

螢光標識蛋白法による拮抗放線菌の血清学的研究

千葉大学医学部医化学教室(主任 三浦義彰教授)

千葉大学腐敗研究所抗生物質部(主任 新井 正教授)

黒 田 収 子

SHYUKO KURODA

(昭和38年1月10日受付)

目 次

<p>I. は し が き</p> <p>II. 螢光標識蛋白法による放線菌の血清学的同定の基礎的研究</p> <p>1. 実験方法および実験材料</p> <p> a) 被検放線菌菌株</p> <p> b) 抗原の作製</p> <p> c) 抗血清の作製</p> <p> d) 染色法</p> <p> e) 螢光顕微鏡装置</p> <p>2. 実験成績</p> <p> a) 凝集反応と螢光抗体法との力価の比較</p> <p> b) 抗原として栄養菌糸もしくは気菌糸を用いた際の力価の比較</p> <p> c) Autofluorescence の出現</p>	<p>d) 既知制癌抗生物質生産放線菌間の血清学的相関関係</p> <p>e) 考案および小括</p> <p>III. 螢光標識蛋白法を利用する拮抗放線菌の早期の同定</p> <p>1. 概 説</p> <p>2. Actinomycin 群生産菌</p> <p>3. Pluramycin 生産菌</p> <p>4. Quinoxaline 群生産菌</p> <p>5. 制癌抗生物質生産菌 <i>S. sp.</i> KS 1-42 および <i>S. sp.</i> SO 18-73 株</p> <p>IV. 考 察</p> <p>V. ま と め</p> <p>文 献</p> <p>附 図</p>
--	--

I. は し が き

Coons, Creech, Johnes, Berliner⁽¹⁾によつて1942年に、さらに Coons および Kaplan⁽²⁾によつて1950年に、特殊な螢光色素によつて標識された活性蛋白が、その免疫学的反応性を損うことなく、種々な免疫学的生物現象を観察するために極めて好都合であることが示され、いわゆる Coons らの螢光抗体法が一応確立された。以来12年間に、たとえば組織化学の分野においてはアレルギー現象の追求、組織の同定、ウィルス学の分野においてはウィルス抗原の局在性の証明に、細菌学の分野においては細菌菌体成分による組織反応の観察、当該微生物の所在の証明、あるいは血清学的同定にと、あらゆる生物学の領域において、この研究法が活用されるに至っている。

また一方これにともなつて、その術式も複雑、困難な Coons の原法は、Riggs 等(1958)⁽³⁾により緑黄色螢光抗体用としてはほぼ理想に近い Fluorescein isothiocyanate を使用する簡便なものに改良され、

ついで標識法にも工夫がこらされた。また染色法についても従来の直接法に加えるに間接法(Weller & Coons, 1954)⁽⁴⁾、補体法(Goldwasser & Shepard, 1958)⁽⁵⁾がそれぞれ考案される等飛躍的な改良、進歩がとげられた。これらの詳細に関してはすでに Coons (1959)⁽⁶⁾⁽⁷⁾、Beutner (1961)⁽⁸⁾、川村(1961)⁽⁹⁾、田中(1961)⁽¹⁰⁾、伊藤(1962)⁽¹¹⁾⁽¹²⁾、浜島(1960)⁽¹³⁾、等の総説が見られる。

微生物学の領域における螢光標識蛋白法の応用は、主として診断、疫学方面であるが、その細胞の形態の特異性の点から従来の血清反応を行うことの困難な糸状真菌の同定も考えられたことは当然であろう(Vogel & Padula, 1958)⁽¹⁴⁾および Gordon, 1959⁽¹⁵⁾等)。

放線菌抗生物質の研究に当つては、常に抗生物質生産株の迅速な同定の必要に迫られるが、放線菌(*Streptomyces*)の同定は現在、気菌糸の光学顕微鏡的、電子顕微鏡的形態、各種の同定用培養基上における発育の様相、気菌糸および栄養菌糸の色素の生産、種々な生理機能等を基準としている。したが

つて多年の経験と知識がなければ分類同定が不可能である上に、いまだに各研究者間による意見の相違も完全には調整されず、国際微生物学会においても毎回分科会をもうけて検討を続けている現状である。この様な困難を克服する一助として、拮抗放線菌の血清学的分類同定の試みはかなり多くの研究者によつて試みられてきた。

すなわち、秦等 (1953)⁽¹⁶⁾、横山および秦 (1953)⁽¹⁷⁾は拮抗放線菌の数株を使用し凝集反応、沈降反応、血球凝集反応による同定を試み、岡見 (1956)⁽¹⁸⁾は *S. lavendulae* に属する菌株について凝集反応による抗原構造を研究し、Solovieva 等 (1956)⁽¹⁹⁾は同様な研究から超音波処理による菌糸体が抗原として最適であることを報告した。真山 (1957)⁽²⁰⁾、1959⁽²¹⁾、原田および久保 (1959)⁽²²⁾、田中等 (1958)⁽²³⁾、1959⁽²⁴⁾も抗生物質生産能に関連して、放線菌の相互関係を血清学的な立場から研究している。

しかしながら、放線菌の血清学的同定を行うのに際して、この菌が真菌に類似した菌糸を生じて増殖する点は、抗原作製の際に常に当面する困難であり、また放線菌にはすでに岡見⁽¹⁸⁾および新井等 (1962)⁽²⁵⁾が報告している様に強い自然凝集を呈するものが少なくない。さらに音波処理を行つた抗原を使用する場合には同一の試験管内で凝集、沈降の両反応が生じ結果の判定を不明確にするなどの困難がまだ解決されていなかつた。

著者⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾は 1960 年以來、これらの難点を克服するために、螢光標識蛋白法の応用を企図し、Fluorescein isothiocyanate を使用する間接法により数種の放線菌について血清学的同定のための研究を行いほぼ満足し得る結果を得た。

今回はさらに抗癌抗生物質を生産する菌株 12 株を用いて実験条件の検討、従来の方法との比較等の基礎的研究を行い、被検放線菌間の血清学的相互関係を追求し、また前報に予想したようにこれら既知菌種による血清を用いて、本法を新たに土壤から分離した放線菌に施行し、拮抗放線菌としての同定を試みた。

II. 螢光標識蛋白法による放線菌の血清学的同定の基礎的研究

1. 実験方法および実験材料

a) 被検放線菌菌株

実験に供した放線菌菌株は表 1 に一括して示したように、既知抗癌抗生物質を生産するもので腐敗研究所抗生物質部に蒐集保存されている菌株および同部において、広範な土壤拮抗放線菌のスクリーニング計画によつて新たに各種土壤試料より分離されたものである。これらの菌株は glucose-asparagine peptone 斜面寒天 (glucose, 1.0%; $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.05%; asparagine, 0.05%; polypeptone, 0.05%; agar, 1.5~2.0%; pH 6.8~7.0) に継代保

表 1. 被検菌および生産物質

菌 種	生産抗生物質	由 来
<i>Streptomyces tanashiensis</i>	Luteomycin	Dr. Hata
〃 <i>antibioticus</i>	Actinomycin A	ATCC 10382
〃 <i>griseoluteus</i>	Griseolutein B	IAM W-11-10
〃 <i>echinatus</i>	Echinomycin	Dr. Hütter
〃 <i>aburaviensis</i>	Aburamycin	Dr. Mayama
〃 <i>chibaensis</i>	Cellocidin	Dr. Seino
〃 <i>sp.</i>	DON	Dr. Ehrlich
〃 <i>fragilis</i>	Azaserin	〃
〃 <i>erythrochromogenes</i>	Sarkomycin	Dr. Okami
〃 <i>pluricolorescens</i>	Pluramycin A & B	〃
〃 <i>filamentosus</i>	Caryomycin	〃
〃 <i>sp.</i> NIHJ 218	Actinoleukin	〃
〃 <i>sp.</i> O-2	Actinomycin group	腐研抗生物質部
〃 <i>sp.</i> OK 28-14	Pluramycin	〃
〃 <i>sp.</i> CK 147-8	Quinoxaline group	〃
〃 <i>sp.</i> KS 1-42	未同定物質	〃
〃 <i>sp.</i> SO 18-73	〃	〃

存された。

b) 抗原の作製

これらの菌を glucose starch bouillon (glucose, 0.5%; starch, 0.5%; meat extract, 0.5%; polypeptone, 1.0%; NaCl, 0.3%; pH 7.0) を 100 ml 宛 500 ml の振盪フラスコに分注したものに接種, 27°C, 48 乃至 72 時間振盪培養した後, 定常期に達した菌糸体を採取し生理的食塩水, 蒸留水で充分洗滌し, ホモジェナイザー処理後, 凍結乾燥した菌体を抗原としてデシケーター中に保存した。

c) 抗血清の作製

上記抗原を使用に際し再び十分にメノー乳鉢で磨砕し, 生理的食塩水浮遊液としてウサギ (2.5 kg 前後) の耳静脈内に隔日, 増量法をもつて注射, 免疫した。抗原量は菌体の毒性によつて異なるがおよそ 30~60 mg (乾燥重量) を使用し, 免疫に要した期間は大体 1.5~2 カ月であつた。免疫終了後全採血によつて得た血清は非働化後凍結保存した。

d) 染色法

振盪培養抗原もしくは保存培養基上の気菌糸を抗原とし, スライドガラス上に塗抹し, 30 分間メタノール固定を行つた。染色法は上記, 固定抗原をウサギ免疫血清 (非吸収あるいは吸収) で一次染色し, さらにウサギグロブリンに対するヤギ抗血清の硫酸半飽和分画を Fluorescein isothiocyanate で標識した蛍光標識蛋白液で二次的に染色する Weller & Coons⁽⁴⁾の間接法を用いた。洗滌は伊藤 (1960)⁽²⁸⁾ の buffered saline による方法をと, 包埋も同じく buffer-glycerol で行つた。

e) 蛍光顕微鏡装置

蛍光光源は, パーマレー短弧光超高圧水銀灯 100 W を, 光源部フィルター・千代田 BV (励起) および Y (吸収) と接眼部フィルター, イワキ Y₃ の組合せで暗視野装置を介して使用した。

写真は Neopan SSS を使用し ×400 の際には 5 分露出を行つた。

2. 実験成績

a) 凝集反応と蛍光抗体法との力価の比較

凝集反応は常法にしたがい, 抗血清を生理的食塩水で稀釈し, 抗原には振盪培養抗原をメノー乳鉢で充分に磨砕し比較的高濃度の菌浮遊液を作製これを 1 滴ずつ加え, 37°C に 1 時間保温, 室温に置き 1 昼夜経過後判定を行つた。また, 蛍光抗体法の力価は前報⁽²⁵⁾に示したように ×400 拡大下において, 細胞壁が黄緑色に染色された像を (+) と判定し, ×100

では黄緑色にみえても ×400 でみえぬものを (—) と判定した。

成績は表 2 に示したように, *S. erythrochromogenes*, *S. chibaensis*, *S. tanashiensis*, *S. antibioticus*, *S. echinatus*, *S. griseoluteus* および *S. pluricologrescens* の 6 株は凝集反応と蛍光抗体法 (栄養菌糸) とが非常に近似な力価を示した。しかしながら他の菌株においては, 両検査法の力価に相当の開きが見られ *S. aburaviensis*, *S. filamentosus* および *S. fragilis* は凝集反応力価の方が蛍光抗体法による力価の数倍であつたが, 一方 *S. sp. DON source* においては蛍光抗体法による力価の方が凝集反応力価より大であつた。

表 2. 凝集反応と蛍光抗体法による力価の比較

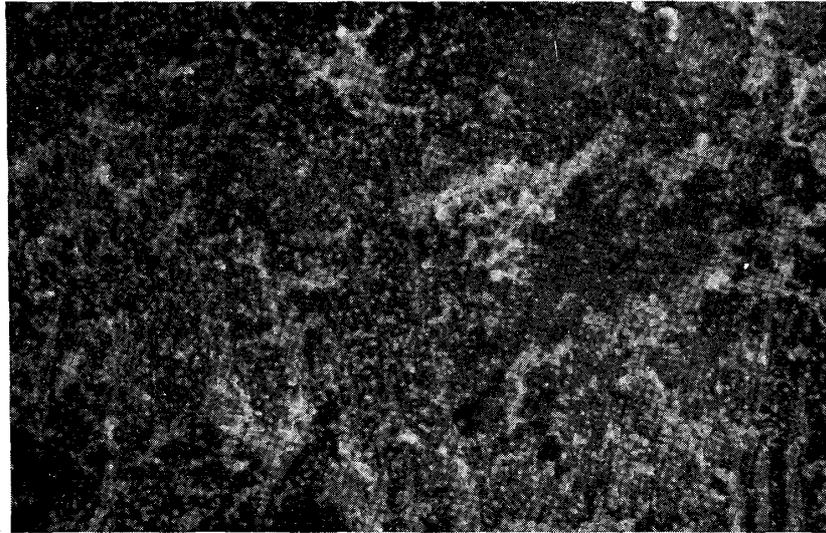
抗血清	抗原の種類	反応様式		
		凝集反応	蛍光抗体法	
		栄養菌糸	気菌糸	
<i>S. tanashiensis</i>		256	512	512
<i>S. antibioticus</i>		1024	512	128
<i>S. griseoluteus</i>		1024	512	256
<i>S. echinatus</i>		512	256	256
<i>S. aburaviensis</i>		512	128	128
<i>S. chibaensis</i>		2048	2048	512
<i>S. sp. DON source</i>		128	512	512
<i>S. fragilis</i>		512	128	—
<i>S. erythrochromogenes</i>		2048	2048	—
<i>S. pluricologrescens</i>		512	256	—
<i>S. filamentosus</i>		128	32	32

b) 抗原として栄養菌糸もしくは気菌糸を用いた際の力価の比較

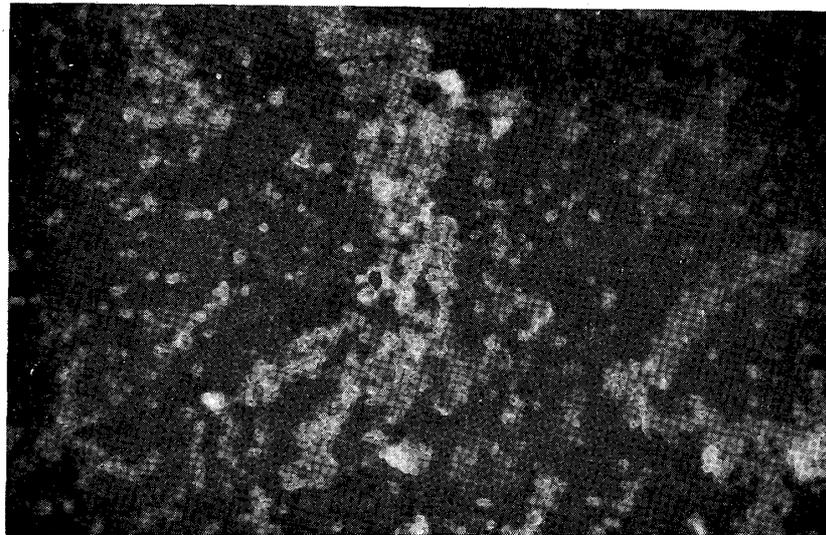
気菌糸着生能のある菌株についてその気菌糸を染色用抗原として使用し, 前記栄養菌糸抗原の際の力価と比較し表 2 に示した。使用した気菌糸は 8 株であつたが, *S. chibaensis* および *S. antibioticus* を除いては一応著しい差が認められなかつた。附図 (I) に気菌糸抗原の染色像を示したように成熟気菌糸は 1 μ 前後の分生胞子に断裂するため小拡大下では洗滌不良の為かとも考えられる像を呈する故, 栄養菌糸抗原の場合とは自ずから判定規準が異なつてくる。

c) Autofluorescence の出現

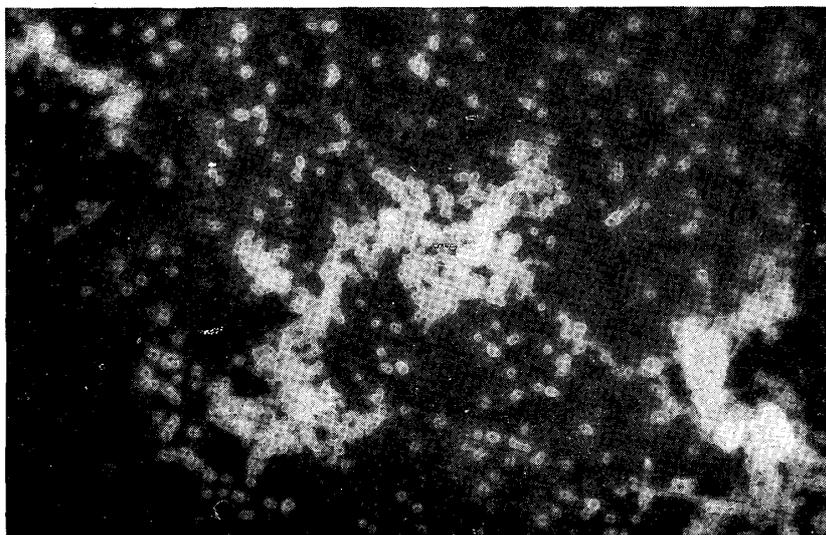
著者等が前報⁽²⁵⁾に報告した放線菌菌株および他に著者の行つた実験については, Autofluorescence の出現は全くみられなかつたが, 今回の実験におい



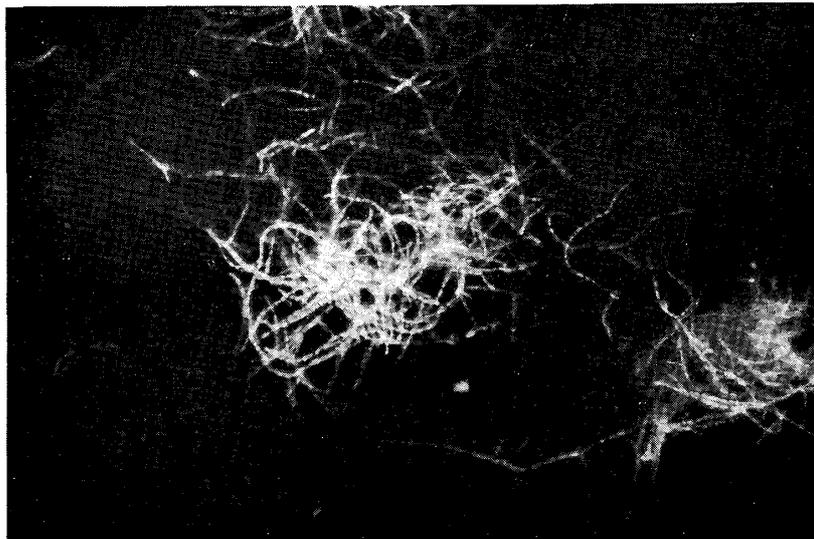
S. aburaviensis の気菌糸 (×100)



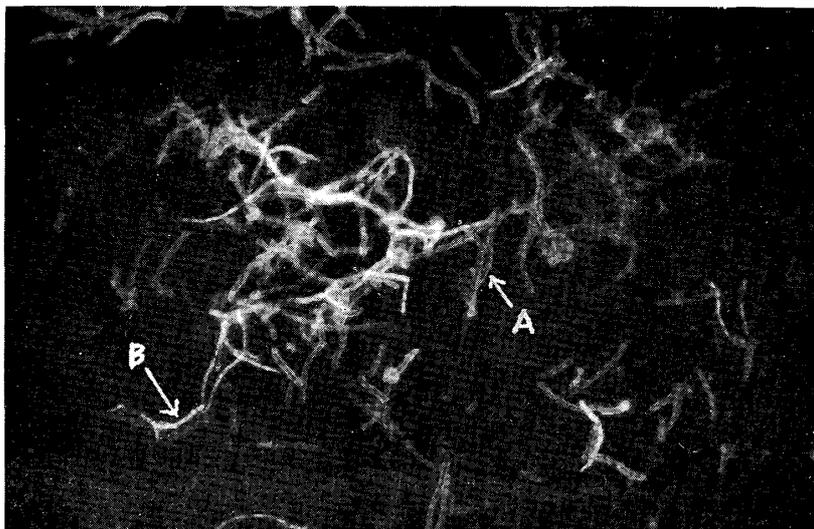
S. aburaviensis の気菌糸 (×400)



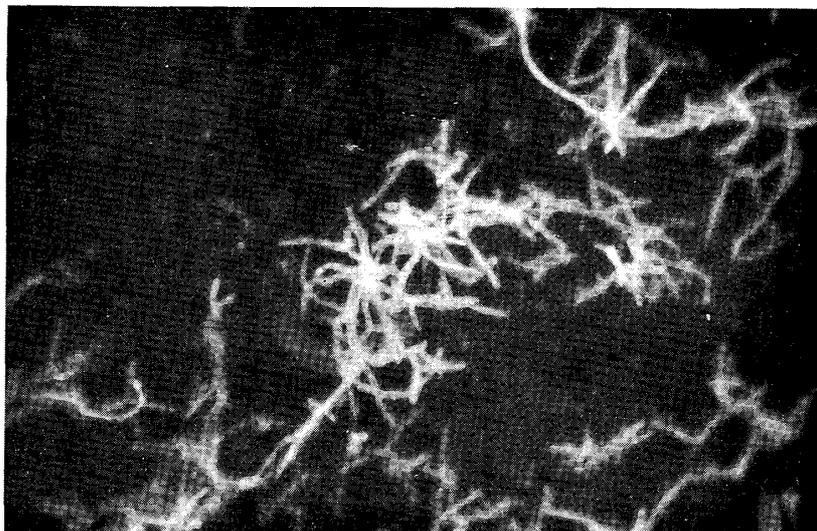
S. echinatus の気菌糸 (×400)



S. aburaviensis の栄養菌糸の Autofluorescence 判定 一
染色色素による蛍光はみえない (×400)



S. aburaviensis の栄養菌糸 判定 十, 染色色素の蛍光は細胞壁部分 (矢印 A) に, Autofluorescence は細胞中心部 (矢印 B) にみられる (×400)



S. aburaviensis の栄養菌糸 判定 卅
Autofluorescence は染色色素におおわれてみえない。

て唯 1 株 *S. aburaviensis* に橙赤色の Autofluorescence を見出した。しかしながら著者の使用した色素および光学系の組合せにおいては、螢光の色調が黄緑色と橙赤色で異なるとともに附図(II)に示したように、Autofluorescence は細胞内、Fluorescein isothiocyanate による染色像は細胞壁にみられ結果の判定規準に大した影響を与えぬものと考えられた。

d) 既知制癌抗生物質生産放線菌間の血清学的相関関係

既知制癌抗生物質生産菌の内、灰色の気菌糸の着生、合成培養基における黄色溶解性色素の生成等、生物学的性状の類似している菌種 6 株すなわち *S. tanashiensis*, *S. antibioticus*, *S. griseoluteus*, *S. echinatus*, *S. aburaviensis* および *S. chibaensis* について、それらの非吸収血清を用い血清学的相関関係を検査し表 3 に示した。

表 3. 既知制癌抗生物質生産放線菌間の相関性

抗血清 原	<i>S. tanashiensis</i>	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. griseoluteus</i>	<i>S. echinatus</i>	<i>S. aburaviensis</i>	<i>S. chibaensis</i>
<i>S. tanashiensis</i>	512	4	4	0	8	1
<i>S. antibioticus</i>	2	256	128	16	0	64
<i>S. griseoluteus</i>	0	8	512	2	0	0
<i>S. echinatus</i>	0	4	32	64	0	32
<i>S. aburaviensis</i>	0	1	16	1	128	0
<i>S. chibaensis</i>	2	32	128	64	0	1024

S. tanashiensis の抗血清は他の 5 被検菌に対し何等反応を示さず *S. chibaensis* の抗血清は *S. antibioticus* および *S. echinatus* 抗原に対し多少の反応を示し、*S. aburaviensis* の抗血清は *S. tanashiensis* 抗原と、*S. antibioticus* の抗血清は *S. chibaensis* および *S. griseoluteus* 抗原と多少反応した。また *S. griseoluteus* 抗血清は一般に他菌種抗原と比較的高い稀釈濃度で陽性反応を示したが *S. antibioticus* および *S. chibaensis* とは特に強かつた。すなわち、形態学および培養上の特徴の類似性にもかかわらず *S. chibaensis* と *S. echinatus* および *S. antibioticus* の間の弱い関係以外には上記菌種間には血清学的な強い相関性はみられなかつた。

e) 考案および小括

Slack 等⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾は 1961 年に著者等とほぼ時を同じくして螢光抗体法を嫌気性放線菌 *Actinomyces* 属に応用し良好な結果を得ている。著者等の先の報告に補足して行つた著者の基礎的研究より *Actinomyces* と同じ Order に属する *Streptomyces* 属の菌に対しても本法が同様に有用であることが確かめられた。前報⁽²⁵⁾において *S. toyocaensis*⁽³¹⁾ の気菌糸について、同種血清で栄養菌糸と同様に染色されることを報告したが、さらに今回の 8 菌種での力価測定の結果、ほとんどの菌種においてその力価に大きな相異が認められなかつた。この気菌糸抗原法は利用者にとって非常に安易かつ簡便に抗原を得、既知菌種抗血清を用いて、血清学的に菌種の同定を行うことを示している。しかしながら気菌糸を染色用抗原として使用する際には成熟した気菌糸が容易に分生孢子に断裂しその孢子が染色されるため栄養菌糸を抗原とした場合と異つた像を呈する(附図(I)および(II)参照)。したがつて標本の作製には栄養菌糸抗原の場合と異り、背景が一樣に染色されることもあるので常に対照と比較し基準を定める必要がある。他方、放線菌の血清学的研究には、その初期から凝集反応が利用される場合が多いが、抗原が菌糸状であることに加へ菌種によつて自然凝集がみられるのでその判定は観察者によつて異り、すこぶる困難であり正確を期しえないことはすでに知られた事実である。通常血清反応に螢光抗体法による力価を比較した時、真性細菌においては Thomason 等 (1957)⁽³²⁾ によれば *Salmonella* では載硝子凝集反応とは同程度であるが試験管内凝集力価よりは低いことが Kobanova 等 (1958)⁽³³⁾ によると *Shigella* では凝集力価より低いこと、また Beutner⁽⁹⁾によれば、その経験から一般的に補体結合力価と同じで沈降力価より高く凝集力価よりも低いことが報告されている。一応著者の判定法により凝集反応と螢光抗体法による力価を比較すれば上述のように凝集反応成績の判定はすこぶる困難であるが、螢光抗体力価とほぼ同一の力価が示されたと考えてよからう。またこの点からも放線菌の血清学的研究手技として螢光抗体法が安定かつ判定誤差の少ない方法として用いられるものであることを示すものである。

S. aburaviensis にみられた Autofluorescence は現在迄に 52 株 43 菌種についての実験の結果、ただ 1 株にみられたものであるが、この現象は危惧す

べきことである。しかしながら *S. aburaviensis* の場合は、標識に使用した Fluorescein isothiocyanate の発する色調とかけはなれた橙赤色系統の色調で、かつ染色部位の異なるものであつたが、よりひろくかつ多数の放線菌を検査すれば Autofluorescence を有する菌株あるいは菌種がさらに見出される可能性はある。

Autofluorescence に関しては病原性糸状菌の蛍光抗体法に際しての Vogel および Padula⁽¹⁴⁾ の報文中にもみられるがいずれの場合も Fluorescein isothiocyanate の色調より弱くかつ色調が異り区別することができる。

III. 蛍光標識蛋白法を利用する拮抗放線菌の早期の同定

1. 概説

拮抗放線菌の系統的研究が Waksman 等によつて開始されて以来、今日までに報告された放線菌抗生物質はすでに 1000 に達しようとしている。放線菌抗生物質の探索法は新しい生物学的化学的手技が取り入れられ次第に系統化されてきた。現在、それぞれの研究室の目的、歴史によつて多少の相違はあるにせよ原則的には土壌からの放線菌の分離、その拮抗作用の検索、液体培養より有効物質の抽出、精製という手続を経る。幾多の抗生物質がすでに知られている現在、物質を最終的に単離する以前に可及的早期の段階において、既知物質と比較同定することが新物質の発見には必須である。このために放線菌の菌学、抗生物質の化学等の面から最大の努力と研究がなされている。

近年、特に盛んとなつた制癌抗生物質の探索においては、この問題はさらに重要となる。すなわち制癌抗生物質のある種については、その培養濾液の力価の測定にはじまつて、抽出、精製の過程はすべて労力と動物材料を必要とする実験動物腫瘍による判定を待たねばならないからである。

著者等が蛍光抗体法の放線菌同定への応用をくわだてた理由の一半は既知抗生物質生産株の血清を利用してスクリーニングの第1段階において、新たに分離された拮抗放線菌の有効物質が新物質であるか既知物質であるかを予測出来ないかという考えであり、この可能性を検討するために著者らの新たに分離した放線菌を上記既知制癌物質生産菌血清で試験した結果と実際に有効物質を抽出して同定した結果を照合した。

2. Actinomycin 群生産菌

Actinomycin は制癌性を有する chromopeptide としてはじめて知られた物質であり、自然界において、発見された4種の Phenoxazone 色素(昆虫の眼色素 Ommatin, 担子菌のつくる色素 Cinnabarin および Cinnabarinic acid, Actinomycin, Questionomycin A) のひとつである。peptide 部分の構成アミノ酸組成によつて C₁, C₂, C₃, E₁, E₂, F₁, F₂, F₃, F₄, X₁, X₂, X₃, X₀₅, X₀₇, X₀₈, Z₀, Z₁, Z₂, Z₃, Z₄, Z₅, II, III 等の種類が知られており生産菌種も *S. antibioticus*, *S. parvus*, *S. parvullus*, *S. chrysomallus*, *S. murinus*, *S. galvus*, *S. fradiae* 等と多彩である。しかし最初に結晶性抗生物質としてえられたのは、*S. antibioticus* より Waksman によつて単離された Actinomycin A である。

著者⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾は 1958 年放線菌 O-2 株より Actinomycin 群物質を単離した。本菌株は既知菌株としては *S. xanthophaeus*, *S. rochei*, *S. cellulosa* にそれぞれ類似点を有する菌株であり、*S. antibioticus* の菌学的性状との比較は表4に示したごとくである。

表4. Actinomycin A 生産 *S. antibioticus* および *S. sp.* O-2 株の生物学的諸性状の比較

	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. sp.</i> O-2
相異点	Sporophore の形態 溶解性色素 (合成培養基上) Chromogenicity	no spiral yellowish positive
類似点	気菌糸の色 Proteolytic activity Starch hydrolysis	loop~spiral deep yellow negative gray positive positive

本菌株の生産する有効物質は培養濾液よりブタノールによつて抽出され、粗物質はさらに 50% アセトンより再結晶され橙黄色絹糸状の結晶として得られ 133°C で融解した。紫外部吸収、IR スペクトル、定性反応から、Actinomycin 群に属する物質と同定されたものである。

表5. Actinomycin A 生産 *S. antibioticus* と *S. sp.* O-2 株の血清学的関係

抗血清(吸収)原	<i>S. antibioticus</i>	
	(なし)	(O-2)
<i>S. antibioticus</i>	128	128
<i>S. sp.</i> O-2	64	0

しかしながら表 5 に示した様に Actinomycin A 生産 *S. antibioticus* との血清学的関係は少なかった。

3. Pluramycin 生産菌

Pluramycin は 1956 年竹内等⁽³⁶⁾によつて報告された *S. pluricologrescens* の生産する赤褐色の色素系抗生物質である。著者が腐敗研究所抗生物質部における土壤放線菌の制癌スクリーニングに際し得た、有効株 OK 28-14 株は Ehrlich 癌に有効であると同時にグラム陽性菌にも作用したが、表 6 および表 7 に示すように現在保有する既知菌種中 *S. pluricologrescens* の抗血清にのみ特異的に染色され、また本菌株で *S. pluricologrescens* の抗血清は完全に吸収された。すなわち第一次スクリーニングにおいて直ちに同定されたわけであるが、実際に両者の生物性状を精査したところ表 8 に示したようにきわめて近似し、かつブタノールによつて培養濾液より抽出された有効物質は溶解度、紫外外部吸収、IR スペクトル等の上で完全に Pluramycin と一致した。この場合は血清学的同定法が非常に有用であった例である。

表 6. 既知制癌物質生産放線菌抗血清に対する *S. sp.* OK 28-14 株の染色性

抗血清原	抗血清	<i>S. tanashiensis</i>	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. griseoluteus</i>	<i>S. echinatus</i>	<i>S. aburaviensis</i>	<i>S. chibaensis</i>	<i>S. sp. DON source</i>	<i>S. filamentosus</i>	<i>S. pluricologrescens</i>	<i>S. erythrochromogenes</i>	<i>S. fragilis</i>
	原	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—

×8 稀釈抗血清を使用

表 7. *S. pluricologrescens* と *S. sp.* OK 28-14 株の血清学的関係

抗血清原	抗血清 (吸収)	<i>S. pluricologrescens</i>	
	原	(なし)	(OK 28-14)
<i>S. pluricologrescens</i>		256	0
<i>S. sp.</i> OK 28-14		64	0

4. Quinoxaline 群生産菌

Quinoxaline 群抗生物質は Quinoxaline 骨格を有する peptide 抗生物質であり無色の物質であるが、発色団を有するという意味で Actinomycin と同様 Chromopeptide 抗生物質ということができ

る。この抗生物質も構成アミノ酸の相異によつて、種々なものが生産される可能性があり Echinomycin, Actinoleukin, Levomycin (この 3 者は同一物質と考えられている), Triostin, Quinomycin 等が知られている。

Actinoleukin 生産菌は *S. aureus* 類似株, Echinomycin 生産菌は *S. echinatus* とされているが, Levomycin, Quinomycin, Triostin 生産菌は未同定である。腐敗研究所抗生物質部において新たに分離された制癌性有効株 CK 147-8 は表 9 に比較したように Echinomycin 生産菌 *S. echinatus* の抗血清との間に高い力価を示さず、また吸収試験を行つても *S. sp.* NIHJ 218 株すなわち, Actinoleukin 生産菌の様な類縁関係はみられなかつた。また表 10 にみられる生物性状のうち、特に近年重視すべきとされている胞子の表面構造がまったく異つている。

表 8. *S. pluricologrescens* 生産株および *S. sp.* OK 28-14 株の生物学的諸性状の比較

		<i>S. pluricologrescens</i>	<i>S. sp.</i> OK 28-14
相異点	気菌糸の色 溶解性色素 (普通寒天上)	olive or pink brownish	tea-gray purple
類似点	Sporophore の形態 Spore surface Chromogenicity Proteolytic activity Starch hydrolysis	straight smooth none positive positive	

表 9. Quinoxaline 群生産放線菌 *S. echinatus* および *S. sp.* NIHJ 218 と *S. sp.* CK 147-8 株の血清学的関係

抗血清原	抗血清 (吸収)	<i>S. echinatus</i>		
	原	(なし)	(CK 147-8)	(NIHJ 218)
<i>S. echinatus</i>		256	256	8
<i>S. sp.</i> CK 147-8		64	0	8
<i>S. sp.</i> NIHJ 218		128	64	0

しかしながら有効物質は本菌株培養濾液より醋酸エチルによつて抽出され、白色結晶として得られ紫外外部吸収において 242, 325 m μ に吸収を示し、Quinoxaline 群抗生物質と考えられた。

5. 制癌抗生物質生産菌 *S. sp.* KS 1-42 および *S. sp.* SO 18-73 株

さらに制癌スクリーニングで選別された KS 1-42, SO 18-73 の 2 株は表 11 に示したように、上記

表10. *S. echinatus* および *S. sp.* CK 147-8 株の生物学的諸性状の比較

		<i>S. echinatus</i>	<i>S. sp.</i> CK 147-8
相異点	Spore surface	hairy	smooth
	溶解性色素 (合成培養基)	deep yellow	colorless to orange (on glucose-asparagine agar)
類似点	気菌糸の色	yellowish gray	white to gray
	Sporophore の形態	spiral	open spiral
	Chromogenicity		positive
	Proteolytic activity		positive
	Starch hydrolysis		negative (trace)

表11. 既知制癌物質生産放線菌抗血清に対する *S. sp.* KS 1-42 および *S. sp.* SO 18-73 株の染色性

抗血清原	抗血清										
	<i>S. tanashiensis</i>	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. griseoluteus</i>	<i>S. echinatus</i>	<i>S. aburaviensis</i>	<i>S. chibaensis</i>	<i>S. sp.</i> DON source	<i>S. filamentosus</i>	<i>S. pluricorensis</i>	<i>S. erythrochromogenes</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>S. sp.</i> KS 1-42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. sp.</i> SO 18-73	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

×8 稀釈抗血清を使用

の既知菌種抗血清には全く染色されなかつた。また実際に抽出、精製が行われた結果では、この両菌株の生産する有効物質は抗血清作製に用いた菌種の生産する制癌抗生物質とは全く異なることが明らかとなった(新井, 昭和37年度, 癌の基礎的研究班組織報告)。

IV. 考 察

前報⁽²⁴⁾において、著者等は蛍光標識蛋白法の放線菌の血清学的応用に関する諸条件を検討したが、さらに今回は凝集反応との感度の比較を行つた。すでに述べたように、放線菌の凝集反応を行うために各研究者は適当な抗原の作製法に困難を感じ超音波処理菌体が現在、最適であるとされている。しかしこの場合にもすでに指摘した様な欠点がある。

また放線菌の自然凝集による影響を除外する為に岡見⁽¹⁹⁾は 37°C 1 時間反応という早期の判定を行うことを提唱した。しかしながら実際には、この様な配慮を行つても放線菌菌糸体で凝集反応を行うこと

は極めて困難である。したがって今回行つた凝集反応力価と蛍光抗体による力価の比較も凝集反応力価については、必ずしも正確なものとはい得ない。しかし両者がおおよそ同一の価を示したことは真正細菌で行つた他の実験成績と一致する。

また放線菌気菌糸および胞子を抗原とした場合についてもさらに検討した結果、標本の作製法等に特別な注意を払わねば菌糸体を抗原とした場合よりは結果の判定が困難である。

放線菌の分生胞子は栄養菌糸と微細構造も異なり、したがって抗原構造も相異することが考えられ、菌糸体を抗原とした場合より一般に力価が低くあらわれる一因とも考えられる。

Autofluorescence は今回の実験および、さらに継続しつつある抗血清の作製に際し、ただ一つの出現例が見られたが、これは橙赤色系統の色調であり、Fluorescein isothiocyanate の色調とは全く異り、かつ蛍光標識蛋白が細胞壁に局在するのに反し Autofluorescence は細胞内部に局在する故、容易に区別しうるため大きな影響はない。

拮抗放線菌の迅速な同定の可能性について特に Actinomycin 群, Quinoxaline 群, Pluramycin 生産株および KS 1-42, SO 18-73 株をとりあげ検討した。

すなわち Pluramycin のように全く同一の物質を特定の菌種が生産する場合は第一次スクリーニングにおいて即座に同定することが出来ることを実証しえた。また現在保有している抗血清は制癌物質生産菌のすべてを含んではいないが、新鮮分離株に本法を応用してさらに追求すべき興味ある制癌物質生産菌を予測することも出来た。

しかしながら Actinomycin 群, Quinoxaline 群抗生物質のように、構造が非常に類似しているが完全に同一ではない抗生物質については全く異なる放線

菌から生産される場合も少なくなく、また1種の放線菌が僅かに構造の異つた数種の有効物質を同時に生産することもあり、必ずしもこの方法のみで同定することは出来なかつた。

V. ま と め

前報において螢光標識蛋白法による拮抗放線菌の血清学的手技を抗生物質スクリーニングの初期段階に利用しうることを予測したが、本報で数種の既知制癌抗生物質生産株を用いてさらに2,3の基礎的研究および制癌抗生物質生産新鮮分離放線菌の早期の同定への応用を試みた。

凝集反応と螢光抗体法での力価は、自然凝集の強い2,3の例外菌種を除いてはほぼ同一な結果が得られた。

螢光抗体法抗原として栄養菌系あるいは、気菌系を用いた際の力価を比較するとほとんど同じであつたが、一部に気菌系抗原の力価の方が低い場合がみられた。これは、気菌系と栄養菌系の抗原構造の相違に由来するとともに、気菌系が分生孢子に断裂したため生じた判定誤差と考えられた。

Autofluorescence を *S. aburaviensis* に見たが、標識に使用した色素 Fluorescein isothiocyanate の発する黄緑色と異なる橙赤色でかつ所在が異なるため、判定におよぼす影響は見られなかつた。

既知制癌抗生物質生産放線菌、特に gray の気菌系を着生し黄色系溶解性色素を生産する菌種について、血清学的相関関係をしらべたが、強い相関性は見られなかつた。

Pluramycin 生産菌株を本法によつて、早期に *S. pluricologrescens* と同定し得た。

Actinomycin 群あるいは Quinoxaline 群抗生物質は非常に多種類の放線菌によつて生産されるが、これらに属する抗生物質を生産する新鮮分離株に本法を応用した場合には、使用した抗血清が全く生物学的に類縁関係の乏しい菌種のものであつたためか血清学的な関連性は見られなかつた。

未同定物質を生産する2放線菌について、既知菌種との血清学的類縁関係をしらべたが、これら2株は全く異なる菌であると考えられ、また得られた物質も抗血清作製に用いた拮抗放線菌の生産物質と異つていた。

制癌抗生物質を生産する放線菌の出現頻度(10%)は一般細菌に対する拮抗放線菌(40%)に比して著しく少ない。

したがつて実験例数は少なかつたが、以上の結果からも、第一次スクリーニングにおいて既に判明している有効株の生物性状、抗菌スペクトラムとあわせ考慮すれば、螢光抗体法による同定は非常に有力な手段となり得るようである。

稿を終るに臨み、終始御鞭達を賜りました千葉大学腐敗研究所所長、相磯教授並びに種々御便宜を計られかつ御助言、御校閲を賜りました千葉大学医学部、三浦教授に衷心より感謝の意を表わします。さらに終始、御懇篤なる御指導御鞭達をいただき、論文の御校閲を賜りました千葉大学腐敗研究所、新井教授に深甚なる感謝の意を表わします。また腐敗研究所職員諸氏の多大なる御協力を心から感謝致します。

なお本研究は新井教授に与えられた文部省科学研究費によつて行われたことを附記する。

参 考 文 献

- 1) Coons, A. H., H. J. Creech, R. N. Johns & E. Berliner: J. Immunol., 45, 159, 1942.
- 2) Coons, A. H., M. H. Kaplan: J. exp. Med., 91, 1, 1950.
- 3) Riggs, J. L., R. J. Seiwald, J. H. Bruckhalter, C. M. Downs & T. G. Matcalf: Amer. J. Pathol., 34, 1081, 1958.
- 4) Weller, T. H. & A. H. Coons: Proc. Soc. exper. Biol. Med., 86, 789, 1954.
- 5) Goldwasser, R. A. & C. C. Shepard: J. Immunol., 80, 122, 1958.
- 6) Coons, A. H.: Schweiz. Z. Pathol. u. Bakteriolog., 22, 693, 1959.
- 7) Coons, A. H.: Schweiz. Z. Pathol. u. Bakteriolog., 22, 700, 1959.
- 8) Beutner, E. H.: Bacteriol. Rev., 25, 49, 1961.
- 9) 川村明義: 医学のあゆみ, 39, 336, 1961.
- 10) 田中信男: 自然, 16, 34, 1961.
- 11) 伊藤道夫: メディア・サークル, 34, 1, 1962.
- 12) 伊藤道夫: メディア・サークル, 35, 11, 1962.
- 13) 浜島義博: アレルギー, 9, 122, 1960.
- 14) Vogel, R. A. & J. F. Padula: Proc. Soc. exper. Biol. Med., 98, 135, 1958.
- 15) Gordon, M. A.: J. Bact., 77, 678, 1959.
- 16) 泰 藤樹・大木夏男・横山康彦・古賀文若: J.

- Antib. (Japan) Ser. B, 6, 57, 1953.
- 17) Yokoyama, Y. & T. Hata: J. Antib. (Japan) ser. A, 6, 80, 1953.
- 18) Okami, Y.: Giorn. Microbiol., 2, 63, 1956.
- 19) Solovieva, N. K., I. E. Elpiner & N. P. Fadeeva: Mikrobiologiya, 25, 684, 1956.
- 20) Mayama, M.: Ann. Rept. Shionogi Res. Lab., 7, 187, 1957.
- 21) Mayama, M.: Ann. Rept. Shionogi Res. Lab., 9, 1185, 1959.
- 22) 原田雄二郎・久保重夫: 日農化誌, 33, 45, 1959.
- 23) Tanaka, N., K. Karasawa, N. Miyairi, N. Shinjo, T. Nishimura & H. Umezawa: J. gen. Appl. Microbiol., 4, 259, 1958.
- 24) Tanaka, N., K. Karasawa, H. Yonehara & H. Umezawa: Symposium on taxonomy of actinomycetes, p. 13, 1959. Japan Antibiotic Res. Assoc., Tokyo.
- 25) Arai, T., S. Kuroda & M. Ito: J. Bact., 83, 20, 1962.
- 26) 黒田収子・伊藤道夫: 腐研報, 14, 113, 1961.
- 27) 新井 正・黒田収子・伊藤道夫: 日本体質学雑誌, 25, 537, 1961.
- 28) 伊藤道夫: 日本細菌学雑誌, 15, 672, 1960.
- 29) Slack, J. M. & D. W. Moore, Jr.: Bacteriol. Proc., p. 142, 1960.
- 30) Slack, J. M., Ann Winger & D. W. Moore: J. Bact., 82, 54, 1961.
- 31) 新井 正・小山泰正・黒田収子・森田武信・鳥井 静: 腐研報, 13, 45, 1960.
- 32) Thomason, B. M., W. B. Cherry & M. D. Moody: J. Bact., 74, 525, 1957.
- 33) Kobanova, E. A. & A. I. Glubokina: Zhur. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1, 5, Reprinted in J. Microbiol. Epidemiol. Immunol., 29, 3, 1958.
- 34) 黒田収子: 腐研報, 11, 51, 1958.
- 35) Kuroda, S.: Ann. Rept. Inst. Food Microbiol., 12, 66, 1959.
- 36) Takeuchi, T., K. Nitta & H. Umezawa: J. Antib. (Japan), Ser. A, 9, 22, 1956.