

## 総合論文

放線菌の代謝および微生物による  
効力測定に関する研究東 出 栄 治  
(生物資源開発学講座)Studies on Metabolism of Actinomycetes  
and Assay Method with MicroorganismEiji Higashide  
(Department of Bioresources Chemistry)

The microorganisms belonging to actinomycetes have been important as the antibiotic producers and my major job has been a screening for useful new antibiotics produced by an actinomycete almost in my research. My collaborators and I found nineteen new antibiotics between 1956 and 1980 and thereafter three antibiotics particularly (Enramycin-feed additive, Validamycin-agriculture use, effective against the sheath blight disease of rice plants, Sedecamycin-effective against swine dysenteriae) were developed for industrial production and became useful for many people. And also we were interested in those chemical structures and activities, fermentation processes by mutants or producing organisms namely rufomycins, maridomycins and ansamitocins. And from another point a new assay method for the activities of disinfectants was an epoch making investigation.

Key words : actinomycetes, screening on antibiotics, enramycin, validamycin, sedecamycin, new assay method of disinfectants

## 緒 言

私の学生時代は放線菌を実験材料として用いることはほとんどなかったが、武田薬品工業株式会社に入社（1956年4月）してから本格的に放線菌に関する研究を始めた。最初は既に発見され工業化研究をしようとしていた Dihydrostreptomycin の新しい生産菌 *Streptomyces humidus* nov. sp. がその菌体中に vitamin B<sub>12</sub> を生産するらしいのでそれを確認して、Dihydrostreptomycin が生成、共存する培養液中で vitamin B<sub>12</sub> を測定する方法を設定することが最初のテーマであった<sup>1,2)</sup>。その後、放線菌を生産菌としてグラム陽性及び陰性細菌並びに抗酸性菌（結核菌）の発育に強い阻害作用を示すと共に動物に対

する高い選択毒性を示す抗生物質の探索及びその開発を目指した。通常、新物質の探索に際してはその目的に叶った探索法の方法を研究することから始めるが、我々は目的がはっきりしているとしてとにかく既知の探索法の方法を改良利用しながら急遽探索研究を始めた。その結果、我々の研究の初期に臨床試験まで到達し得たものとして zygomycins を見出すことができた。その後、約30年にわたり放線菌を生産菌として新しい有用な抗生物質のスクリーニング及びそれらの発酵に関する研究に携わり商品化できたもの3種並びに印象に残った研究4種を述べると共に殺菌消毒剤の活性測定法について簡単に

Received October 1, 1998

記述する。

### 1) Zygomycins の発見とその周辺研究<sup>6,7,8,9)</sup>

塩基性水溶性で結核菌に比較的強い発育阻止作用を示し、しかも新しい型の抗生物質と推定されたので、出来るだけ早期に既知物質との異動を確かめるべく検討した。その結果、paromomycin ならびに hydroxymycin に最も類似していることが認められた。しかし、マウスに対する急性及び亜急性毒性が強く結核病治療に対し長期間に投与出来ない事が明らかとなった。更に梅沢純夫博士らにより kanamycin が見出され、工業化され、市販されるに及びこの研究は中止した。

### 2) Rufomycins の発見とその周辺研究<sup>12,13,17,18,19,29)</sup>

1960年以降、種々の抗生物質に対する耐性菌が頻繁に検出されるようになった。我々もその状況に対応して抗生物質耐性菌に対し有用な新しい抗結核剤を見出すべく検討した。その結果、新しいタイプの放線菌によって生産される結核菌のみに強い増殖阻害活性を示す抗生物質を見出した。その生産菌は Table 1 に示した性質を有する放線菌で、該菌株を新菌種と認め、*Streptomycetes atratus* nov. sp. と命名した<sup>12)</sup>。

本菌株の菌学的性質は Table 1 に示した様に *S. hygrosopicus* 及び *S. halstedii* と類似していたが、2, 3 の性質が明らかに異なっていたので、新種であるとを認めて、その菌叢が黒変することからラテン語 *atratus* (黒変した) にちなんで新菌種名を命名した。その抗生物質は粗物質の状態赤褐色を帯びた色素を有していたのでその色にちなんでラテン語から *rufomycin* と命名した。本物質の抗菌像は

**Table 1** The characteristics of *Streptomycetes atratus* nov. sp.

<i>Streptomycetes atratus</i> sp. nov. IFO 3897
Morphology: Vegetative mycelia are simply branching, Aerial mycelia are mainly loops and rarely spirals, Spores are spherical or ellipsoidal (0.8-1.3×1.2-2.0 μm) and their surfaces are smooth.
Aerial mass color: Gray series
Non-chromogenic
The epithet <atratus> is the modern Latin meaning adj. clothed in black.

Table 2 に示した様に結核菌を含む *Mycobacterium* sp. を特異的に発育阻害し、既知抗生物質とは交叉耐性を示さなかった。又、本物質との類似物質として滝田らが第34回細菌学会大会にて報告された il-lamycin が挙げられるが、その後に報告された化学構造式 (Fig. 1) などから両者は同一物質と考えられた。そこで我々は *rufomycin* (RM) の生合成研究を行い<sup>17,18,19,20)</sup>、RM 生合成はアロイソロイシンによって拮抗阻害されるとその中間体らしき物質が集積したので、これを単離同定して 1-(2-methyl-3-buten-2-yl) tryptophan (1-MBY-TRY) (Fig. 2) であることを明らかにして更に放射性ロイシンおよび 1-MBY-Try が RM 生合成中に効率よく RM に取り込まれることを明らかにして Fig. 2 物質が RM 生合成中間主要物質の一つであると結論した。

### 3) Enduracidins の発見およびその周辺研究<sup>21,32,50)</sup>

この時代になると抗生物質の使用頻度が多くなり、

**Table 2** Antibacterial spectra of *rufomycins*

Test organisms	M. I. C. (ug/ml)	
	Rufomycin A	Rufomycin B
<i>Escheria coli</i>	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i>	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	>100	>100
<i>Bacillus brevis</i>	100	>100
<i>Sarcina lutea</i>	100	>100
<i>Mycobacterium avium</i>	2.0	5.0
<i>Mycobacterium avium</i> SM <sup>R</sup>	1.0	5.0
<i>Mycobacterium avium</i> NM <sup>R</sup>	1.0	5.0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0.2	0.5
<i>Mycobacterium phlei</i>	2.0	5.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37R	0.1-0.4	1.0-5.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SM <sup>R</sup>	0.1-0.8	2.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KM <sup>R</sup>	0.2-0.5	2.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SM, KM <sup>R</sup>	0.2-0.5	2.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> INHA <sup>R</sup>	0.2	1.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	>100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	>100	>10

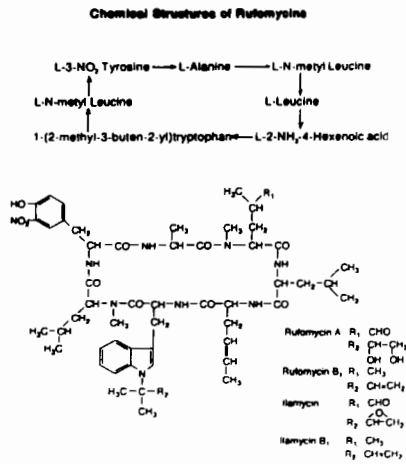


Fig. 1 Chemical structures of rufomycins and ilamycins.

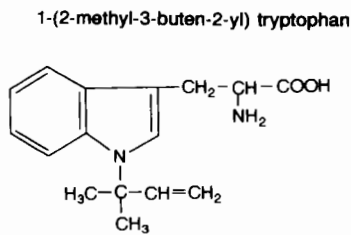


Fig. 2 Structure of 1-(2-methyl-3-buten-2-yl) tryptophan.

その結果抗生物質耐性菌の出現頻度が多くなり、どうしてもブドウ球菌に殺菌力が強く既知抗生物質の耐性菌に有効な抗生物質が要望された。このような状況の中で見出されたのがこの物質でその生産菌は *S. fungicidicus* No.B-5477と命名された。本物質は Table 3 に示した様にグラム陽性細菌に強い発育阻害作用を示すと共に殺菌作用 (Fig. 3, 4) が強く、薬剤耐性獲得も遅く更に動物に投与した時に体内での持続時間が長いと言う特徴を有する新物質であることから *enduracidins* (*enramycin*) と名付けられた。その後、その化学構造が明かとなり、Fig. 5 に示した様に17個のアミノ酸と11個また12個の炭素鎖 (脂肪酸) を有する環状ペプチドであることが明らかとなった。本物質は有機溶媒に難溶性であることと分子量 (1,846および1,860) が比較的大きいこともありヒトに筋注すると疼痛を伴うことから飼料添加剤として有用であろうとの見解から鶏及び豚の飼料添加剤用として試験した。即ち、Fig. 6 に示したように飼料に 6 ~ 10ppm 加えることにより体重は 3 ~ 4 % 増加し、それに対し飼料要求率95~96%と飼

Table 3 Antibacterial spectrum of *enramycin*

Test Organisms	M. I. C. ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0.1
" multiple drug resistant strain	0.1
<i>Mycobacterium avium</i> IFO 3153	5
<i>Escherichia coli</i> IFO 3044	>100
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6.25
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO 4626	>100

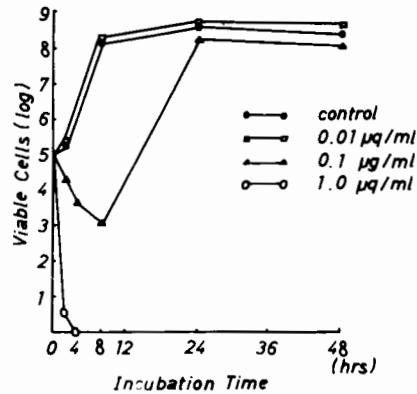


Fig. 3 Bactericidal activities on *S. aureus* of *enramycin*.

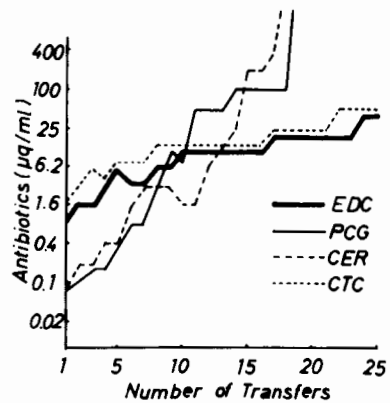


Fig. 4 Patterns of development of drug resistant on *S. aureus*.

料効率も高かった。この間、我々は発酵法および精製法を改良して120トン発酵槽での製造法を設定、工業的製造法を飼料添加剤として作り上げ、商品として現在に至っている。

4) *Sedecamycin* (T-2636A) およびその esterase 関連の研究<sup>23,24,26,27,28,特許30)</sup>

グラム陽性菌感染症に対する治療で、動物に対し薬物を経口投与により既知抗生物質耐性菌に有効な

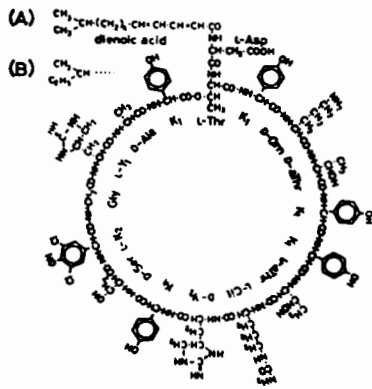


Fig. 5 Chemical structures of enramycin.

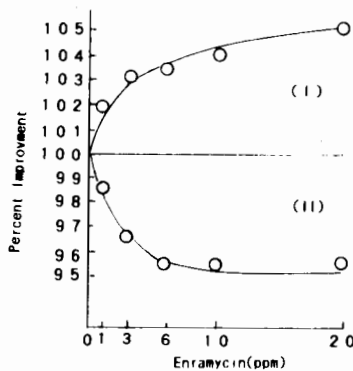


Fig. 6 Effect of enramycin on body weight (I) and feed efficiency (II) of broiler chickens.

抗生物質を探索した。その結果、見出した抗生物質 T-2636はグラム陽性菌のうち特に既知抗生物質耐性菌を含む *Staphylococcus aureus* に対し強い発育阻害活性を示した (Table 4)。その生産菌は *S. rochei* var. *volubilis* nov. var. と命名された新変異種でその培養液中に esterase (Fig. 7) を生成し、その抗生物質の化学構造式は Fig. 8 に示した様に17員環の大ラクトン環を有し macrolide resistant organisms (*in vitro*) に部分的にやや耐性を示す物質であることが認められた。この抗生物質は探索研究の初期、培養液から酢酸エチルで抽出していたが、その際、その抽出液の薄層クロマトグラフィーによる検討ではすくなくとも4種類の抗生物質の存在を認めた。即ち、抗生物質T-2636Aが最初に採取しようと試みた物質であったが、*in vitro* での抗菌力は弱く、アセチル体で、T-2636Bは他2者と化学構造が異なる14員環中性マクロライド (Fig 9)、T-2636Cは抗生物質T-2636遊離体であることが明らかとなった (Fig. 8)。その後の研究からT-2636Cは脂溶性が

Table 4 Antimicrobial spectra of antibiotics T-2636 A, B, C, D and M

Test organisms	Minimum inhibitory concentration (mcg/ml)				
	A**	B	C**	D	M
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	50	>100	>100
<i>Protens vulgaris</i>	>100	>100	50	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	10~20	50	0.75	>100	>100
" (OE-R)*	20~50	100	1~2	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	100	10	50	>100	>100
<i>Bacillus cereus</i>	100	50	20	>100	>100
<i>Bacillus brevis</i>	50~100	20	5	>100	>100
<i>Sarcina lutea</i>	< 2.0	1.0	0.02	5~10	50
<i>Micrococcus flavus</i>	< 2.0	2.0	0.2	50	100
<i>Mycobacterium avium</i>	100	50	100	>100	20
<i>Mycobacterium phlei</i>	>100	20	50	>100	20
<i>Mycobacterium sp. 607</i>	>100	>100	100	>100	2.0
<i>Piricularia oryzae</i>	>100	>100	100	>100	1~2
<i>Penicillium chrysogenum</i>	>100	>100	>100	>100	2
<i>Aspergillus niger</i>	>100	>100	>100	>100	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	>100	>100	>100	2
<i>Candida albicans</i>	>100	>100	>100	>100	2
<i>Xanthomonas oryzae</i>	0.5		0.05	5.0	

\*OE-R: Oleandomycin-erythromycin resistant strain.

\*\*A = Bundlin B. C = Bundlin - A = lankacidin.

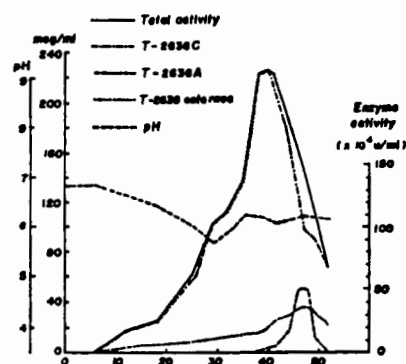


Fig. 7 Production of antibiotics T-2636 A and C, and the esterase.

強く体内へ吸収されず、見かけ上の急性毒性が強く、*in vivo* での有効性が弱かった。Table 6 に示した様にこれら両者の豚赤痢菌 *Tryponema hyodysenteriae* に対する発育阻害活性ではT-2636C、Aとも大きい差がないにも拘わらず、マウスを用いた毒性実験ではT-2636CがAに比べて強く (Fig. 10、感染治療実験 (経口) (Table 7) ではT-2636Aの有効投与

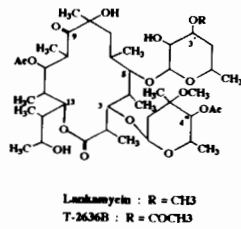


Fig. 9 Chemical structure of lankacidin B.

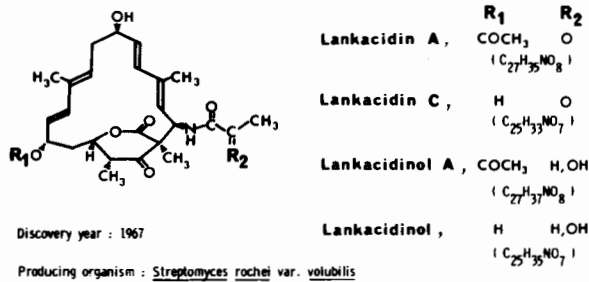


Fig. 8 Chemical structures of lankacidins antibiotics.

Table 7 Protective effect of lankacidin A against *T. hyphodysenteriae*

Protective Effect of Lankacidin A against Experimental *Treponema hyodysenteriae* DJ70P3 Infection in Ta: CF#1 Mice

Antimicrobials	MIC (μg/ml)	Dosage <sup>a</sup> (mg/kg/day)	No. of positive mice/examined (%)	
			Colonization with <i>T. hyodysenteriae</i> in cecum	Gross cecal lesion
Lankacidin A	6.25	2.5	15/15 (100)	5/15 (33)
		5.0	22/35 (63)	0/35 (0)
		10	10/30 (33)	0/30 (0)
		20	1/15 (7)	0/15 (0)
Carbadox	0.006	2.5	10/10 (100)	5/10 (50)
		5	18/25 (72)	1/25 (4)
		10	12/30 (40)	0/30 (0)
		20	0/15 (0)	0/15 (0)
Tiamulin	0.1	2.5	5/5 (100)	2/5 (40)
		5.0	18/20 (90)	4/20 (20)
		10	24/30 (80)	2/30 (7)
		20	10/30 (33)	0/30 (0)
Lincomycin	25	40	0/20 (0)	0/20 (0)
		5.0	15/15 (100)	7/15 (47)
		10	23/30 (77)	4/30 (13)
		20	12/25 (22)	0/25 (0)
Infected nonmedicated control	-	-	152/152 (100)	127/152 (84)

Data at postinoculation day 7

a: Administered orally once a day on postinoculation days 1 and 2

Table 6 MIC of lankacidins against *T. hyphodysenteriae*

Compound (I)	Minimum Inhibitory Concentration (μg/ml)			
	DJ70P1	MK-2	78/A	CD-1
Lankacidin A	6.25	3.13	3.13	6.25
Lankacidin C	3.13	1.56	1.56	1.56
Lankacidinol A	25	25	12.5	25
Lankacidinol	25	25	12.5	12.5

Notes: The experimental conditions are the same as in Test Example I (Table 1).

量が lincomycin のその投与量に比べて少なく優れていることは明らかであった。そこで T-2636A を工業化することとし、本物質が17員環の大ラクトン環を有するから sedecamycin と命名した。又、T-2636A の合成については培養液中に生成する esterase を利用するため、この培養終了後に酢酸エチルを投入して攪拌反応させ、T-2636C の C14 位をエステル化 (Table 5) して T-2636A に転換し、更にメチルイソブチルケトン抽出溶媒として T-2636A を効率よく採取して工業化した。

☆参考; 原田節夫 Lankacidin 群 (T-2636) 抗生物質に関する研究

- 1) Antimicrobial spectrum (MIC-μg/ml)  
Lankacidin C, *S. aureus*, 6.25. *Str. pyogenes*, 0.39. *Qip. pneumoniae*, 3.125. *N. gonorrhoeae*, 0.39. *Y. cholerae*, 0.2
- 2) No cross-resistance to clinical isolates
- 3) Effect on swine dysentery caused with *Treponema hyodysenteriae*  
  
Lankacidin A (20-30 ppm)
- 4) Acute toxicities (LD<sub>50</sub>, Mice)  
Lankacidin A: > 10 g/Kg, p.o., 8-10 g/Kg, i.p.  
" C: > 10 g/Kg, p.o., 4.5 g/Kg, i.p.

Fig. 10 Biological activity of T-2636 A and C.

3) Validamycin A に関する研究およびその周辺研究 28,29,78,79,80,81,82)

長年、柴田らは副作用 (植物に対する薬害) がほとんどなくイネの植物病に有効な新しい農薬の創製を切望してきたが、イネ植物病のうちイネいもち病に次いで被害の大きいと言われるイネ紋枯病の *in vivo* での防除および予防に大変有効で薬害をほとんど示さない農薬を見出す為に土壌より分離した多数の放線菌の液体培養液をイネ紋枯病菌感染イネ植物

Table 5 Specific activity of esterase from *S. rochei* var. *volubilis* and *Asp. sojiae*

Substrate	Specific activity μM/mg of protein	
	T-2636 esterase	<i>Asp. sojiae</i> esterase
Ethyl formate	3.2	—
Ethyl acetate	5.8	1.0
Ethyl propionate	2.0	—
Ethyl butyrate	1.4	8.0
Monoacetin	11.0	14.0
Triacetin	8.6	—
Tributylin	—	17.0
Triolein	0	—
Di- <i>n</i> -butylin	0	—
Methyl laurate	0	3.5
Olive oil	0	0
Antibiotic T-2636A	6.0	0

Activities were determined by the titration method.

上に直接噴霧して放線菌代謝物質がイネ紋枯病菌感染に治療及予防効果があるかどうかを試験した。その結果、放線菌No.7545株の培養液がイネ紋枯病菌 (*Pellicularia filamentosa* f. sp. *sasakii*) 感染に有効であることを見出した。その強い効果にちなんで validamycin と名付けた。私はその研究の初期の発酵生産と検出法設定から本研究に取り組んだ。次いで本物質の工場での工業化生産研究に取り組み60トン発酵槽における生産で単位当りの生産量向上、工程の短縮、省力及び生産の安定化を計り、生産価格を低減する目的で発酵工程種菌の保存法<sup>72)</sup>、種培養法として孢子懸濁液の直接接種法の省力法開発を成功させ、60トン発酵槽(現在は120トン発酵槽)に於ける発酵により本研究開始初期1mg(validamycin Aとして)/mlの生産量であったものが25mg/ml(1975年当時)まで向上させ価格を低減させることが出来た。本物質は *S. hygroscopicus* subsp. *limoneus* nov. var. (Table 8) によって生産され、その化学構造はアミノ配糖体 (Fig. 11) であった。

本物質の生物学的測定法は従来の測定法は適用できず (MIC ではどの試験菌を用いても >100μg/ml), 異常生育検定法 (dendroid-test method) (Plate 1) を用いることによって (Table 9) の様な結果を得ることができた。なお、他の生物学的側定法としては *Pellicularia filamentosa* f. sp. *sasakii* を検定菌

Table 8 The characteristics of *S. hygroscopicus* subsp. *limoneus* JCM 4911

*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus* JCM 4911

Morphology: Vegetative mycelia are simply branching, Aerial mycelia are spirals, Spores are oval or cylindrical (1.0-1.3×1.0-1.5μm) and their surfaces are smooth.

Aerial mass color: Gray series

Non-chromogenic

The epithet <limoneus> is the modern Latin meaning lemon yellow, the color of vegetative mycelium of the strain and diffusible pigment.

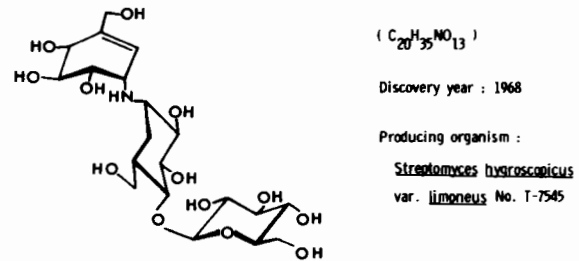


Fig. 11 Chemical structure of validamycin A.

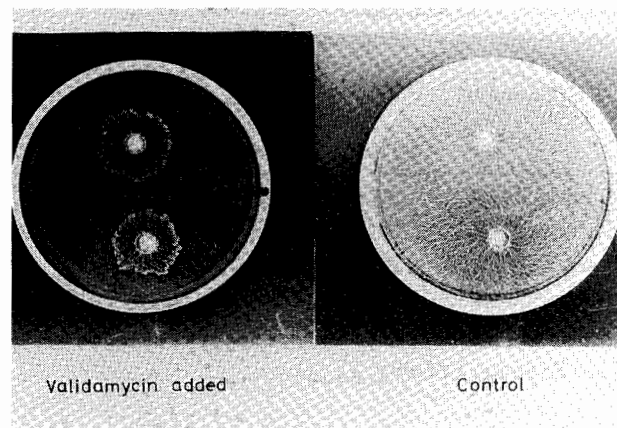


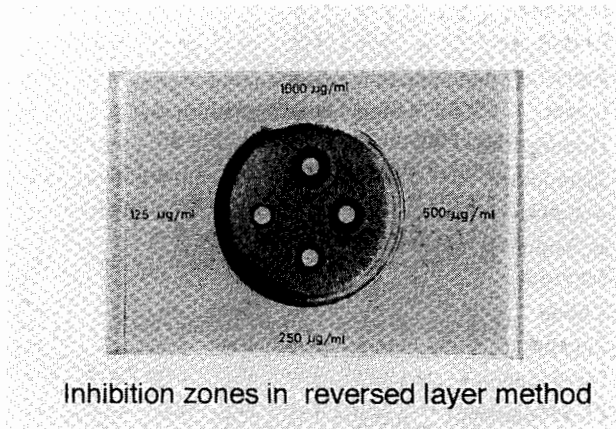
Plate 1 Abnormal g. and normal growth of test org. with validamycin.

として用いる (reverse layer method) (Plate 2) が開発された。また、化学的測定法としてガスクロマトグラフィー法が開発され、精製に用いられた。validamycin A の効果を従来の農薬ヒソ剤と比較しても効果が大で (Table 10) 現在でも日本を始めアジア各地でよく用いられている。

**Table 9 Biological properties of validamycin A Antimicrobial spectrum**

Test organisms	M. I. C. ( $\mu\text{g/ml}$ )	*M. C. A. B. ( $\mu\text{g/ml}$ )
Rhizoctonia solani	>100	0.01
Alternaria kikuchiana	>100	>100
Botrytis cinerea	>100	>100
Phytophthora infestans	>100	>100
Gram-positive, negative bacteria	>100	—

\*Minimum concentration causing abnormal branching  
 Effective against plant diseases caused by Rhizoctonia solani;  
 Sheath blight of rice plants  
 Damping-off of vegetable seedlings  
 Black scurf of potato tubers  
 Toxicity LD 50 to mouse: >2000 mg/kg (i. v.), >10 g/kg (p. o.)  
 No phytotoxicity



**Inhibition zones in reversed layer method**

**Plate 2** inhibition zone by reversed layer method.

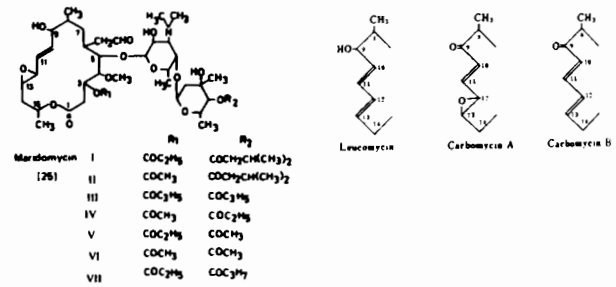
**Table 10 Effect of validamycins against the sheath blight of rice plants**

	Concentration (ppm)	Expanding rate* (%)			
		7d.	14d.	21d.	28d.
Untreated	0	100	100	100	100
VM-A	15	4	5	47	76
	30	0	0	0.1	0.2
	60	0	0	0	0
Monkit dust**		9	4	0.1	0.3

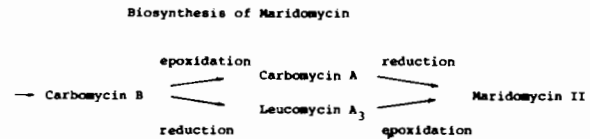
\*Expanding rate = Aver, length of lesion per stem treated with drugs / Aver, length of lesion per stem untreated  
 \*\*Containing 0.4% of iron ammonium-methane arsonic acid

4) Maridomycin III の発見とその集積発酵<sup>33,35,37,40,41)</sup>

我々は新しいマクロライド群抗生物質を探索する目的でスクリーニングを開始した。その結果、見出された抗生物質はマクロライド群の中で唯一特異 UV



**Fig. 12** Chemical structures of maridomycins and the related comp.



**Fig. 13** Biosynthesis of maridomycin.

吸収を持たない物質群であった。本抗生物質は maridomycin と命名され生産菌は *S. hygroscopicus* No.B-5050 と称された。この菌株は maridomycin 群以外に leucomycin 群, carbomycin 群のそれぞれ 5 種以上のマクロライド群抗生物質を生産して、マクロライド群のみでも 10 種以上生成することが明らかとなった (Fig. 12)。それらの中から maridomycin III のみを特異的に集積発酵させ、純度 95% 以上の製品を効率良く製造する技術が要求された。そこで我々は maridomycin 群, leucomycin 群, carbomycin 群のそれぞれの生合成経路を検討して (Fig. 13) のような結果を得た。更に maridomycin III のみを特異的に集積発酵させる為に *S. hygroscopicus* No.B-5050 の培養に及ぼすアミノ酸および有機酸の影響を調べ、アミノ酸生合成系のアスパラギン酸系アミノ酸即ちロイシン、イソロイシン、メチオニン、ホモセリン、バリン、スレオニン、 $\alpha$ -アミノ *n*-酪産などを添加培養することによって maridomycin III を少なくとも 70-80% 集積発酵することがわかった。

(Table 11) 更に合成培地上で本菌株の発育に及ぼす影響を調べたところバリン 20  $\mu\text{g/ml}$  (Table 12) で本菌株の発育を阻害することが明らかとなった。さらにその阻害は前期アミノ酸により発育が回復した。

そこで maridomycin III を特異的に生成発酵させる菌株を安定且つ安価に得る為、Table 11, 13 の成果を基にして *S. hygroscopicus* No.B-5050 のバリン耐性変異株を育種し、その菌株を用いて前記 (Ieu,

**Table 11** Effect of various comp. on maridomycin production  
Each compound was added at the concentration of 0.1% at 24hr except amino acids, which were added at the concentration of 0.2% at initial time.

Compound	MDM ( $\mu\text{g/ml}$ )	MDM III ( $\mu\text{g/ml}$ )	MDM III /MDM (%)
Acetate	4300	1630	38
Propionate	4250	1830	43
<i>n</i> -Butyrate	4250	1910	45
<i>n</i> -Valerate	4000	2120	53
<i>n</i> -Caproate	3900	1560	40
Ethyl alcohol	4350	1740	40
<i>n</i> -Propyl alcohol	4250	1620	38
<i>n</i> -Butyl alcohol	4150	1580	38
<i>n</i> -Amyl alcohol	4000	1600	40
Propionamide	4350	1960	45
Succinate	4600	2070	45
$\alpha$ -Ketoglutarate	4280	1630	38
Citrate	4300	1720	40
Glutamate	4450	1780	40
Glycine	4380	1660	38
Arginine	4450	1780	40
Aspartate	4300	1940	45
Lysine	4300	1720	40
Homoserine	4000	2800	70
Threonine	4300	3010	70
Methionine	4600	3220	70
Isoleucine	4450	3340	75
$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -butyrate	3750	3000	80
$\alpha$ -Ketobutyrate	3680	2940	80
Leucine	4400	1320 <sup>a</sup>	30
None	4500	1800	40

<sup>a</sup> Increase of MDM I and MDM II was observed.

Val, Met などの) アミノ酸の添加なしで発酵させたところ Table 14及び Fig. 14に示したように maridomycin III を特異的に発酵させ、高い力価で安定にしかも安価に得る技術を確立することが出来た。しかし、maridomycin III の工業化は会社の方針にそぐわず残念ながら中止となった。

5) 抗腫瘍性抗生物質 Ansamitocin 発見とその周辺研究<sup>36,42,43,45,46,47,48,49,51,52,54,特許61)</sup>

次に新しい抗腫瘍性抗生物質の探索を試みるべく新しいタイプの菌株を探索する為、その時点での情報に従って溪流中の植物上から種々珍しい放線菌を

**Table 12** Effect of various amino acids on the growth  
MM agar medium was used as basal medium. Each amino acid was sterilized separately and added to it.

	Amino acid added ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	20	50	100	250	500	1000
Alanine	++	++	++	++	++	++
Glycine	++	++	++	++	++	+
Serine	++	++	++	++	+	±
Cysteine	++	++	++	++	++	++
Methionine	++	++	++	++	++	+
Arginine	++	++	++	++	++	++
Proline	++	++	++	++	++	++
Histidine	++	++	++	++	++	++
Glutamate	++	++	++	++	++	++
Aspartate	++	++	++	++	++	++
Lysine	++	++	++	++	++	++
Homoserine	++	++	++	+	±	±
Threonine	++	++	++	++	++	++
$\alpha$ -ketobutyrate	++	++	++	++	++	+
$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -butyrate	++	++	++	+	±	±
Valine	-	-	-	-	-	-
Leucine	++	++	++	++	+	+
Isoleucine	++	++	++	++	++	++
Phenylalanine	++	++	++	++	++	++
Tyrosine	++	++	++	++	++	++
Tryptophan	++	++	++	++	++	++

++, abundant growth; +, good growth; ±, poor growth; -, no growth.

**Table 13** Effect of various amino acids on reversal of the growth inhibition caused by 200  $\mu\text{g/ml}$  of valine

Each amino acid was added to MM agar medium containing 200  $\mu\text{g/ml}$  of valine.

Amino acid (200 $\mu\text{g/ml}$ )	Growth	Amino acid (200 $\mu\text{g/ml}$ )	Growth
Alanine	-	Homoserine	+
Glycine	-	Threonine	+
Serine	-	$\alpha$ -Ketobutyrate	++
Cysteine	-	$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -butyrate	++
Methionine	+	Leucine	-
Arginine	-	Isoleucine	++
Proline	-	Phenylalanine	-
Histidine	-	Tyrosine	-
Glutamate	-	Tryptophan	-
Aspartate	-	None	-
Lysine	-		

++, abundant growth; +, good growth; -, no growth.



Table 14 Maridomycin III productivity of valine resistant (V)

Strain	Maridomycin (μg/ml)	Maridomycin III (μg/ml)	MDM III/MDM (%)
V 9	4200	3000	71
V-18	4400	3050	69
V-125	4550	3000	66
V-178	4550	3100	68
V 201	4500	3000	68
V 226	4700	3350	71
V 265	4600	3200	70
V-355	4500	3000	67
V-410	4400	3050	69
AV	4700	3525	75
HA	4500	1800	40

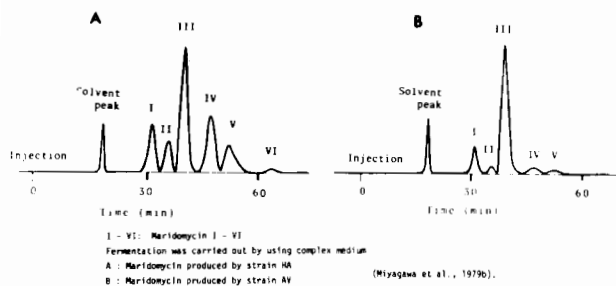
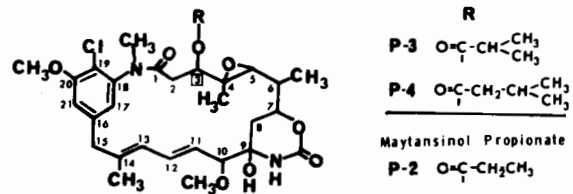


Fig. 14 Chromatograms of maridomycin production by strain HA (MDM high prod.) and AV (MDM III high prod.).

分離して、それらの抗微生物活性を調べたところ、細菌に活性を示さず、酵母のみにそれらの発育阻害活性を示す物質を検出した。その生産菌は、初期の研究では培養法によりグラム陰性菌に発育阻害活性を示す抗生物質を見出し、追跡してそれは nocardicin A であることがわかった<sup>45,61</sup>。又、本菌株菌体中に nocardomycolic acid を有するとの情報及び前記 nocardicin A を採取同定出来た事からこの菌株を *Nocardia* sp. に属すると推定した<sup>36)</sup>。更に本菌株の生産する抗微生物活性が非常に強いことからその物質を分離精製して maytansinoid の新しい抗腫瘍性抗生物質であることが認められ Ansamitocins (Ansa-group の化学構造を有し、有糸分裂阻害を示す新物質である) と命名された (Fig. 15)。maytansine は熱帯植物より分離された植物成分物質であり、生産量は少なく、放線菌代謝産物である ansamitocins は生産量としても量産が期待できると言うことで、化学的誘導体も数多く合成され動物実験により毒性、抗腫瘍性の検討をする為種々の研究が行われた。作

Producer : *Nocardia* sp. No. C-15003 (N-1)

Chemical Structure :



( Higashide et al. : Nature 270, No.5639, 721, 1977 )

Fig. 15 Chemical structures of ansamitocins.

MTP の各ホールに各薬剤濃度液250μlを注入

↓  
試験菌液10μl接種 (10<sup>6</sup> CFU/ml)

↓  
25°C, 5 または10分作用

↓  
SCDLP 培地 3 ml に作用液 10 μl 添加

↓  
35°C, 72時間培養後殺菌濃度を判定

Fig. 16 MTP method for bactericidal activity

用機構、生産菌に関する研究からは新しい情報が得られたが毒性、抗腫瘍性から画期的な新規物質は合成出来なかったため以後の誘導体の合成研究は中止された。なお、生産菌の分類学的研究から新属とされ *Actinosynnema* sp. と命名された<sup>48)</sup>。

6) 殺菌消毒剤の評価に関する研究<sup>58,61,63,64,65,67,72)</sup>

殺菌消毒剤の効力測定 (*in vitro*) については石炭酸係数を求める方法が Rideal, S & Walker, J. T. A. によって発表された (1903) が、その後抗生物質活性測定については最小発育阻止濃度測定法が標準化されて多くの微生物に対する作用が明らかになった。一方、殺菌消毒剤の効力測定 (*in vitro*) については石炭酸係数については多少の進歩はあったが、方法の煩雑さ、占有場所の広さ、測定値の不確実性についてはほとんど変更は無く測定微生物の少なさも相変わらずであった。所が最近、無菌室の設置が経済的にも容易となると共に微量測定器具の入手も容易となってきた。これらの事情から前記4項目を克服するため、microtiterplate, プラスチック接種針、無菌室等を使用することによって (Fig. 16, 17) に示した MTP 法などを用いることにより前記4項目をかなり克服できた。尚、これらの方法と共に242株の試験菌を用いて2種の殺菌消毒剤について殺菌

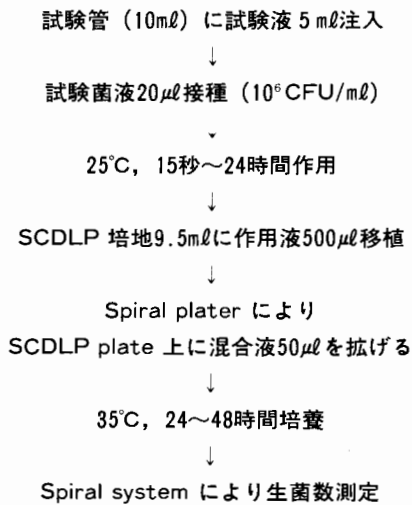


Fig. 17 Simple method with counting of bacteria

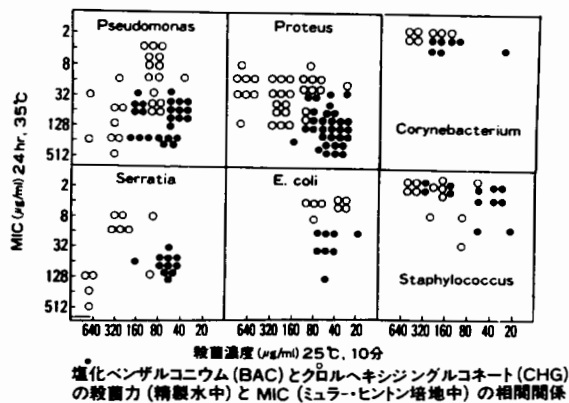


Fig. 18 Interrelations between bactericidal and bacterio-static activities with MTP and MIC method.

力と MIC 値の相関関係の比較を行った (Fig. 18). また、殺菌消毒剤に対する耐性菌 (抵抗菌) の薬剤抵抗性獲得機構およびその種類乃至その殺菌法を検討し、殺菌消毒剤抵抗菌はグラム陰性菌のみに獲得性があり、そのほとんどが貧栄養培地で発育し長期間生育出来る日和見菌であり、それらは稀アルカリまたは20%エタノールと併用によりそれらの殺菌力が克服出来た (Table 15).

7) Validamycin producer に関する研究<sup>78,79,80,81,82)</sup>

validamycin はイネ紋枯病の治療、予防に対し効果的に作用する殺菌剤として日本ばかりでなく、アジアの稲作地域に広く用いられ毒性および病害性の少ない殺菌剤として使用されている。この生成菌に

Table 15 Bactericidal activity to tolerant strains in dilute alkaline and ethanol solution

薬剤	接触時間	(殺菌濃度 (µg/l), 常温)					
		QACs		CHG		ADG	
		1	10	1	10	1	10
<i>A. faecalis</i> 572	p w	1000	600	10000	10000	5000	1000
	n	100	50	500	50	500	100
	e	500	500	5000	500	5000	500
	t w	>50000	>50000	>50000	>50000	>50000	>50000
	n	500	100	500	10	>5000	1000
	e	5000	10	5000	500	500	500

p: 親株 t: 抵抗株 w: 純水中 n: 0.001%炭酸ナトリウム中 e: 20%エタノール中  
QACs: 塩化ベンザルコニウム ADG: 塩酸アルキルホリアミノエチルグリシン  
CHG: グルコン酸クロルヘキシジン

関する研究を岡山大学にて着手した。validamycin 生成菌は理化学研究所微生物保存施設より入手した JCM4911を用いた。一般的に *Streptomyces* 属の微生物は不快臭揮発物質を生成することは知られていたが、validamycin 生成菌はそれらと異なり芳香臭を示したので本物質を分離・同定したところ *n*-hexanol と同定された。従来、直鎖アルコールの抗微生物作用の一部は知られていたが、我々は *n*-hexanol の殺菌作用の詳細について調べた。更に validamycin の生合成研究をする為 JCM4911から変異株を誘導して、それらの validamycin 非生成株の代謝産物を検討したところその内の1株 GT-32が生成するオリゴ糖がう蝕を予防することで知られるパノースであると同定した。一方、培養条件により生成する抗グラム陰性細菌に発育阻害活性を示す物質を分離・同定して nocardamine であることを明らかにした。現在、パノース合成酵素の精製および validamycin A の部分構造のひとつである Validoxylsmine A を前駆物質としてそれに UDP-glucose を転移させる酵素 (transglucorideu) の精製を行っている。一般に放線菌は変異し易い細菌と考えられていたが、長年放線菌を数多く扱って来た私は必ずしもそればかりとは考えていなかった。しかし、validamycin 生成菌及びその変異株はかなり変異し易くその原因を追求しかけたが、それが途中で中止せざるを得ず残念に思う次第である。

要 約

私は研究生活の大部分を企業にて過ごしたので省みでの成果もほとんどが企業での研究であった。そこで幸いにも私が商品化に拘わったものが Enramysin - 飼料添加剤, Validamycin - イネ紋枯病殺菌剤,

Sedecamycin—豚赤痢治療剤の3種は現在でも広く用いられ人々の役にたっている。また、不幸にも商品化出来なかったが、研究としては何らかの成果を残し得たものとして、Rufomycin, Maridomycin, Ansamitocin 及び殺菌剤の測定法及びその関連の研究を残すことが出来たのでそれらの成果をまとめた。

### 謝 辞

岡山大学での研究成果としては私の研究生生活のうち1/7しか述べる事が出来なかったが、教育のうち講義としては生物資源評価学、公衆衛生化学、資源利用評価学(大学院での抗生物質に関する化学、作用、副作用など)の講義、ケニヤでの2ヵ月の教育生活、ISO会議などそれまでに経験出来なかった多くの体験をさせて戴き、岡山大学農学部生物資源開発学講座の先生方及び学生の皆さんに厚く感謝する次第です。尚、研究遂行については種々ご援助戴いた武田薬品工業株式会社および関係会社に心の底から感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 中沢鴻一, 柴田元雄, 山本弘一, 神崎俊彦, 東出栄治, 浜田義男, 三宅 彰, 岩崎英介: 放射状菌に関する研究. ジヒドロストレプトマイシンならびにビタミン B<sub>12</sub> の生産について. 農化誌, **32**, 324-330 (1958)
- 2) 中沢鴻一, 柴田元雄, 山本弘一, 東出栄治, 神崎俊彦: 放射状菌に関する研究. ジヒドロストレプトマイシン共存下におけるビタミン B<sub>12</sub> の定量について. 農化誌, **32**, 400-405 (1958)
- 3) 中沢鴻一, 柴田元雄, 山本弘一, 神崎俊彦, 東出栄治, 三宅 彰, 堀井 聡: 放射状菌. 放射状菌に関する研究. *Streptomyces humidus* の生産する Humidin. 農化誌, **32**, 713-716 (1958)
- 4) 中沢鴻一, 柴田元雄, 山本弘一, 神崎俊彦, 東出栄治, 浜田義男, 三宅 彰, 人見 弘, 竹若寅男: 放射状菌 No.59266株の生産する echinomycin 様抗生物質: 武田研究所年報, **19**, 53-60 (1960)
- 5) 中沢鴻一, 柴田元雄, 和田和男, 神崎俊彦, 東出栄治, 三宅 彰, 人見 弘, 竹若寅男: 放射状菌 No.56635株の生産する amaromycin 様抗生物質. 武田研究所年報, **19**, 61-67 (1960)
- 6) Shibata, M., E. Higashide, T. Kanzaki, H. Yamamoto & K. Nakazawa: Studies on *Streptomyces*. *Streptomyces spulveraceus* nov. sp., producing new antibiotics Zygomycin A and B. Agric. Biol. Chem., **25**, 171-175 (1961)
- 7) Shibata, M., E. Higashide, T. Kanzaki, H. Yamamoto & K. Nakazawa: Studies on *Streptomyces*: Differentiation between antibiotic No. 45449 (Zygomycin A) and other antibiotics belonging to the neomycin group. Agric. Biol. Chem., **25**, 176-180 (1961)
- 8) Higashide, E., T. Kanzaki, H. Yamamoto, M. Shibata & K. Nakazawa: Studies on *Streptomyces*: Antibiotic activity of Zygomycin A. Agric. Biol. Chem., **25**, 181-187 (1961)
- 9) Higashide, E., T. Kanzaki, H. Yamamoto, M. Shibata & K. Nakazawa: Studies on *Streptomyces*: Cultural conditions for the production of Zygomycin A, a new antibiotic and the formation of Zygomycin B. Agric. Biol. Chem., **25**, 188-199 (1961)
- 10) 神崎俊彦, 東出栄治, 柴田元雄, 中沢鴻一, 三宅 彰, 竹若寅男: 放射状菌 No.58388株の生産する抗生物質 Novobiocin について. 武田研究所年報, **20**, 47-52 (1961)
- 11) Kanzaki, T., E. Higashide, H. Yamamoto, M. Shibata, & K. Nakazawa, H. Iwasaki, T., Takewaka & A. Miyake: Gougerotin, a new antibacterial antibiotic. J. Antibiotics ser. **A**, **15**, 93-97 (1962)
- 12) Higashide, E., M. Shibata, H. Yamamoto, M. Shibata & K. Nakazawa: Studies on *Streptomyces*. Part I. *Streptomyces atratus* nov. sp., producing new antituberculous antibiotics Rufomycins A and B. Agric. Biol. Chem., **26**, 228-233 (1962)
- 13) Higashide, E., M. Shibata, H. Yamamoto, K. Nakazawa, E. Iwasaki, J. Ueyanagi & A. Miyake: Studies on *Streptomyces*. Part II. Rufomyvins A and B, new antituberculous antibiotics. Agric. Biol. Chem., **26**, 234-237 (1962)
- 14) Higashide, E., T. Takewaka, M. Shibata, K. Mizuno, M. Imanishi, A. Miyake: Studies on *Streptomyces*. Simultaneous production of olenandomycin and chromomycins by *Streptomyces olivochromogenus* No. 69895. J. Antibiotics, ser. **A**, **18**, 26-37 (1965)
- 15) 東出栄治, 長谷川徹, 柴田元雄, 水野公明, 赤池東樹: 放射状菌に関する研究. *Streptomyces cuspidosporus* nov. sp. による Sparusomycin および Tubercidin の生産. 武田研究所年報, **25**, 1-4 (1966)
- 16) 長谷川徹, 東出栄治, 柴田元雄, 亀田幸彦, 水野公明: 放射状菌に関する研究 No. B-10000株の生産する ald-gamycin E 様抗生物質. 武田研究所年報, **25**, 15-23 (1966)
- 17) 東出栄治, 柴田元雄: 放射状菌に関する研究 Rufomycin 生成におよぼすアミノ酸の影響. 農化誌, **39**, 181-186 (1965)

- 18) 東出栄治, 柴田元雄: 放射状菌に関する研究. D-イソロイシンおよびL-アロイソロイシンによる Rufomycin 生成阻害. 農化誌, **39**, 187-193 (1965)
- 19) 東出栄治: 放射状菌に関する研究. Rufomycin 生成に対する DL-イソロイシンの拮抗阻害と未知ニンヒドリン陽性物質との関係. 農化誌, **42**, 394-400 (1968)
- 20) 東出栄治: 放射状菌に関する研究. Rufomycin 生成に対する阻害時 (DL-イソロイシンによる) に集積するニンヒドリン陽性物質の単離とその性状. 農化誌, **42**, 401-405 (1968)
- 21) Higashide, E., K. Hatano, M. Shibata and K. Nakazawa: Enduracidin, a new antibiotic. I. *Streptomyces fungicidicus* No. B-5477, Enduracidin producing organism. J. Antibiotics, **21**, 126-137 (1968)
- 22) 山本弘一, 日下大器, 東出栄治, 鈴木 孝: 抗生物質 B-62169 の研究 (I). 放線菌 B-62196 とそれが生産するマクロライド系抗生物質 B-62169A および B. 武田研究所年報, **28**, 50-60 (1969)
- 23) Harada, S., E. Higashide, T. Fugono & T. Kishi: Isolation and structures of T-2636 antibiotics. Tetrahedron Letters No. **27**, 2239 (1969)
- 24) Fugono, T., E. Higashide, T. Suzuki, H. Yamamoto, S. Harada & T. Kishi: Interconversion of T-2636 antibiotics produced by *Streptomyces rochei* var. *volubilis*. Experientia, **26**, 26 (1970)
- 25) Higashide, E., T. Hasegawa & M. Shibata: Lateriomycin A and B, new antitumor and antibacterial antibiotics produced by *Streptomyces griseoruber* No. 71070. J. Antibiotics, **22**, 409-418 (1969)
- 26) Higashide, E., T. Fugono, K. Hatano & M. Shibata: Studies on T-2636 antibiotics I. Taxonomy of *Streptomyces rochei* var. *volubilis* var. nov. and production of antibiotics and esyrase. J. Antibiotics, **24**, 1-12 (1971)
- 27) Fugono, T., K. Harada, E. Higashide & T. Kishi: Studies on T-2636 antibiotics. III. A new component, T-2636-F. J. Antibiotics, **24**, 23-28 (1971)
- 28) Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto & M. Shibata: Studies on validamycins new antibiotics. II. Production and biological properties of validamycins A and B. J. Antibiotics, **24**, 107-113 (1971)
- 29) Iwasa, T., E. Higashide & M. Shibata. Studies on validamycins, III. Bioassay method for the determination of validamycin. J. Antibiotics, **24**, 114-118 (1971)
- 30) Shibata, M., T. Hasegawa & E. Higashide: Tolypomycin, a new antibiotic I. *Streptomyces tolypophorus* n. sp., a new antibiotic, tolypomycin-producer. J. Antibiotics, **24**, 810-816 (1971)
- 31) Hasegawa, T., E. Higashide & M. Shibata: Tolypomycin, a new anti-biotic II. Production and preliminary identification of tolypomycin. J. Antibiotics, **24**, 817-822 (1971)
- 32) 杉田紀夫, 内藤健三, 浅井満子, 鈴木 孝, 東出栄治, 水野公明: Endura-cidin S の研究. 武田研究所年報, **31**, 313-330 (1972)
- 33) Ono, H., T. Hasegawa, E. Higashide & M. Shibata: Maridomycin, a new macrolide antibiotic. I. Taxonomy and fermentation. J. Antibiotics, **26**, 191-198 (1973)
- 34) Hatano, K., E. Higashide & M. Shibata: Studies on Juvenimicins, a new antibiotic. I. Taxonomy, fermentation and antimicrobial properties. J. Antibiotics, **29**, 1163-1170 (1976)
- 35) Suzuki, M., T. Takamaki, K. Miyagawa, H. Ono, E. Higashide & M. Uchida: Interconversion among leucomycin A2, carbomycin B and maridomycins. Agric. Biol. Chem., **41**, 419-421 (1977)
- 36) Higashide, E., M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino & M. Yonada: Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumor properties from *Nocardia*. Nature, **270**, 721 (1977)
- 37) Asai, T., H. Sawada, T. Ymaguchi, E. Higashide, T. Kono & M. Uchida: Kinetic study on the production of maridomycin by *Streptomyces hygrosopicus*. J. Ferment. Technol., **56**, 369-373 (1978)
- 38) Asai, T., H. Sawada, T. Ymaguchi, M. Suzuki, E. Higashide, T. Kono & M. Uchida: The effect of mechanical damage on the production of maridomycin by *Streptomyces hygrosopicus*. J. Ferment. Technol., **56**, 374-379 (1978)
- 39) Tanida, S., E. Higashide & M. Yoneda: Inhibition of cilia regeneration of *Tetrahymena* by ansamitocins, new antitumor antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother., **16**, 101-103 (1979)
- 40) Suzuki, M., T. Takamaki, K. Miyagawa, H. Ono, E. Higashide & M. Uchida: Interconversion among 16-membered macrolide antibiotics belonging to leucomycin-maridomycin group. Agric. Biol. Chem., **43**, 1331-1336 (1979)
- 41) Miyagawa, K., M. Suzuki, E. Higashide & M. Uchida: Effect of aspartic acid family amino acid on the production of maridomycin III. Agric. Biol. Chem., **43**, 1103 (1979)

- 42) Tanida, S., T. Hasegawa & E. Higashide : Ansamitocins, maytansinoid antitumor antibiotics. I. Producing organisms, fermentation and antimicrobial activities. *J. Antibiotics*, **33**, 192-198 (1980)
- 43) Tanida, S., T. Hasegawa & E. Higashide : Macbecins I and II, new antitumor antibiotics. I. Producing organisms, fermentation and antimicrobial activities. *J. Antibiotics*, **33**, 199-204 (1980)
- 44) Hatano, K., E. Higashide, M. Shibata, Y. Kameda, S. horii & K. Mizuno : Toromycin, a new antibiotic produced by *Streptomyces collinus* subsp. *albescens* subsp. nov. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1157-1163 (1980)
- 45) Tanida, S., T. Hasegawa & E. Higashide : A simple method for determining antitubulinic activities of ansamitocins and related compounds using a cilia regeneration system with deciliated *Tetrahymena*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1847-1853 (1980)
- 46) Tanida, S., E. Higashide & M. Yoneda : Ansamitocin-induced synchrony in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 411-417 (1980)
- 47) Tanida, S., T. Hasegawa, M. Muroi & E. Higashide : Dunacins, new antimicrobial activities. *J. Antibiotics*, **33**, 1443-1448 (1980)
- 48) Hasegawa, T., M. P. Lechvalier, and H. A. Lechvalier : *Actinosynnema* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 304-310 (1978)
- 49) Hatano, K., M. Muroi, E. Higashide & M. Yoneda : Biosynthesis of macbecin. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1699-1702 (1982)
- 50) K. Hatano, I. Nogami, E. Higashide & T. Kishi : Biosynthesis of enduracidin. Origin of enduracidin and the other amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1503-1508 (1984)
- 51) Hatano, K., E. Mizuta, S. Akiyama, E. Higashide & Y. Nakao : Biosynthetic origin of the ansa-structure of ansamitocin P-3. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 327-333 (1985)
- 52) Hatano, K., E. Higashide & M. Yoneda : Bioassay of ansamitocin p-3, an antitumor antibiotic. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1799-1890 (1984)
- 53) Hatano, K., E. Higashide, S. Akiyama, & M. Yoneda : Selective accumulation of ansamitocin P-2, P-3 and P-4, and biosynthetic origin of their acyl moieties. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1721-1729 (1984)
- 54) Tanida, S., T. Hasegawa, E. Higashide & M. Yoneda : Motile cells of *Actinosynnema pretiosum* susp. *auranticum*, a rare actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 461-467 (1984)
- 55) Higashide, E., S. Horii, H. Ono, N. Mizokami, T. Yamazaki, M. Shibata & M. Yoneda : Alahopcin, a new dipeptide antibiotic produced by *Streptomyces albulus* susp. *ochragenus* susp. nov. *J. Antibiotics*, **38**, 285-295 (1985)
- 56) Higashide, E., T. Kanamaru, H. Fukase, & S. Horii : Isolation of dealanyl alahopcin, a new amino acid and its biological activity. *J. Antibiotics*, **38**, 296-301 (1985)
- 57) S. Horii, H. Fukase, E. Higashide, M. Yoneda, H. Nishida, H. Sakai, A. Horita & A. Isogai : Structure of alahopcin (nourseimycin), a new dipeptide antibiotic. *J. Antibiotics*, **38**, 302-311 (1985)
- 58) 城野久美子, 植村美子, 久野光造, 東出栄治 : 塩化ベンザルコニウム及びグルコン酸クロルヘキシジンの殺菌力と殺菌速度. *薬学雑誌*, **105**, 751-759 (1985)
- 59) Okonogi, K., S. Sugiura, M. Kuno, E. Higashide, M. Kondo & A. Imada : Effect of  $\beta$ -lactemase induction on susceptibility to cephalosporin in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **16**, 3142 (1985)
- 60) Okonogi, K., S. Sugiura, M. Kuno, H. Ono, S. Harada & E. Higashide : Interaction of formyl amino and methoxy substituted  $\beta$ -lactem antibiotics with  $\beta$ -lactemase. *J. Antibiotics*, **38**, 1555-1563 (1985)
- 61) 東出栄治, 城野久美子 : 消毒剤の殺菌力と殺菌速度. *OHP News*, **28**, 10-15 (1986)
- 62) Okonogi, K., M. Kuno & E. Higashide : Induction of  $\beta$ -lactemase in *Proteus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 143-150 (1986)
- 63) 城野久美子, 熊田陽子, 久野光造, 東出栄治 : 電子体温計の殺菌処理. *医科器械学*, **56**, 407-414 (1986)
- 64) Jono, K., T. Takayama, K. Kuno & E. Higashide : Effect of alkyl chain length of benzalkonium chloride on the bactericidal activity and binding to organic materials. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4215-4224 (1986)
- 65) 城野久美子, 東出栄治 : 塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンに対する細菌の抵抗性. *防菌防黴誌*, **14**, 541-550 (1986)
- 66) 東出栄治, 浜田 雅 : ISP 菌株の形質保存に関する研究. *日本放線菌学誌*, No. **49**, 21-27 (1986)
- 67) 城野久美子, 東出栄治 : Dodecyl dimethyl benzalkonium chloride を主成分とする塩化ベンザルコニウムの殺菌力. *防菌防黴誌*, **15**, 561-567 (1987)
- 68) Sugiura, S., M. Kuno, E. Higashide & K. Okonogi : The removal of cephalosporins adsorbed on a membrane filter during sterility test. *武田研究所年報*, **47**,

- 97-104 (1988)
- 69) Higashide, E. : Checking system on taxonomic stability of the International Streptomyces Project (ISP) strains in Japan. *Biology of Actinomycetes '66*, pp. 210-215, Japan Scientific Societies press. Tokyo.
- 70) 杉浦 朗, 城野久美子, 東出栄治: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の薬剤感受性測定における培養温度の影響, 寒天稀釈法と1濃度ディスク法との比較, *薬理と治療*, **16**, 111-126 (1988)
- 71) 杉浦 朗, 池内信繁, 城野久美子, 東出栄治: 細菌の臨床分離株に対する Cefotiam, Cefmetazol, Cefmenoxime, Cefzonam, Flomoxef Carmonam の殺菌力について, *薬理と治療*, **16**, 63-77 (1988)
- 72) 杉浦 朗, 中村和世, 城野久美子, 東出栄治: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の殺菌効力, *Chemotherapy*, **38**, 203-213 (1990)
- 73) 杉浦 朗, 城野久美子, 東出栄治: *Proteus vulgaris* の生産する  $\beta$ -lactamase 及びその利用法, *和光純薬時報*, **57**, 1-13 (1989)
- 74) Sugiura, A., K. Jono, T. Kuno and H. Higashide : The effect of combination of cefotiam and the antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus in vitro*. *J. Antimicrobial chemotherapy*, **28**, 707-717 (1991)
- 75) Kimura, Y., Y. Nakagawa, T. Tokuda, M. Yamai, S. Nakajima, E. Higashide and S. Takagi : Structure of N-linked oligosaccharide of microsomal glycoproteins from developing castor bean endosperms. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 215-222 (1992)
- 76) Higashide, E. : Selective production of maridomycin III and its scale up in maridomycin fermentation. *Actinomycetol.*, **8**, 132-133 (1994)
- 77) Higashide, E. : Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. *Actinomycetol.*, **9**, 75-82 (1995)
- 78) Hoque, M. M., T. Ohashi, S. Inoue, Y. Omatsu and E. Higashide : Antimicrobial activities of n-hexanol isolated from an actinomycete. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 343-348 (1996)
- 79) Hoque, M. M., T. Ohashi, Y. Kimura, S. Nakajima, K. Nagamine and E. Higashide : Panose production by a mutant of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus*. *Biocontrol Sci.*, **2**, 7-12 (1997)
- 80) Hoque, M. M. and E. Higashide : Fermentation conditions for panose production by a mutant of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus*. *Actinomycetol.*, **11**, 11-14 (1997)
- 81) 東出栄治, 大橋利成, モハマト・マフズル・ホック, 中島修平: バリダマイシン生産菌が生成する揮発性物質, *岡山大学農学部学術報告*, **87**, 23-27 (1998)
- 82) 東出栄治, 大松義治, 井上末瑞, 木村吉伸, 神崎 浩, 中島修平: バリダマイシン生産菌培養液に含まれる抗細菌性抗生物質ノカルグミンの単離・同定, *岡山大学農学部学術報告*, **88**, 投稿中 (1999)

## 特許出願, 東出栄治 他

- 1) フミジンの製造法, 特公昭35-11600 (S.35.8.20)
- 2) ビタミン B<sub>12</sub> の製造法, 特公昭36-2599 (S.36.4.6)
- 3) ビタミン B<sub>12</sub> の製造法, 特公昭38-7079 (S.39.5.25)
- 4) 抗生物質の製造法 (Zygomycin A, B, D, 特公昭37-15300 (S.37.9.27)
- 5) 抗生物質の製造法 (Gougerotin), 特公昭36-9149 (S.36.6.30)
- 6) 新規抗生物質の製造法, 特願昭34-29997 (S.34.9.17)
- 7) 抗生物質の製造法 (Rufomycin), 特公昭36-17398 (S.36.9.26)
- 8) 抗生物質の製造法 (Oleandomycin & Chromomycin), 特公昭34-14499 (S.39.7.23)
- 9) 経口投与剤の製造法, 特願昭38-41382 (S.38.8.1)
- 10) 抗生物質の製造法 (Pillaromycin A & B), 特公昭41-7839 (S.41.4.26)
- 11) 抗生物質の製造法 (Gangtokumycin), 特公昭40-13789 (S.40.7.2)
- 12) 抗生物質の製造法 (Lateriomycin A & B), 特公昭41-13789 (S.41.8.2)
- 13) ピオチンの製造法, 特公昭41-21756 (S.41.12.19)
- 14) ルホマイシンの製造法, 特公昭42-5199 (S.42.3.2)
- 15) ピオチンの製造法, 特公昭42-3074 (S.42.2.9)
- 16) デスチオピオチンの製造法, 特公昭43-5713 (S.43.3.1)
- 17) 新規抗生物質の製造法 (Enramycin), 特公昭45-114 (S.45.1.6)
- 18) 新抗生物質の製造法, 特公昭40-65884 (S.40.10.26)
- 19) ラテリオマイシンの製造法, 特公昭45-31918 (S.45.10.15)
- 20) ラテリオマイシン F の製造法, 特公昭45-20559 (S.45.7.13)
- 21) 抗生物質の製造法 (Lateriomycin A & B), 特公昭41-13789 (S.41.8.2)
- 22) 抗生物質の製造法 (Sparsomycin, Tubercidin), 特公昭45-14877 (S.45.5.26)
- 23) 新規抗生物質の製造法 (T-2636 A, B, D-Sedecamycin), 特公昭45-6071 (S.45.2.28)
- 24) デスチオピオチンの製造法, 特公昭47-19034 (S.47.5.31)

- 25) 抗生物質の製造法, 特公昭45-24962 (S.45.8.19)
- 26) 抗生物質の製造法, 特公昭45-2721 (S.45.7.31)
- 27) 抗生物質の製造法 (Tolypomycin R), 特公昭45-25275 (S.45.8.21)
- 28) 新規抗生物質の製造法 (T-2636C), 特公昭47-20969 (S.47.6.13)
- 29) 抗生物質の製造法 (Toromycin), 特公昭46-271 (S.46.1.6)
- 30) 抗生物質 T-2636 誘導体の製造法 (Sedecamycin), 特公昭48-10422 (S.48.4.3)
- 31) 抗生物質の製造法, 特願昭44-13399 (S.44.2.22)
- 32) 酵素の製造法, 特願昭47-46915 (S.47.11.27)
- 33) 抗生物質 T-2636 モノアシル体の製造法—Sedecamycin, 特公昭48-74 (S.488.1.5)
- 34) 新規抗生物質の製造法, 特公昭47-7355 (S.47.3.1)
- 35) 新規抗生物質の製造法, 特公昭48-8804 (S.48.3.17)
- 36) 抗生物質 (T-2636の酵素転換 Sedecamycin) の製造法, 特公昭50-10317 (S.50.4.19)
- 37) 抗生物質 (Juvenimicin) の製造法, 特公昭47-4514 (S.47.2.8)
- 38) 抗生物質 (Maridomycin) の製造法, 特公昭47-7351 (S.47.3.1)
- 39) 抗生物質 (Maridomycin) の製造法, 特公昭51-42196 (S.51.11.13)
- 40) 抗生物質の製造法, 特公昭48-29154 (S.481.9.17)
- 41) 抗生物質の製造法, 特公昭49-48518 (S.49.12.21)
- 42) ジュベニミシンの製造法, 特公昭50-34637 (S.50.11.10)
- 43) 抗生物質の製造法, 特願昭45-129652 (S.45.12.25)
- 44) 新規抗生物質の製造法, 特公昭56-7675 (S.56.23.19)
- 45) 新規抗生物質およびその製造法, 特公昭58-26960 (S.58.6.6)
- 46) 新規抗生物質 T-42318, 特公昭59-5279 (S.59.2.3)
- 47) 新規抗生物質 T-15003 (Ansamitocin), 特公昭60-34556 (S.60.8.9)
- 48) メイタンシノール, メイタナシンおよびメイタンシノール・プロピオネートの製造法, 特公昭60-10718 (S.60.3.19)
- 49) 抗生物質 C-14919 E-1 および E-2 (Macbecin I & II), 特公昭59-29237 (S.69.7.19)
- 50) 抗生物質 C-14919 E-1 および E-2 (Macbecin I & II), 特願昭52-37884 (S.52.4.1)
- 51) メイタンシノール, メイタナシンおよびメイタンシノール・プロピオネートの製造法, 特願昭52-37885 (S.52.4.1)
- 52) 抗生物質 C-15003, 特願昭52-37886 (S.52.4.1)
- 53) 抗生物質 C-14482A (Dunacin), 特願昭59-48992 (S.59.11.30)
- 54) 抗生物質 T-47811, 特願昭52-131244 (S.52.10.31)
- 55) 抗生物質 C-13648 およびその製造法, 特公昭60-8118 (S.60.2.28)
- 56) 抗生物質 C-15003 P-4 の製造法, 特公昭60-10720 (S.60.3.19)
- 57) 抗生物質 C-15003 P-3 の製造法, 特公昭60-162360 (S.60.4.24)
- 58) トメイマイシン類の製造法, 特公昭61-5396 (S.61.2.18)
- 59) 抗生物質 C-15003 P-2 の製造法, 特公昭60-16237 (S.60.4.24)
- 60) 抗生物質 C-15462 の製造法, 特願昭53-40581 (S.53.4.5)
- 61) ノカルデイシンの製造法, 特願昭53-118141 (S.53.9.25)
- 62) 抗生物質 C-14482 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> および B<sub>3</sub> の製造法, 特公昭62-25156 (S.62.6.1)
- 63) 生理活性物質 B-52653 (Alahopcin) およびその製造法, 特開昭57-54151 (S.57.3.31)
- 64) ピロリジン誘導体の製造法およびその中間体, 特願昭56-10554 (S.56.1.26)
- 65) 生理活性物質 B-52653X (Dealanylalahopcin) およびその製造法, 特開昭57-123161 (S.57.7.31)
- 66) 生理活性物質およびその製造法, 特開昭58-10173 (S.58.1.24)
- 67) 殺菌消毒剤 (C<sub>12</sub> 組鎖塩化ベンザルコニウム) および殺菌消毒法, 特開昭61-76401 (S.61.4.18)
- 68) 殺菌消毒剤および殺菌消毒法, 特願昭60-153239 (S.60.7.10)
- 69) 殺菌消毒剤および殺菌消毒法, 特願昭60-182656 (S.60.8.19)
- 70) 眼科用組成物, 特願昭60-297707 (S.60.12.25)
- 71) 殺菌消毒剤および殺菌消毒法, 特願昭61-12548 (S.61.7.9)
- 72) 微生物の保存法, 特開昭63-245662 (S.63.10.2)
- 73) 抗生物質を生産する新規な放線菌, 特願平4-173322 (H.4.6.30) *Streptomyces* sp. MA-39 FERM BP-3893, *Streptomyces* sp. TA-13 FERM BP-3892, *Streptomyces* sp. NAT-4 FERM BP-3891
- 74) 抗生物質を生産する新規な放線菌, 特願平5-156644 (H.4.6.28) *Streptomyces* sp. MA-39 FERM BP-3893, *Streptomyces* sp. TA-13 FERM BP-3892, *Streptomyces* sp. NAT-4 FERM BP-3891
- 75) 新規変異株およびその用途, 特願平8-209758 (H.8.8.8) *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus* mutant GT-32 FERM BP-15758