

放線菌の分離と同定

Isolation and Identification of the Actinomycetes

武市千代子

Chiyoko TAKEICHI

緒言

放線菌 (Actinomycetes) とよばれる微生物は歴史的には、カビの中の不完全菌 (Fungi Imperfecti) として扱われたこともあり (Harz 1877), 分裂菌 (Schizomycetes) として細菌の中に属されたこともある (Chester 1897)。その後多くの分類学者によって分類学的位置¹⁾について提案がなされている。細菌の分類体系として1923年以来最も広く採用されてきたのは Bergey's Manual である。これの最新版(8版, 1974)²⁾によれば, 原生生物 (Procaryote) 界の細菌類を19のグループに分けているが放線菌類は17番目のグループに属し, 分類学的群として放線菌目 (Actinomycetales) に入る。

放線菌は細胞形態学上では原核細胞 (Procaryotic cell) で核膜, ミトコンドリアは存在せず, 染色体の分化がないので有糸分裂をしない。また細胞の大きさは0.5~1.0 μ , lysozyme と抗菌性抗生物質に感受性, 細胞壁の化学的組成などの性質は細菌に似ている。それゆえ, 上述の第8版の Bergey's Manual においても細菌類の中に取り扱っている。一方培養の生育状態, 真性分枝をする菌糸をもつこと, 孢子形成様式 (不完全菌の分生子に相当する) などはカビに類似している。このように境界微生物 (Boundary microorganism) として生物分類学的に興味のある微生物群である。

放線菌はヒトや動物の放線菌症^{2,3)}(Actinomycosis), たとえば, ヒトの足趾のマズラ病 (*Streptomyces madurae*), ノカルジア症 (*Nocardia asteroides*) や植物の病害, バレイシヨの瘡痂病 (*S. scabies*)の原因菌として研究が始まった。しかし Waksman(1943)によって *Streptomyces griseus* から分離されたストレプトマイシンが発見されて以来, 多数の抗生物質生産菌として放線菌は工業微生物の中で重要な位置を占めるようになった。放線菌は細菌とカビの両者の代謝系をもっているので抗生物質はじめ, 酵素, ビタミン, ホルモンなど多種多様な二次代謝産物 (Microbial secondary metabolites)⁴⁾ が生産され, 工業的利用は多方面にわたり, 今後も新しい分野が開拓される可能性がある。

上述のように生物学的にも応用面にも重要な放線菌について, ここでは新しい菌株の探索に必要な分離法と放線菌の中で最も多数の種を有する *Streptomyces* 属の同定について述べる。また

筆者の行なった分離株の同定結果をもあわせて報告する。

I 分離法

病原寄生性放線菌を除き大部分の放線菌は腐生性 (Saprophytic) であり、広く土壌⁹⁾、空气中⁶⁾、水中^{2,7)}に生息している。特に好気性の *Streptomyces* 属の菌種は土壌から高頻度で分離されている。放線菌の分離培養には自然の生息状態^{2,8,9)}をよく調査し、培地、方法を検討すべきである。Mayfield¹⁰⁾らは土の試料を Homogenization 法によって検討した結果土や湖沼の泥中の *Streptomyces* は菌糸としてでなく大部分孢子として存在することを明らかにしている。William¹¹⁾らによると酸性土壌からは酸性培地にもみ生え、中性培地に生育できない acidophilic 放線菌を分離している。

放線菌の一般的分離法については William と Cross¹²⁾ の文献がある。細菌、カビなど他の微生物が共存する分離源から放線菌を能率よく分離するには後述の選択分離法が用いられる。

1. 希釈平板法 (Dilution plate method)

発育してくる菌株を分離採集できるばかりでなく、放線菌の分布を定量的に測定できるので最も広く用いられる。

1 ~ 5 g の土壌試料を無菌的に秤量して滅菌水または0.8%食塩水に懸濁する。分散をよくする場合には0.15%の plane agar^{13,14)}を希釈液に使用する。10分間バイブレーターにかけて振とうし、常法にしたがい 10^{-3} ~ 10^{-6} の希釈を行なって、ペトリ皿当り40~200のコロニーがでるようにする。希釈液1 mlずつをペトリ皿にとり、あらかじめ溶かして40~45°Cに保った寒天培地を加えて、よく混和し平板培養する(25°C, 10~14日)。平板法により分離または生菌数を測定する場合の注意事項は次の通りである。

(1) 前処理：土壌をあらかじめ風乾すると細菌の栄養細胞の数が減少し、放線菌の孢子は生存するので、分離源としては能率がよくなる。さらに風乾土に炭酸カルシウム^{15,16)}または粉末のキチンをまぜて25~28°Cに数日間放置後分離を行なうと100倍以上放線菌が採取される。上の試料に特に無孢子細菌が多いときは William¹⁷⁾らは熱処理(45°C, 2時間)を行なっている。処理時間は試料中の水分や土壌の水分保持力に影響される。

(2) 分離培地：炭素源としてはグリセロール、デンプン、キチン、窒素源としてはカゼイン、アスパラギン、アルギニンを含む培地がよい。starch casein 培地¹⁸⁾、glycerol arginine 培地^{16,19)}、chitin 培地²⁰⁾などが代表的分離培地として用いられている。これらの培地ではカビ類が放線菌をおおってしまう傾向が少ないからである。また放線菌は細菌にくらべて有機栄養源の低濃度で生育できるので上記の培地は細菌をおさえて、放線菌のコロニーが多くなる。野々村²¹⁾によると土壌中の *Microtetraspora* の緑色孢子群の分離には糖濃度をうすくした Czapek's agar (glucose 2 g/l) を用いている。

(3) 選択阻害剤：一般にカビは放線菌に比し生育が速い。特に土中に多い *Trichoderma viride*, *Mucor* spp. などのカビは平板全面をおおい、放線菌を分離できないことが多い。それゆ

え、actidione, nystatin, pimarcin などの抗真菌性抗生物質 (Antifungal antibiotics)^{19, 22-23, 24)} を使用する。これらの抗カビ物質の単独使用よりは併用の方が有効であることが Williams と Davies²⁵⁾により証明されている。starch casein 培地に actidione と nystatin をそれぞれ50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した培地が最も満足な結果を得ている。さらに彼等および野々村²⁰⁾らは土中の細菌をも阻止するために penicillin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と polymixin B 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培地を用いている。しかし、放線菌の中にはこれらの抗菌性抗生物質に感受性のものがあるので注意を要する。

一般にストレプトマイシン (SM) 生産菌は SM に耐性、クロラムフェニコール (CM) 生産菌は CM に耐性である。これを利用して、それぞれの抗生物質を培地中に添加してそれぞれの生産菌を効率よく分離することができる。

(4) 温度：大部分の放線菌は中温菌 (25~28°C) であるが好高温性 (Thermophilic) や耐高温性 (Thermotolerant)^{24, 26-27, 28)}な菌種については、それぞれ好適培養温度 (32~65°C) で分離すべきである。*Thermoactinomyces* 属, *Thermomonospora* 属, *Thermopolyspora* 属の菌種は好高温性である。

(5) 希釈液のプレート法：希釈液をプレートに注ぐ方法として流し込み法と分散方法がある。前者は上述の如く希釈液をまずペトリ皿にとり、その上に溶かした寒天培地を流し込むか、両者を混合して後ペトリ皿に流し込む方法である。後者は固めた寒天培地表面に希釈液をまいて分散させる方法である。これらの方法ではペトリ皿と培地の間、または寒天表面に生育の早い細菌がひろがりやすい。それゆえ、水のフィルムを除去する工夫が必要である。改良法としてあらかじめ water agar 10ml をペトリ皿に流して固め、その上に希釈液と培地の混和液を流し固め、2日培養後さらに water agar を流して “sandwich plate”^{12, 29)} とするとよい (triple layer plate)。

2. 土壌平板法 (Soil plate method)

Warcup³⁰⁾が土壌菌類 (Soil fungi) を分離するのに用いた方法である。直接少量の土 (約0.1 g) を滅菌したマイクロスパテルでペトリ皿に入れ、寒天培地をその上に流して、よくペトリ皿をまわし、試料を分散させて平板培養する。菌数の比較的少ない土壌からの分離に用いられる。また分離種数を多くする目的のみの場合はこの方法がよい³¹⁾。

II 分類と同定

1. 放線菌の分類

放線菌は生活環のある時期に菌糸を形成するグラム陽性の微生物群である。Bergey's Manual の8版では放線菌目に8科31属がふくまれている。従来放線菌の分類は形態的性質を主にした伝統的な分類法が行われてきた。すなわち種 (species) は形態によって表現される本質により認識されるという種の概念に基づくものである。しかしこの分類方法のみでは主観的観察による誤りや不確実さはまぬがれない。

最近分析機器を利用した細胞壁組成^{32, 33, 34)}による分類 (Chemotaxonomy) や全菌体の IR スペクトル^{35, 36)}による分類が提唱されている。また血清学的分類³⁷⁾、ファージ感受性³⁵⁾による分類

表 1. 放線菌の細胞壁の主要構成成分 (1, 32, 33, 34)

細胞壁タイプ	DAP		グリシン	アラビノース	ガラクトース
	meso-	LL-			
I	—	+	+	—	—
II	+	—	+	—	—
III	+	—	—	—	—
IV	+	—	—	+	+

他にすべて、グルコサミン、ムラミン酸、アラニンおよびグルタミン酸をふくむ

も試みられている。Adansonian の思想を Sneath が実用化した数値分類法が放線菌にも多く適用されるようになった。一方分子遺伝学的分類法^{42・43・44・45}すなわち、GC 含量の比較や DNA の相同性に基づく DNA—DNA 分子雑種形成法によるものが提出されている。これらの分類法のうち細胞壁組成の検討を除きまだ技術的困難さを伴い、普遍的な分類体系 (System of Classification) を確立するには至っていない。伝統的分類によるデータに上記の新しい分類法導入によるデータを加えることによって、菌種の分類学的位置づけがより正確性を増すことが望まれる。

2. 放線菌の属の検索

微生物の分類学での基本的な階段として属 (genus) は重要な意義をもつ。放線菌 (Mycobacteriaceae 結核菌科を除く) の属は最初 *Actinomyces* が Harz (1877) によって記載されて以来1960年までは10属余りであったが現在は44に達している。属への検索式は Waksman⁴⁶, Hütter⁴⁷, Lechevalier^{34・45}, Prauser⁴⁹, Baldacci⁵⁰ らが提案しているが普遍的に確立されたものではない。

第 8 版の Bergey's Manual では山口³², Becker³³ら, Lechevalier³⁴らの細胞壁組成の研究による細胞壁タイプ I ~ VIII のうち I ~ IV を検索式に取り入れている (表 1)。

放線菌目 8 科のうち最も大きな微生物群をなす Family VII Streptomycetaceae (科) は真正菌糸をつくり、腐生性、胞子をつくるが胞子のうはない。基中菌糸は分断されず、気菌糸に長く連鎖した分生子をつくる。細胞壁タイプ I の特徴をもっている。属への検索式は次のように記載されている。

〔I〕 胞子のうをつくらない。

A 非運動性胞子をつくる。

1. 胞子は車軸分枝胞子柄につかない。

Genus I. *Streptomyces*

2. 胞子は車軸分枝胞子柄につく。

Genus II. *Streptoverticillium*

B 運動性胞子をつくる。

Genus III. *Sporichthya*

〔II〕 胞子のう様 vesicle をつくる。

Genus IV. *Microellobosporia*

3. *Streptomyces* 属の分類

(1) *Streptomyces* 属の特徴：Waksman と Henrici⁵¹⁾により始めて1943年に公表された *Streptomyces* 属は地球上広く分布し、前述の如く放線菌の中で最も多数の species (種) を包括している。一般的特徴は次の通りである。

①細い多細胞の菌糸 (0.5~2 μ) をもち、②成熟した気菌糸には直径0.5~2 μ の胞子の長い連鎖を形成。③胞子表面は鞘でおおわれ、特徴のある種々の形態を示す。④気菌糸、基中菌糸は各種の色素を形成。⑤好気性、中温性(25~35°C) ⑥細胞壁組成はタイプ I で L diaminopimelic acid (DAP) をふくみ、アラビノースをふくまない。⑦第二次代謝産物の抗生物質^{52・53)}、酵素、ビタミンなどは微生物中で最も変化にとむ。⑧放線菌ファージ (Actinophage) に感受性。

(2) *Streptomyces* 属の分類の基準：*Streptomyces* 属の分類に貢献した次の研究者らは分類の基準 (criteria) として種々の形態的特徴をとりあげて、まず主なグループに分け種への検索を提唱した。Krainsky⁵⁴⁾ (1914, コロニーの大きさ)、Waksman⁵⁵⁾ (1916, 可溶性色素とタンパク分解力)、Jensen⁵⁶⁾ (1930, 可溶性色素)、Krasil'nikov⁵⁷⁾ (1941, 胞子柄の形態)、Baldaccie⁵⁸⁾ ら (1953, 栄養菌糸の色)、Hesseltine⁵⁹⁾ ら (1954, 胞子の色と胞子柄の形態)

Pridham⁶⁰⁾ らは菌種への検索の中間的なシステムとして 7 section に分け、さらに胞子の色により 6 series を設けている。彼等の胞子柄の形態図は現在観察記載に参考として利用されている。

放線菌に関して最も重要な古典として広く用いられた Waksman 方式 (1961)⁴⁶⁾ ではメラニン色素生成、気菌糸および生育の色、spiral 形成により *Streptomyces* 属菌種中に15の菌種群 (species group) を認めている。検索式は①胞子柄の性状、②メラニン色素生成の有無、③可溶性色素の有無および色、④気菌糸の色および発育の色、⑤タンパク分解力の強弱によって247種が検索できるようになっている。Krasil'nikov⁶¹⁾ (1970) は分類の基準として菌体の色を主にし、19群に分け、形態的に変らないが、生理的性質、生産する抗生物質の異なる型をすべて種として認めるという考え方にに基づき、820種が記載されている。Bergey's Manual の第8版¹⁾ では Pridham と Tresner は多数の種を比較する primary key として、胞子の色、胞子鎖の形態、胞子壁の性状、メラニン色素生成の4性質をとりあげ7series に分け、さらに炭素源利用によって、それぞれの表を引用して種の同定をしやすいようにしている (表2参照)。416種、47亜種 (subspecies) が記載されている。

(3) 標準菌株：1963年に“放線菌命名委員会”によって放線菌の命名法は国際細菌命名規約に従うことが提案された。すなわち標準菌株 (type strain)⁶²⁾を指定して保存機関に寄託することになっている。

表 2・放線菌の“種の表”へのPrimary Key
(Buchanan, Gibbons¹⁾)

TABLE 17.40
Primary key to tables of species^a

Melanoid pigment	Spore surface	White (W)		Gray (GY)		Yellow (Y)		Red (R)		Blue (B)		Green (G)		Violet (V)	
		RF	S	RF	S	RF	S	RF	S	RF	S	RF	S	RF	S
C+	SM	17.41a (751)	17.41c (751)	17.42a (758)	17.42c (764)	17.43a (793)	17.44a (804)	17.45a (820)	14.45b (820)						
	WTY														
	SPY		17.41d (751)		17.42d (768)		17.43c (802)		17.44c (808)		17.45b (820)				17.47b (826)
	H		17.41e (751)		17.42e (768)		17.44e (812)		17.44d (812)		17.45c (820)				
C-	SM	17.41b (751)	17.41f (753)	17.42b (762)	17.42f (771)	17.43b (795)	17.43d (802)	17.44b (808)	17.44f (814)						
	WTY				17.42g (782)		17.44h (818)		17.44g (818)		17.45f (820)				
	SPY				17.42h (782)		17.44i (818)		17.44g (818)		17.45f (820)				
	H				17.42i (786)										
?	?	17.41g (756)		17.42j (788)		17.43e (802)		17.44i (818)					17.46d (825)		

^a Melanoid pigments produced C+, not produced C-. Spore wall ornamentation: SM = smooth, WTY = warty, SPY = spiny, H = hairy (see Plate 17.13). Spore color *en masse* indicated as White (W), Gray (GY) etc. RF = Rectus flexibilis; spore chains straight or flexuous; S = Spira; Spore chains in form of hooks, open loops and coils (see Plate 17.12).
Figures in parentheses indicate page on which tables on utilization of carbon compounds may be found for each particular group or groups; descriptions of species covered immediately follow the table or begin on a nearby page.

標準菌株とは最初の培養またはその生物を最初に記載したときに著者が用いた分離株の子孫であって、その培養は純粋培養であり、その諸形質において原著の記載と一致する正基準標本 (holotype) という。したがって放線菌の分類、同定には重要な比較すべき基準標本である。高等生物の基準とする乾燥標本、液浸標本などと異なり、標準菌株は生きているタイプ (living type) であるので変異したり、死滅したりする危険がある。その場合は原記載と一致または近似するものとして新たに標本が選ばれ、これを neotype という。また標準菌株の指定外にある菌株を参考株 (reference strain) という。第7版の Bergey's Manual⁶³⁾には各種の原記載の文献は記されているが、種に指定された Type は記載されていない。しかし第8版ではすべての種または亜種の標準菌株は type strain(T), neotype(N), reference strain(R)が区別されている。

4. 同定法

(1) I S P : *Streptomyces* 属の種の同定は形態的、培養的、生理的性質を検討し、既知の菌種との比較によってなされる。従来多くの研究者によって認められた菌種の記載は一定培養条件に基づくものでなく、観察記載法も一定でないために同定するのに困難であった。また現在ほとんど標準菌株が存在せず、入手ができない状態である。

1958年第7回国際微生物会議がストックホルムで開催された際“放線菌命名委員会”によって分類基準試験に関する国際共同実験が提案された。1964年クロラムフェニコールの発見者である Gottlieb と Shirling が中心になり、国際放線菌共同研究 (International *Streptomyces* Project —ISP) が組織され、日本も入れて18ヶ国、44名の研究者が参加した。既に発表された菌種の菌株を世界各国から収集し、標準菌株の再検討を行なった。すなわち1グループ3ヶ国、3人以上の研究者によって一定の標準培地 (ISP 培地、米国の Difco 社で製造) を使用し、後述する一定の実験方法で検討し、これらの共同実験データを同一の観察記載法で Inter. J. Syst. Bacteriology⁶⁴⁾ に4編にわたって発表した。ISP によって再記載された菌株は458種に達している。試験に使用された菌株は ISP 番号がついており、すべての種について孢子柄の写真と孢子の電子顕微鏡写真が掲載されているので検討に利用しやすい。

ISP の標準菌株はアメリカ (ATCC), ソ連 (RIA), オランダ (CBS), 日本 (IFO, 発酵研究所) の微生物株保存機関に寄託保存されている。日本では日本放線菌研究会に ISP 菌株チェック委員会があり、IFO 株を4年毎にチェックして、変異の有無、純粋培養の可否を確かめることになっている。直接分譲依頼すれば IFO から入手することができる。

(2) 同定法：国際放線菌共同研究 (ISP) では、放線菌の安定な分類基準について標準方法で検討し、最少必要な菌学的記載を行なった。この同定の手引きが Shirling と Gottlieb⁶⁵⁾によって1964年発行された。なお同一の内容が Int. J. Syst. Bacteriology⁶⁶⁾にも発表されている。

①培地—放線菌の形態、培養および生理的性質の検討にあたって、9種の ISP 同定培地を用い、調製法も一定している。これらのうち合成培地は透明度が高く、組成の標準化が容易であ

る。一方複合有機培地では、たとえば、デンプン、酵母エキス、ペプトンなどは組成や製法が異なると均一なものが得られないおそれがある。それゆえ、一定の製品 (Difco) を使用することがのぞましい。なお寒天⁶⁷⁾の種類によって菌種の形態の分化、培養の色が影響されるので同一寒天を用いる必要がある。

②形態的性質—形態的観察には4種の同定培地を用いる。括弧内にISP培地の番号を記す。イースト・麦芽寒天培地 (No. 2), オートミール寒天培地 (No. 3), スターチ無機塩寒天培地 (No. 4), グリセリン・アスパラギン寒天培地 (No. 5)。それぞれの7, 14, 21日培養について次の顕微鏡的形態について記載する。

i) 孢子着生菌糸 (spore-bearing hyphae) の分枝法と形態: Pridham⁶⁹⁾らの提唱による形態分類を採用している。

単純分枝 (Simple)

直状—Rectus (R)

曲状—Flexibilis (F)

表3. 形態

性 質		HSA-B41-146	ISP-5002
胞子形成菌糸	分枝	(2)* 車軸分枝(MV), 単純分枝(S)	単純分枝
	(3)	" "	" "
	(4)	車軸分枝	" "
	(5)	" "	" "
	形態	(2)* 螺旋状(S), ループ状(RA)	ループ状, 曲状(F), 直状(R), 螺旋状
(3)	" "	ループ状, 螺旋状, 曲状, 直状	
(4)	" "	螺旋状, ループ状, 曲状	
(5)	" "	ループ状, 螺旋状, 曲状	
胞	数	(2)* 10-50	10-50
	(3)	" "	" "
	(4)	" "	" "
	(5)	" "	" "
	表面	(2)* 刺状 (0.1-0.2 μ)	刺状 (0.1-0.4 μ)
(3)	" (0.1-0.3 μ)	—	
(4)	" (0.1-0.2 μ)	" (0.2-0.6 μ)	
(5)	—	" (0.1-0.4 μ)	
子	大きさ	(2)* 0.6-0.9 \times 1.1-1.5 μ	0.4-0.7 \times 0.7-1.2 μ
	(3)	0.8-1.1 \times 1.3-1.5 μ	—
	(4)	0.9-1.0 \times 1.4-1.7 μ	0.4-0.7 \times 0.5-1.0 μ
	(5)	—	0.5-0.8 \times 0.8-1.4 μ

ループ状—Retinaculum-Apertum (RA)

ラセン状—Spira (S)

車軸分枝 (Verticillate)

単純分枝型—Monoverticillus (MV)

車軸分枝型—Biverticillus (BIV)

ii) 胞子 (spore)

a. 成熟した胞子着生菌糸の末端の胞子数

b. 胞子の形状と大きさ

c. 胞子表面構造⁶⁹⁾ (電子顕微鏡的形態, 8,000倍以上), 平滑 (smooth), イボ状 (warty) トゲ状 (spiny), 毛状 (hairy), a, b, c, いずれも培地名を記載する。

③培養的性質—培養コロニーの生育状態を肉眼的に観察する形態である (集落形態学)。前述の ISP 4 培地とさらにチロシン寒天培地 (No. 7), シュクロース・硝酸塩寒天培地 (Czapek's agar, C), グルコース・アスパラギン寒天培地 (Krainsky's agar, Kr), 栄養寒天培地 (Nutrient agar, N) を用いて, 生育の状態, 菌色の記載を行なう。菌色⁶⁹⁾とは

i) 発育の色: 基中菌糸の表面と裏面 (reverse) の色

ii) 気菌糸の色: 胞子のよく着生した表面のコロニーの色

iii) 培地への拡散性色素: メラニン色素以外の溶解色素

従来上記の色調については, 各研究者でまちまちに記載されてきた。ISP は化学的に組成の明らかな培地を用い, 一定の温度でペトリ皿で培養したものについて, 培養の経過にともなって観察することにした。放線菌の色調記載にあたっての標準法を求めるために26名で共同実験を行なった結果 Tresner⁷⁰⁾ の Color-harmony chip wheel 法によるものが100%の一致をみた。すなわち, 標準色表 (Container Corporation of America 作成) から放線菌の発現する色に近似の色をもった紙片を選び出し, グループ分けしたものを円周上に並べ, その中心に放線菌の平板培養したものをおいて比較し, その放線菌の色の属するグループを決める方法である。赤, 黄, 緑青, 紫, 灰, 白の7 series に分けられている。この標準色表が手許にないときは, 日本では“色の標準”⁷¹⁾ (日本色彩研究所刊行) を使用して色調を決定する場合もある。なお基中菌糸の裏面の色素および培地中の色素には0.05N NaOH または0.05N HCl を滴下して pH による色の変化を観察する。

④生理的性質

i) 生育温度範囲: 各種の恒温器 (0 ~ 45°C) で2種類の培地に培養して, 菌株の最高, 最適最低温度を調べる。

ii) デンプンの分解: スターチ・無機塩寒天培地 (No. 4) に培養し, 数日後ヨードヨード・カリ液を注ぎ, 培養部分の周囲に透明な部分が認められたら, デンプン分解陽性と判定する。

iii) ゼラチンの液化: ゼラチン培地に穿刺培養して18°Cで40日間まで培養する。液化の速度,

表4. 各培地における生育状態

性 質	HSA-B41-146	ISP-5002
生 育	(2)* 非常に良好 (3) 非常に良好 (4) 非常に良好 (5) 非常に良好 (7) 非常に良好 (C) 良 好 (Kr) 非常に良好 (N) 余り良くない	非常に良好 非常に良好 非常に良好 非常に良好 非常に良好 良 好 非常に良好 良くない
気菌糸の 色(A.M.)	(2)* 灰色(斑点非常に多い, うす黄) (3) 灰色(斑点多い ") (4) 灰色(斑点非常に多い ") (5) 白色(斑点非常に多い, 明るい茶灰) (7) 灰色(斑点少ない, 黄味灰) (C) 半透明、皮質(斑点なし) (Kr) 灰色(斑点少ない, 灰色) (N) 白色(斑点なし)	白 色 (斑点なし) 白 色 (" ") 白 色 (" ") 白 色 (" ") 灰白色 (" ") 白 色 (" ") 灰白色 (" ") 半透明、皮質 (斑点なし)
基生菌糸の 表面の色 (S.M.)	(2)* 灰味黄茶(8-19-6) (3) 無 色 (4) 無 色 (5) 無 色 (7) 灰味黄茶(5-16-2) (C) 無 色 (Kr) 無 色 (N) 無 色	無 色 無 色 無 色 無 色 無 色 無 色 無 色 無 色

形, 範囲を調べる。

iv) 脱脂粉乳の凝固: iii) と iv) はタンパク分解力を調べる目的で行なう。脱脂牛乳培地 (Waksman 41, 無強化脱脂粉乳100g, 蒸留水1000ml) に培養して凝固, ペプトン化 (透明の有無) を調べる。

v) 硝酸塩の還元: Bacto 硝酸塩液体培地 (No. 8) 10ml に 7, 14, 21日培養してサルファニール試薬 1ml とナフチルアミン試薬 1ml を加えて, 桃~赤色に変化すれば硝酸塩が還元されて亜硝酸塩が存在していることを示す。

vi) メラニン生成: ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (No. 6) とチロシン寒天培地 (No. 7) に 2~4日培養して, 緑褐~褐~黒色の色素を生産するものを陽性と判定する。

vii) 炭素源利用: 滅菌した Pridham-Gottlieb 寒天培地 (No. 9) を溶解し 60°C に冷やした後, エーテルで1夜滅菌した炭素源10%を加える。通常10種の炭素化合物 (表6) が使用される。セルロースは陰性のものが多いので現在は調べなくてもよい。なお Bergey's Manual の第8版で

に上記の炭素源にさらに D-ガラクトース， サリシンが加えられている。炭素化合物の無添加培地を対照とする。大抵線菌は対照培地でも可視的に少し生育するがこれと生育を比較して利用性を判定する。

表 5. 各培地における生育状態

性 質	HSA-B41-146	ISP-5002
基生菌糸の 裏面の色 (R)	(2)* 黄 茶 (7-16-3)	に ぶ 黄 (7-17-4)
	(3) オリーブ灰 (8-15-1)	う す 黄 (7-19-4)
	(4) 黄 味 灰 (8-19-1)	黄 (8-19-5)
	(5) うす黄茶 (7-18-3)	黄 (8-19-6)
	(7) 茶 (5-13-3)	黄 茶 (7-16-4)
	(C) うす黄茶 (7-18-2)	う す 黄 (7-19-2)
	(Kr) うす黄茶 (7-17-3)	う す 黄 (8-19-4)
	(N) う す 黄 (7-19-2)	黄 味 灰 (7-19-1)
培地中への 拡散性色素	(2)* 黄 (8-19-6)	赤 味 黄 (7-18-5)
	(3) うすオリーブ (8-18-2)	赤 味 黄 (7-18-5)
	(4) 明るいオリーブ灰 (8-18-1)	う す 黄 (8-19-4)
	(5) 黄 味 灰 (7-19-1)	黄 (8-19-5)
	(7) 明るい茶 (5-16-3)	明るい赤味黄 (7-19-5)
	(C) うすいだいだい (5-19-2)	黄 味 灰 (7-19-1)
	(Kr) う す 茶 (8-19-4)	う す 黄 (8-19-4)
	(N) 無 色	無 色

(2)* イースト・麦芽 寒天培地

(C) シュクロース・硝酸塩 寒天培地

(3) オートミール //

(Kr) グルコース・アスパラギン //

(4) スターチ・無機塩 //

(N) 栄 養 //

(5) グリセリン・アスパラギン //

(6) ペプトン・イースト・鉄 //

(7) チロシン //

III 分離株の同定

試験菌株に対しては、Waksman⁴⁶、Hesseltine⁵⁹、Pridham⁶⁰らの分類および ISP の標準菌株の記載⁶⁴を参考にして、菌学的性質を調べ、同定を行なった。

1. 菌株

HSA-B41-146の原株は北海道倶知安町の土壌から分離された。同定にさきだち菌株の安定性を確認するために単孢子分離を行なった。14日前培養のイースト・麦芽斜面寒天 (YM, ISP-No. 2) から菌体を取りガラスフィルター (G 3-3) でろ過し、常法に従い単孢子分離を YM 寒天上に行なった。計 702 のコロニー中には形態的変異株は認められず、培養的性質はまったく同じであった。

予備実験により試験菌の菌学的性質は孢子表面構造がイボ〜トゲ状，孢子着生菌糸がラセン状気菌糸の色が灰色，培地中への拡散性色素が黄色，メラニン様色素生成能が陰性であった。試験菌

に似たこれらの性質をもった対照菌種として、ISP 菌458種中から *Streptomyces chattanoognesis* ISP-5002を選び本実験を行なった（原株の記載は Burns⁷²⁾らによってなされている）。

2. 菌学的性質

菌学的記載に対する試験法は ISP の Manual⁶⁵⁾に従った。また色の記載は前述の“色の標準”⁷¹⁾によった。(1)形態、(2)各培地における培養状態、(3)生理的性質は表の通りである（表3～6参照）。

表6. 生理的性質

性 質		HSA-B41-146	ISP-5002
生 育 温 度	最 高	37°C	37°C
	最 適	25-30	25-28
	最 低	18	18
ゼラチンの液化		陽 性 (遅いが強い)	陽 性 (急速, 強い)
スターチの加水分解		陽 性 (強い)	陽 性 (強い)
凝 固 脱脂粉乳 ペプトン化	28°C	陽 性	陽 性
	37°C	疑わしい	陽 性
	28°C	陽 性 (遅い)	陽 性 (急速)
	37°C	疑わしい (21日)	陽 性
硝 酸 塩 の 還 元		陽 性	陽 性
メラニン様色素 (6)* の 生 成 (7)		陰 性 陰 性	陰 性 陰 性
炭 素 源 の 同 化 性	コントロール	**	—
	L-アラビノース	+ ~ ++	—
	D-キシロース	+	—
	D-グルコース	++	++
	D-フラクトース	++	+
	シュクロース	++	++
	L-ラムノース	++	—
	イノシトール	++	++
	ラフィノース	+++	+
	D-マンニット	++	++

** — 生育しない + 余り良くない ++ 良好 +++ 非常に良好

3. 考察

本菌は孢子着生菌糸がラセン状を呈し、気菌糸の色が灰色、培地中への拡散色素が黄色、メラニン様色素生成能が陰性から Waksman⁴⁶⁾ の *Streptomyces flavus* group に入る。また Hesseltine⁵⁹⁾らの Vla group (灰色の孢子, ラセン), Pridham⁶⁰⁾らの spira, gray series におかれる。また458株の ISP 菌⁶⁴⁾ から上述の菌学的性質および孢子表面構造がイボ〜トゲ状である

既知菌種を検索すると *Streptomyces chattanoogensis* ISP-5002があげられる。第8版の Bergey's Manual¹⁾でも本菌は gray series の Table 17・42h (GY; S; C-; SPY) に属する *S. chattanoogensis* に近似する。しかし次のような主な相違点がある。

① B41-146は表3で明らかなようにオートミール寒天培地(No. 3)を除く ISP 標準培地(No. 2, 4, 5)で大部分の孢子着生菌糸が車軸分枝を形成するのに反し (Fig 1~4), ISP-5002 はいずれの培地上でも単純分枝をなす (Fig 5)。また B41-146の孢子着生菌糸は密なラセン(S)を呈するのに、ISP-5002のラセンは粗であり、孢子着生菌糸が曲状(F), ループ状(RA)のものが多い。したがって B41-146は Monoverticillus Spira (MV-S), ISP-5002は Simple-S, F または RAの section に属する。

② B41-146の孢子表面構造は比較的短い突起 (0.1~0.2 μ) を有し、イボ状であり (Fig. 6~8), 一方 ISP-5002は細長い突起 (0.2~0.6 μ) を有し、トゲ状である (Fig. 9)。

③ イースト・麦芽寒天培地 (No. 2) およびスターチ無機塩培地 (No. 4) 上で菌叢の表面の色が B41-146は灰色でうす黄の斑点を生じるが、ISP-5002は白点で斑点が認められない (Fig. 10~12)。

④ B41-146はL-アラビノース, D-キシロース, L-ラムノースを同化するが、ISP-5002はこれら3種の炭素源を同化しない。

上記の4つの菌学的性質の差から B41-146は *S. chattanoogensis* とは異なり、新種と考えられる。新種としての同定は Waksman⁴⁶⁾ その他の記載を十分検討した上で今後行いたい。

要 約

一分離菌株の同定を行なったが B41-146は新種と認められる。新種の命名には、さらに詳細な検討が必要とされる。

参考文献

1. R. E. Buchanan and N.E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.), Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
2. G. Sykes and F. A. Skinner: Actinomycetales, Characteristics and Practical Importance, Academic Press, London-N.Y. (1973)
3. C. W. Emmons, C. H. Rinford and J. P. Utz: Medical Mycology (2nd ed.), Lea and Febiger, Philadelphia (1970)
4. 小山泰三: 細菌誌, **27**, 443 (1972)
5. A. B. Lloyd: J. gen. Microbiol., **56**, 165 (1969)
6. A. B. Lloyd: ibid. **57**, 35 (1969)
7. H. Weyland: Nature, **223**, 858 (1969)
8. P. H. Gregory, M. E. Lacey, G. N. Festenstein and F. A. Skinner: J. gen. Microbiol., **33**,

- 147 (1963)
9. 石沢修一, 蘭道生 : 日本放線菌研究会会報 **11**, 4 (1967)
 10. G. I. Mayfield, S. T. Williams, S. M. Ruddick and H. L. Hatfield : *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 79 (1972)
 11. S. T. Williams, F. L. Davies, G. I. Mayfield and M. R. Khan : *ibid.* **3**, 187 (1971)
 12. S. T. Williams and T. Cross : *Methods in Microbiology*, C. Booth (ed.), Academic Press, London-N. Y. (1971)
 13. G. C. Bhatt : *Can. J. Bot.*, **48**, 333 (1970)
 14. 徳増征二 : 日菌報, **15**, 135 (1974)
 15. P. H. Tsao, C. Leben and G. W. Keit : *Phytopathology*, **50**, 88 (1960)
 16. M. A. El-Nakeeb and H. A. Lechevalier : *Appl. Microbiol.*, **11**, 75 (1963)
 17. S. T. Williams, M. Shameemullah, E. T. Watson and G. I. Mayfield : *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 215 (1972)
 18. E. Küster and S. T. Williams : *Nature*, **202**, 928 (1964)
 19. J. N. Porter, J. J. Wilhelm and H. D. Tresner : *Appl. Microbiol.*, **8**, 174 (1960)
 20. Y. Lingappa and J. L. Lockwood : *Phytopathology*, **52**, 317 (1962)
 21. 野々村英夫, 小原巖 : 日本放線菌研究会会報 **17**, 3 (1970)
 22. E. L. Dulaney, A. H. Larsen and E. O. Stapley : *Mycologia*, **47**, 420 (1955)
 23. C. T. Corke and F. E. Chase : *Can. J. Microbiol.*, **2**, 12 (1956)
 24. R. Corbaz, P. H. Gregory and M. E. Lacey : *J. gen. Microbiol.*, **32**, 449 (1963)
 25. S. T. Williams and E. L. Davies : *ibid.* **38**, 251 (1965)
 26. P. H. Gregory and M. E. Lacey : *Nature*, **195**, 95 (1962)
 27. P. H. Gregory and M. E. Lacey : *J. gen. Microbiol.*, **30**, 75 (1963)
 28. C. L. Fergus : *Mycologia*, **56**, 267 (1964)
 29. L. J. Herr : *Phytopathology*, **49**, 270 (1959)
 30. J. H. Warcup : *Nature*, **166**, 117 (1950)
 31. 野々村英夫, 小原巖 : 醸工誌, **38**, 401 (1960)
 32. T. Yamaguchi : *J. Bact.*, **89**, 444 (1965)
 33. B. Becker, M. P. Lechevalier and H. A. Lechevalier : *Appl. Microbiol.*, **13**, 236 (1965)
 34. M. P. Lechevalier and H. A. Lechevalier : *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435 (1970)
 35. T. Arai, S. Kuroda and Y. Koyama : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 119 (1963)
 36. 黒田牧子 : 細菌誌, **27**, 451 (1972)
 37. J. B. G. Kwapinski : *The Actinomyceles*, Jena Int. Sym. on Taxonomy, H. Prauser (ed.), Gustav Fischer, Jena, p. 345 (1970)
 38. Y. I. Rautensen : *ibid.*, p. 337 (1970)
 39. H. G. Gyllenberg : *ibid.*, p. 107 (1970)

40. R. R. Sokal and P. H. A. Sneath : Principles of Numerical Taxonomy, Freeman & Co., San Francisco (1963)
41. V. B. D. Skerman : A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, Williams and Wilkins Co., Baltimore (1967)
42. T. Yamguchi : J. Gen. Appl. Microbiol., **13**, 63 (1967)
43. M. Okanishi and K. F. Gregory : J. Bact., **104**, 1086 (1970)
44. 岡西冒則 : 細菌誌, **27**, 435 (1972)
45. M. Okanishi : J. gen. Microbiol., **72**, 49 (1972)
46. S. A. Waksman : The Actinomycetes, vol. II. Classification, Identification and Description of Genera and Species, Williams and Wilkins Co., Baltimore (1961)
47. R. Hütter : Systematik der Streptomyccetenunter besonderer Berücksichtigung der von ihnen gebildeten Antibiotica, S. Karger, Basel (1967)
48. H. A. Lechevalier and M. P. Lechevalier : The Actinomycetales, Jena Int. Sym. on Taxonomy, H. Prauser (ed.), Gustav Fischer, Jena, p. 393 (1970)
49. H. Prauser : *ibid.* p. 407 (1970)
50. E. Baldacci and R. Locci : *ibid.* p. 419 (1970)
51. S. A. Waksman and A. T. Henrici : J. Bact., **46**, 337 (1943)
52. 住木諭介 : 抗生物質 (上, 下, 補遺 1), 東京大学出版会 (1961—1965)
53. 田中信男, 中村昭四郎 : 抗生物質大要, 東京大学出版会 (1972)
54. A. Krainsky : Zentr. Bakteriolog., **41**, 649 (1914)
55. S. A. Waksman and R. E. Curtis : Soil Sci., **1**, 99 (1916)
56. H. L. Jensen : Soil Sci., **30**, 59 (1930)
57. N. A. Krasil 'nikov : The Guide to the Ray Fungi, Actinomycetales, Acad. Sci. Inst. Microbiol., Moscow (1941)
58. E. Baldacci, G. F. Comaschi, T. Scotti and C. Spalla : Rend. Ist. Super. Sanita (Roma) **20** (1953)
59. C. W. Hesseltine, R. G. Benedict and T. G. Pridham : Ann. N. Y. Acad. Sci., **60**, 136 (1954)
60. T. G. Pridham, C. W. Hesseltine, and R. G. Benedict : Appl. Microbiol., **6**, 52 (1958)
61. N. A. Krasil 'nikov : Luchistuiegribki (The Actinomycetes. Higher Forms), Nauka, Moscow (1970)
62. 長谷川武治 (編著) : 微生物の分類と同定, 東京大学出版会 (1975)
63. R. S. Breed, E. G. D. Murray and N. R. Smith : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th ed.), Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957)
64. E. B. Shirling and D. Gottlieb : Inter. J. Syst. Bacteriol., **18**, 69 (1968) ; **18**, 279 (1968) ; **19**, 391 (1969) ; **22**, 265 (1972)
65. E. B. Shirling and D. Gottlieb : Methods Manual, International Cooperative Project for Des-

cription and Deposition of Type Cultures of *Streptomyces*, Ohio Wesleyan Univ., Ohio (1964)

66. E. B. Shrling and D. Gottlieb : Inter. J. Syst. Bacteriol., **16**, 313 (1966)
67. Y. Okami : Appl. Microbiol., **11**, 493 (1963)
68. W. Kurylowicz et al. : Atlas of Spores of Selected Genera and Species of Streptomycetaceae, S. Karger, Basel (1971)
69. T. G. Pridham : Appl. Microbiol., **13**, 43 (1965)
70. H. D. Tresner and E. J. Backus : Appl. Microbiol., **11**, 335 (1963)
71. 和田三造 : 色の標準, 日本色彩社 (1949)
72. J. Burns and D. F. Holtman : Antibiot. Chemother. **9**, 398 (1959)

Explanation of Plates

Spore-bearing hyphae (Fig. 1—5), Spore surface (Fig. 6—9) and Colony (Fig. 10—12) on standard media* (ISP-No. 2, 3, 4, 5).

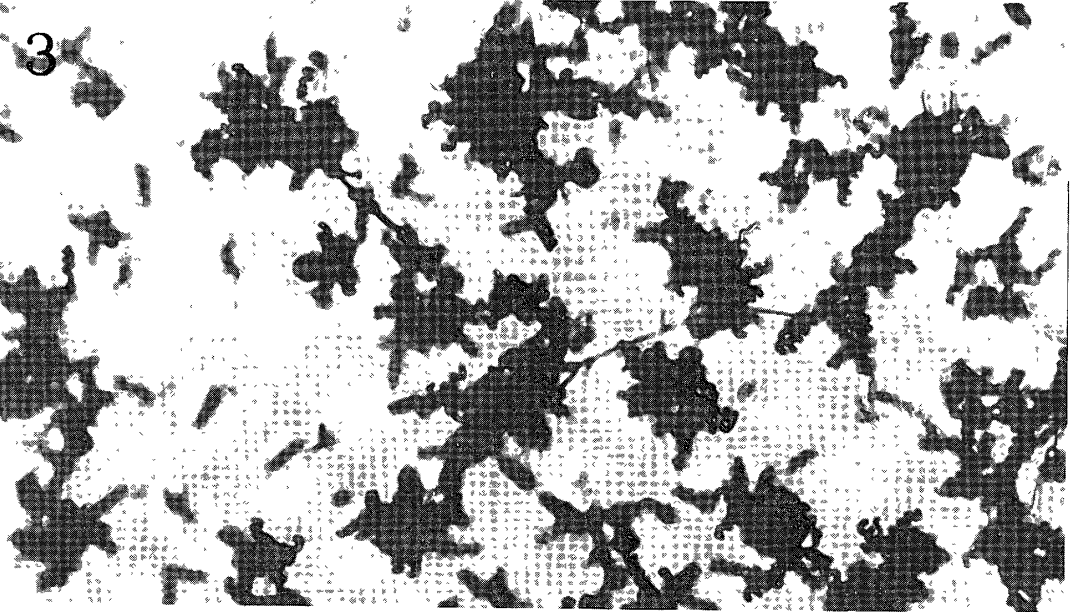
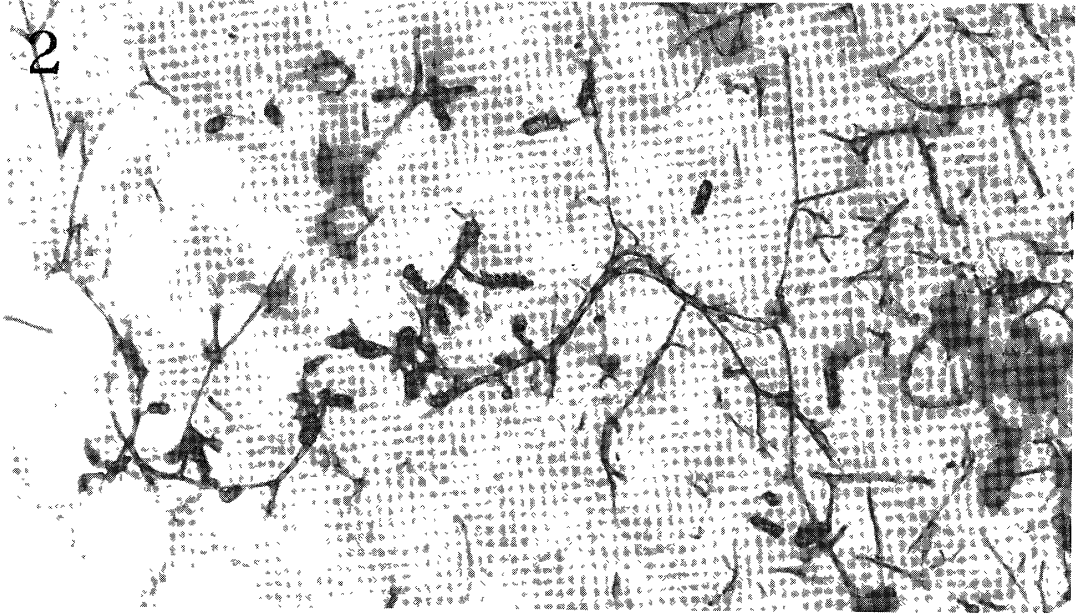
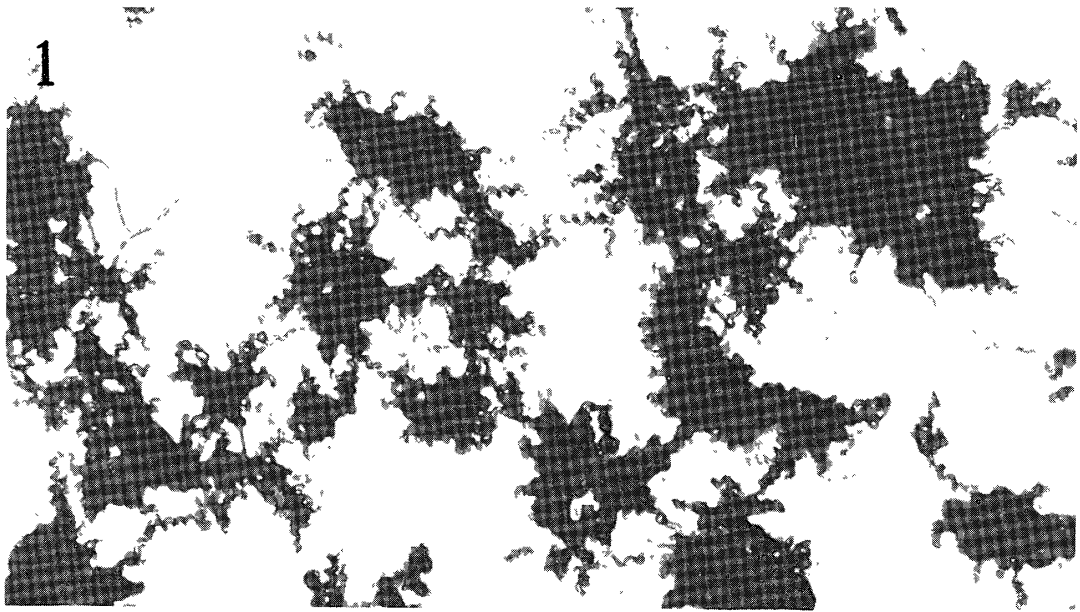
- Fig. 1. B41-146 (No. 2, 14 days) x200
- Fig. 2. B41-146 (No. 3, 14 days) x200
- Fig. 3. B41-146 (No. 5, 14 days) x200
- Fig. 4. B41-146 (No. 4, 21 days) x200
- Fig. 5. *S. chattanoogensis* ISP-5002 (No. 4, 21 days) x200
- Fig. 6. B41-146 (No. 2, 14 days) x12,200
- Fig. 7. B41-146 (No. 3, 14 days) x12,200
- Fig. 8. B41-146 (No. 4, 21 days) x8,400
- Fig. 9. ISP-5002 (No., 4, 21 days) x8,400
- Fig. 10. B41-146 and ISP-5002 (No. 2, 21 days)
- Fig. 11. B41-146 (No. 2, 18 days)
- Fig. 12. ISP-5002 (No. 2, 18 days)

* No. 2—Yeast extract malt extract agar

No. 3—Oatmeal agar

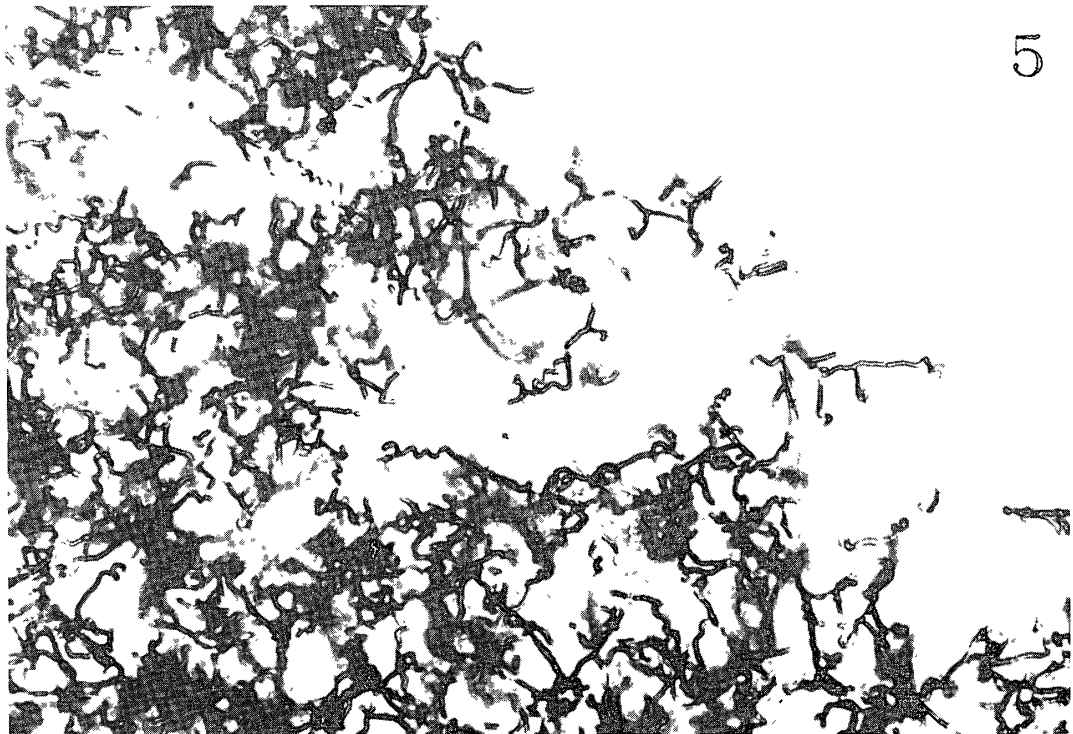
No. 4—Inorganic salts starch agar

No. 5—Glycerol asparagine agar



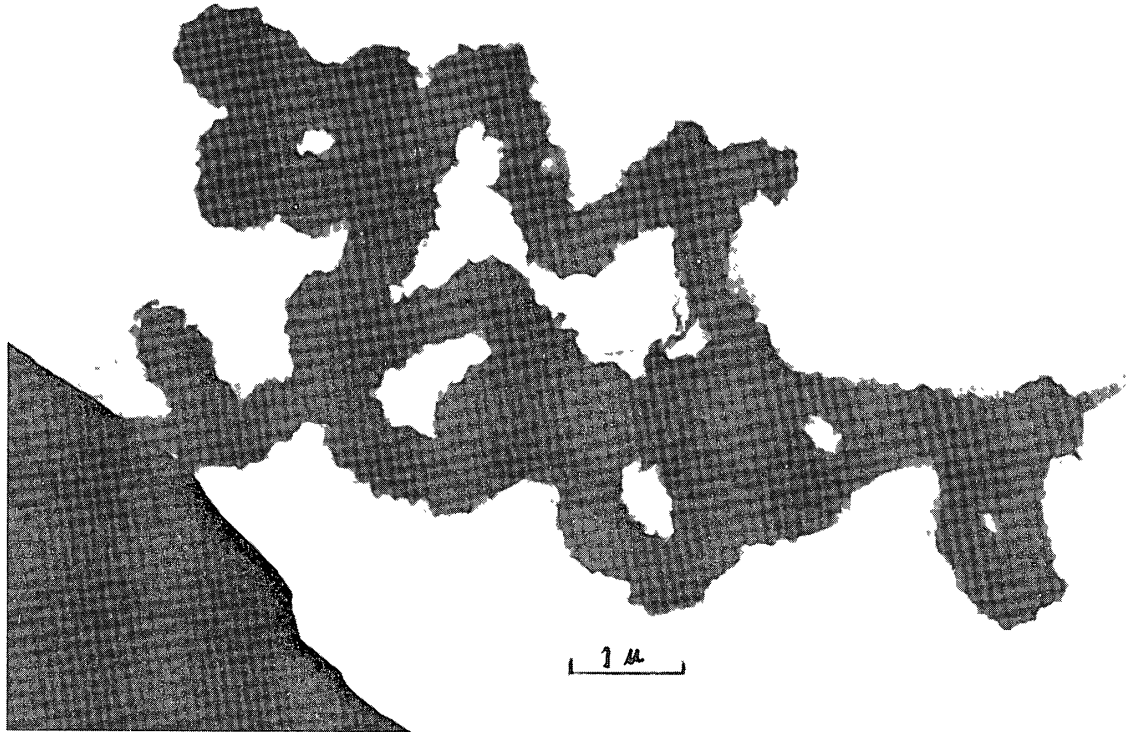


4

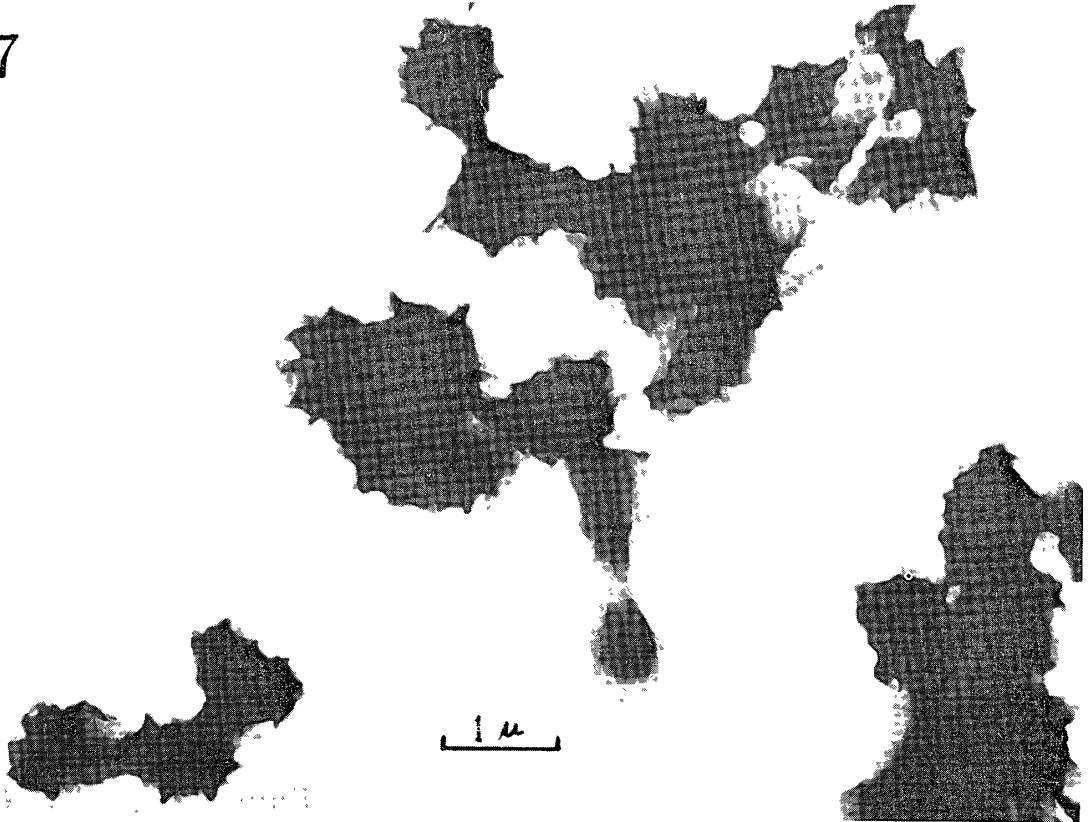


5

6



7



8



9

