル抽出物の抗菌力は無処理のそれよりも幾分高い)。従って抽出操作によって、培養ろ液の抗生物質の分解変化は無いが、有っても考慮の必要な程度と判断される。アルカリ抽出物の抗菌力は全体の抗菌力の極く一部に過ぎないから精査しなかったが、この水溶部の抗菌性は、低稀釈倍率では寺島株に殺菌的に作用していた。(試験管の液の大半を捨て、新しい肉汁を添加し保温することを重ねて、繁殖混濁の有無を観察)。

酸性エーテル抽出物：この水溶部は T. B. 試験紙を瓶口に近づけると変色し酸性蒸気の揮発を示し、液は強い酸性 (pH 2.2~2.4 以下) で、前述の如く、中和して抗菌力を検定した結果は、原培養ろ液のほとんど全部の抗菌力を有していた。この水溶部を水蒸気蒸溜して揮発酸部と不揮発酸部とに分けた見掛上の有機酸組成を調べた (Bernhauer⁴⁾ の方法等を参照した) 結果は第1、2表の如くで、酸度の主力は揮発酸部に在り、逆に抗菌

第1表 酸性エーテル抽出物の抗菌力

区 分	酸度 ($\frac{N}{10}$ NaOH)	AU
酸性エーテル抽出物水溶部 5ml	11.85ml (100)	1,600 (100)
全上, 水蒸気蒸溜抽出液 100ml	8.30 (70)	450 (28)
全上, 全上, 残溜液	3.55 (30)	1,200 (75)

第2表 酸性エーテル抽出物の酸組成

	滴定数 (水溶部1ml N/50NaOHml)	各酸量 (水溶部100ml 中 mg)
1. 抽出物水溶部	13.2	—
2. 揮発酸	9.1	—
3. 蟻酸	1.6	147
4. 酢酸 [(2)-(3)]	7.5	900
5. 不揮発酸 [(1)-(2)]	4.1	—
6. 乳酸	2.7	486
7. コハク酸 [(5)-(6)]	1.4	165

力の主力は不揮発酸部にある。酸根の抗菌性は鉄本⁵⁾も指摘している如く当然考えられるので、上の定量結果に基き試薬によって該当濃度の揮発酸部と不揮発酸部を調製して、寺島株に対する抗菌力を調べたところ、抽出物の揮発酸部の抗菌力の大半は含有酸根に基くことを示し、抽出物の揮発酸部の抗菌力は含有酸根に基くのは15分の1以下であった。

不揮発酸部の結晶：此の区分は上記の如く酸性顯著で、第一鉄反応は淡赤褐色、第二鉄反応は淡褐色、ビューレット反応陰性、ニンヒドリン反応陽性、芳香族アミノ酸反応弱陽性で、フェノール類の存在は否定的で、酸の存在を示していた。上記せる如く、酸性エーテル抽出中に受器に結晶性物質の出現を認め、このものが抗菌力を有することも観察しているため、該物質の取得を此の区分に於て試みた。すなわち、此の不揮発酸部を加熱濃縮し、充分濃厚液として冷却して菊花状乃至柱状の結晶の晶出をみた。母液はさらに濃縮して結晶を得、合計結晶物の収量は培養ろ液 5ℓ より約0.1g であった。融点 228~230°C (不補正) で融点で発泡分解してピリジン臭を発する。融点測定細管を石灰水(呼吸でわずかに濁りたる)に導くと発生ガス部に白濁を認め、炭酸ガスの発生を示した。大量培養ろ液より上記経路で此の結晶を分離し、熱水で再結して融点232~233.5°Cの結晶を得た。この物質を肉汁に溶解して0.4%溶液 (pH 2.4~2.6) とし中和後、抗菌力を調べた結果は寺島株に対して0.02%で抗菌性を示し、0.12%で发育完全阻止、0.2%以上では完全殺菌的に作用した、また供試 K 8 菌自体に対しても0.2%で明瞭に发育を害し、0.4%で发育を完全に阻止した。この抗菌力と収量とから算出すれば不揮発部の抗菌力の3分の1程度を満すのみであるが、おそらくこの物質が不揮発部の抗菌力の主体を、従って K 8 菌の培養ろ液の抗菌力の主体をなすものであろう。

この物質は、ビューレット反応陰性、ニンヒドリン反応陽性、第一鉄で褐赤色、第二鉄で淡褐色を呈し、水には難溶で、熱水に溶解し酸性を呈する。中性エーテルに

は難溶，メタノールにもエタノールにも *n*-ブタノールにも可溶でベンゾールやクロロフォルム，石油エーテルには難～不溶。元素の定性は窒素があり，硫黄やハロゲンは陰性である。融点でピリジン臭を発すること，炭酸ガスを発生することから，ピリジンのカルボン酸を想定した。やゝ太い細管でこの物質を加熱融解させると，管壁に昇華付着する白色物質があり，このものの融点は 134～135°C で，窒素を含有していて，ピリジン臭を発する。分離物質を加熱昇華して此の低融点物を集めたものにつき N 含量，滴定当量を調べたところ N は 11.21% で，ピリジンモノカルボン酸の理論値 11.38% に近似し，此の酸と想定すると滴定結果は 1 塩基性で，上の融点と併せて考えて，低融点物質をピリジンモノカルボン酸のうちのピコリン酸と判断した。従って高融点の分離物質をピリジンジカルボン酸のうちのジピコリン酸と想定した。C, H, N の定量結果は N : 8.20%, C : 50.18%, H : 3.24% で理論値 N : 8.38%, C : 50.30%, H : 3.00% に近似し，また滴定結果は 2 当量を要し，想定のおくジピコリン酸と判断した（融点は，Beilstein の記載よりも概して低いが，同書の値も区々で，226° (Zers.), 236°, 236～237° (Zers.), 237.5° 等である）。

このようなピリジンの誘導体が微生物体中に存在して抗菌性を呈していることは極めて興味深いことであり，同類のピリジン誘導体の抗菌性についての比較検討や，此の物質の産生機構について今後追究したいが，生成基質については前報²⁾で推論したペプトン，グルタミン酸等数種のアミノ酸等の N 化合物と考察したい。

摘 要

分離扁平培養基上で抗菌環らしきものを示した有孢子好気桿菌の 1 株で，*B. prausnitzii* T. の 1 株と同定した細菌の抗生物質を精査追究して，該菌の培養液中の抗菌性物質は極く一部が中性エーテル抽出物にある物質であること，一部が酸性エーテル抽出物中の有機酸（主に揮発性の）であることを，主体が酸性エーテル抽出性の不揮発酸部にあることを知り，該不揮発酸部より，抗菌性を有する結晶を分離し，ジピコリン酸と同定した。このものは培養液 5 l より 0.1 g 程度が得られ，黄色葡萄球菌寺島株に対して中性状態で肉汁中 0.02% で拮抗性を示し，0.12% で完全静菌的に，0.2% 以上で完全殺菌的に作用し，該菌自体に対しても 0.2% で抗菌し，0.4% で完全に静菌的に作用する。此の物質が供試菌の生産する抗生物質の主体と判断した。

参 考 文 献

1. 松本宗人：本誌，143.
2. 同上：同上，150.
3. STAUDINGER: Anleitung zur org. qual. Analyse, 2. Aufl., 26, 55,
4. BERNHAUER, K.: Gärungschemisches Praktikum, 2. Aufl. ('39)
5. 鉄本総吾：農化 17, 11, '41

Summary

The antibiotic(s) produced in the culture fluids by a strain of *B. prausnitzii* T. could be extracted with acidic ether.

Culture fluids of the organism were extracted with acidic ether and a main substance of the antibiotics was isolated (0.1 g from 1L of culture fluid) from the hot water extract of acidic ether extract.

The substance was identified with dipicolinic acid.