

VOL. II NO. 10

SPOT CHECKED

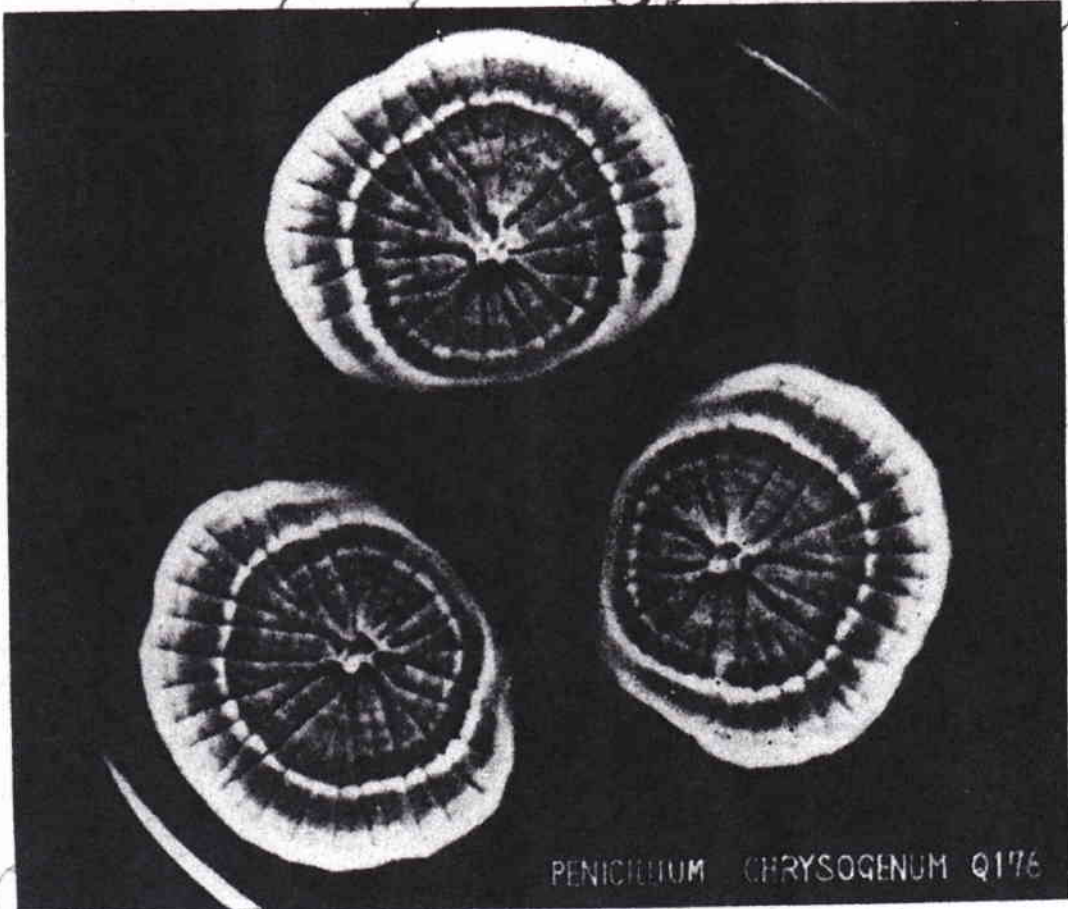
22 1949

JULY 1949

PENICILLIN JOURNAL of ANTIBIOTICS

ペニシリンその他抗生物質

IN JULY 1949
CIP



日本ペニシリン学術協議会
JAPAN PENICILLIN RESEARCH ASSOCIATION

ペニシリン生産培地に關する研究 第4報

培地組成研究法としての擴散培養法及び平板培養法に就いて

若木重敏・山口義信

森永藥品株式會社研究室

(昭和23年10月23日受付)

I. 緒言

種々の Screening test 法として、單孢子分離した孢子を Agar plate 上に移植し、Colony に接する部分の寒天を打抜いてこれに *Staphylococcus* を接種した。Bouillon agar plate 上に乗せてから孵卵器中に入れ、寒天圓柱周囲の阻止輪徑を測定し、その孢子のペニシリン生産能力を推定する方法は一般に採用されている。我々はこの方法を逆にペニシリン培養液組成の研究に應用出來ぬかと試みた結果、研究方法として或る程度の成果を得たので、更にこれを實用に供すべく本法を用い、STONE-FARRELL の合成培地組成に就いて系統的な研究を試みた。

また平板培養法の1變法として、孢子を全面的に接種した Agar plate 上の1~3點から周圍に可檢成分を擴散させ、その可檢物質の擴散した部分の寒天の特定の場所を菌蓋と共に打抜き、*Staphylococcus* を接種した Bouillon agar plate 上に乗せて寒天圓柱周囲の阻止輪徑を測ると、もとの Agar plate に於ける位置に従つて、擴散物質の濃淡に応じて一定の傾向を示すことが見られることを知つたので、本法もまた培地組成研究方法として應用出来るのではないかと考え、それに就いて實驗を行なつた。我々はこの方法を假りに擴散培養法と名づけたが、これは BEIJERINCK の所謂 Auxanography の方法をペニシリン研究に應用したものと云える。以下擴散培養法及び平板培養法の實驗方法及び實驗成績に就いて報告する。

II. 實驗方法

a. 平板培養法：ペニシリン生産力を檢定しようとする培地組成に2.5~3.0%の寒天を加えたものを試験管に作り、これを滅菌する。寒天熔融中にペトリ皿内に流し凝固させる。次に孢子懸濁液（大型白金環で2白金環分を10ccの滅菌蒸溜水に加えた程度の濃度）を一定量（1~2cc宛）ペトリ皿中に流し込み、表面を均一に濡らして接種する（本實驗に於いては徑85mmのペトリ皿に對し約20ccの寒天加培地を使つた）。

これが終つて24°C±1°Cの培養室中に培養する時は3回目頃から菌蓋が發育して來る。これを徑2mmの中空 Tube で菌蓋と共に寒天を打抜き、*Staphylococcus* を接種した Bouillon agar 上に置く。これを37°Cの孵卵器中に置けば、普通の檢定の場合と同様、各種培養液組成の相違によつてペニシリン生産量が異なり、従つて *Staphylococcus* の發育阻止輪に大小が出て來る。これと同條件でペニシリン加寒天圓柱の各濃度の Standard curve を書いて置けば、各培地組成のペニシリン生産量が Oxford unit で表わせる。

b. 擴散培養法：擴散培養法の基礎培地の作り方は前法に準ずる。接種した Agar plate の一隅に近くペニシリンの檢定に使う Stainless 製の Cup を Burner で濡め培地の厚さの約2/3程度さしこみ、檢定しようとする成分を適當な濃度の水溶液、またはこれに寒天を加えて滅菌した後その中に入れる。檢定しようとする成分が1つの場合には、寒天平板上に置く Cup の中は1箇所であるが、時には2~3箇の Cup を置き、これらに別々に2~3種の可檢成分を入れる。こうして24°Cに數日培養後、Agar plate の特定の場所を菌蓋と共に直徑2mmの tube で打抜き、檢定用 *Staphylococcus* を接種した Bouillon agar 上の阻止輪徑を測定する。この阻止輪徑と Cup から打抜部までの距離の關係から、試驗しようと思ふ成分の添加の効果の有無及び濃度と効果との大略の關係を知ることが出来るのである。

III. 實驗成績とその考察

A. 擴散培養法による實驗例

a. 1成分を添加した場合：前述のように、Agar plate の基礎培地は澱粉3%を炭素源とした STORN-

第1表 擴散培養の例(その1)

試 験 薬 品	Cup中の濃度	最大阻止輪徑 Cupから打抜部までの距離			基本培地の阻止輪徑	曲線の形状
		2.5mm	5 mm	7.5mm		
煆酸石灰	sat.	24.4mm	24.3mm	24.3mm	22.6mm	a 型
硝酸アンモン	8%	21.4	21.7	23.2	22.6	b 型
硫酸珪酸	6	23.7	24.3	24.8	22.6	
硫酸ニフケル	20	12.2	24.1	24.7	25.4	c 型
硫酸アンモン	6	23.1	24.5	23.8	22.6	
枸橼酸鐵アンモン	2	21.6	23.9	23.7	22.6	d 型
硫酸ソーダ	4	25.2	24.6	24.2	22.6	
硝酸バリウム	6	20.2	29.2	25.6	25.4	
炭酸カルシウム	10(懸濁)	25.5	25.0	23.2	25.4	

FARRELLの合成培地を用い、ペニシリンの効力検定用の Cup を胞子を接種した上の Agar plate 上に置き、Cup 中に実験室にあるありあわせの薬品を用いて Q176 の Substrain で実験を行なった。結果は第1表に示す通りである。

この結果から今 Cup の部分の阻止輪徑を基準として表わすと第1圖に示すような4つの傾向があらわれる。即ち、第1圖中の曲線 a で表わされるものはペニシリン生産に無関係であるか、または実験範囲内に於いて

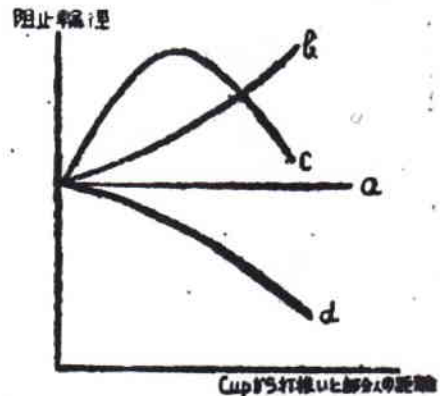
は濃度によつてペニシリン生産量に差異を生じないものである。曲線 b は寄作用があるか、または実験にかゝらないような薄い濃度に Optimum がある場合、曲線 c は実験範囲内の適当な濃度の所に生産促進効果の Maximum がある場合であり、曲線 d は濃度が大である程ペニシリン生産が大である場合を示すものである。そしてその詳細な検討は基本培地のみの場合の阻止輪徑の大きさと比較して得られる。

これから、どのような添加物がペニシリン生産を促進するか、またその濃度との関係はどうかというようなことが大略窺える。たゞ注意を要するのは、本法では単に靜的な濃度關係のみならず、動的な Feeding の影響も見られる点である。

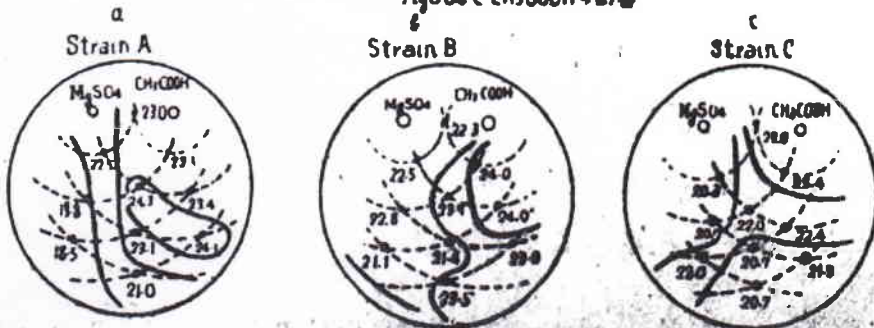
多くの場合、本質的にペニシリン生産促進効果を有する物質は第1圖の d 型または c 型を呈するが、しかしこれ等がすべて本質的なペニシリン生産促進効果をもつものとは必ずしも云えない。

b. 同時に2成分以上を検討しようとする場合：工夫することにより同時に2成分以上に就いて、添加によるペニシリン生産促進の各々の効果及びその相乗効果を知ることが出来る。今2成分の場合の実験例を示すと、検討しようとする2變数を硫酸マグネシウムと醋酸(加里型として)とし、基本培地としてはこの2變数を除いた STONE-FARRELL の合成培地組成の2倍、炭素源としては澱粉5%を加えたものに Agar を加えて plate とした。菌は Q176 の3つの Substrain を用いて実験したもので、成績は第2圖に示す通りである。Cup から同距離の點ではその擴散物質に関して同濃度であるとすれば、一方の物質の濃度の一定な状態に於ける他の第2物質の濃度の影響が本圖から推定出来る。

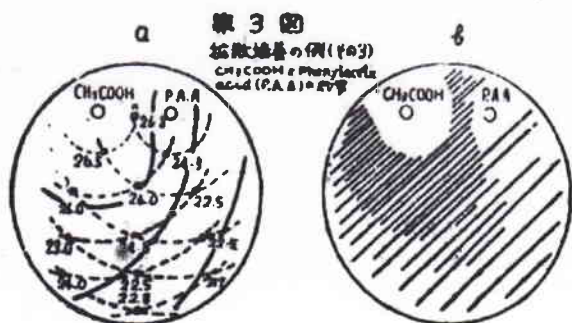
第1圖



第2圖 擴散培養の例(その2) MgSO₄とCH₃COOHの影響



さて、本例に於いては Strain A と Strain C とは明らかに醋酸に對する反應が異なり、Strain B に於いては硫酸の濃度が濃いほど生成されるペニシリンの量は多く、Strain A に於いては硫酸が極めて濃い場合より硫酸



第3図
拡散培養の例(463)
CH₃COOH + Phenylacetic acid (P.A.A.) = 10%

る濃度において効力が最高を示している。また本実験では、與えられた量の範囲内では硫酸マグネシウムの影響は醋酸に比して少ないと云える。第3圖aは Q176 のある Strain に就いて醋酸加里とフェニル醋酸の影響をしらべたものである(基本培地は前例と同じ)。本例に於いて興味のある點は、醋酸加里の極めて濃厚な部分に於いて當初は菌は生えず、ベニシリン生産力の最高は殆んど

菌の生え得る限界に近い點にあるという點で、またこの例に於いてはフェニル醋酸の影響は餘り顯著には現れていない。また單にベニシリンの効力のみならず、菌蓋の厚さ、胞子の形成、色素の形成等も、Cup からの位置により劇然とした差異を示すことは第3圖bに示す通りである。

a. 擴散培養法の得失

I. 特徴

1. たゞ1つの實驗で1~3種類の添加物の影響及び相互作用等を知る方法として便利である。
2. Strain の培養上の性質を比較するに適している。
3. 單にベニシリンの量のみならず、菌蓋の發育状況、色素產生の程度、胞子形成状況等に及ぼす添加物の影響を知り得る。
4. 實驗に必要な Sample の量は極めて少なくてすみ、實驗日数は短かく、2~7日あれば充分である。
5. Feeding の影響を同時に知ることが出来る。

II. 缺點

1. 得られた結果が定性的であつて、實際の表面または深部培養の成績との直接的な關係を見出すことは困難であり、たゞその重要な點を暗示するに止まるので、實地に應用するには實際の生産状況に即して確認試驗を行なう必要がある。
2. 寒天中を擴散しないものゝ効果を知ることは出来ない。

B. 平板培養法による實驗例

a. STONE-FARRELL 合成培地の系統的検討：吾々は Q176 系統の Strain を用い合成培地の系統的を行なつてきたが、普通の表面及び振盪培養試驗は實驗成績のばらつきが多く、一定の傾向を知ることが比較的困難であつた。本培養法は他の培養法に比して培養條件も比較的齊一に保つことが容易で、Q176 のような變異し易い Strain を用い、合成培地のように外的影響を受け易い培地を用いた研究等には、基礎實驗に於いてその絶対値はともかく、少くも培地組成のベニシリン生産力の高低の傾向を知るには有効であるように思われたので、これを利用して STONE-FARRELL の合成培地組成各成分の影響を系統的に調べることに着手した。即ち、STONE-FARRELL 合成培地の各成分の組成の影響を知るために炭素源を除く STONE-FARRELL 培地組成の成分をフェニル醋酸、醋酸、第1磷酸加里、硫酸鹽 (Fe, Cu, Zn Mg 鹽を含め) 硝酸鹽 (硝酸アンモン、硝酸ソーダ) に分け、これらを單獨または並行して倍加し、その影響を調べた。

この實驗は Strain の種々培地を具にするもの2種を用い2回繰返して實驗を行なつた。その實驗成績は第2表に示す通りである。

STONE-FARRELL の組成の中

フェニル醋酸を倍量加えた場合を	P ₁	磷酸加里を倍量加えた場合を	K ₁
醋 酸 " "	A ₁	硫酸鹽類 " "	S ₁
硝酸ソーダ } "	N ₁	フェニル醋酸を基本組成の値の場合を	P ₀
硝酸アンモン }			

以下同様に A₂, N₂, K₂, S₂ として表わして2回實驗を行なつた中、第1回目の實驗を D₁, 第2回目を D₂ とした。Strain は同じものを STONE-FARRELL 培地寒天に植えたものから移植したものを B₁, STONE-FARRELL の全無酸鹽を3倍した寒天培地に植えてそれから移植したものを B₂ として表わした。

従つて表中 P₁, A₁, N₁, K₁, S₁, D₁, B₁ なる記號で表されたのは Phenyl acetic acid, acetic acid, nitrate, sulphate, phosphate 等いずれも STONE-FARRELL 基本培地の倍量に等しく、また培養は STONE-FARRELL 培地の鹽類を2倍した組成に寒天を加えた斜面から移植したもので、しかも第1回の實驗に於いて示した成績を意味するものである。その他これに準ずる。

第3表 各組成に於ける寒天圓柱の示す阻止輪徑 (數字は mm×10, Y=10x-200 但しxは阻止輪徑)

		P ₀																P ₁															
		A ₀								A ₁								A ₀								A ₁							
		N ₀				N ₁				N ₀				N ₁				N ₀				N ₁											
		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁													
		S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁												
		D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂												
x		225	162	224	270	226	265	216	238	228	251	235	241	216	212	179	211	232	215	107	203	140	243	162	231	105	213	103	127	175	241	203	190
		258	190	223	257	248	261	237	252	246	263	254	251	251	230	182	231	247	235	151	222	196	251	196	246	117	228	133	175	200	238	243	221
Y		25	48	24	70	26	65	16	38	28	51	35	41	16	12	21	11	32	15	93	3	60	43	38	31	95	13	97	73	25	41	3	10
		58	10	23	55	48	61	37	52	40	63	54	51	51	30	18	31	47	35	49	22	4	51	4	46	83	28	67	25	0	38	43	21

表に示された數字は阻止輪徑を10倍した數字で、Yはその數を10倍して200を引いた値である。それを要因分析法に従い推計學的に各成分毎の分散を調べ、これからどんな場合にペニシリン生産力に差を生ずるかを検討した。その方法を簡単に説明すれば次の通りである。(P₀+P₁)(N₀+N₁)(A₀+A₁)(K₀+K₁)(S₀+S₁)(D₁+D₂)(B₁+B₂)これを展開した場合の各項に相當する實驗値を求めるのである。ペニシリンの濃度の問題を扱うような場合には、生産ペニシリンその儘の値を取るよりもそのlogを取つたほうがよい。幸い阻止輪徑は濃度のlogに近い形にあらわれているから、その儘利用することにする。成績は第2表に示す通りである。

その分析の仕方であるが、先づ調査しようとする條件による實驗値の平方和を求め、それを誤差分散と比較し FISHER の分布を使つて有意の差があるかどうかを決めるのである。各條件に就いて求めた平方和は第3表に示す通りである。

次に参考迄に平方和の求め方を書けば、たとえば S_p を求める場合 (P₀-P₁)(A₀-A₁)×……×……を展開し P₀ を含む項と P₁ を含む項とに分ける。この差は P を倍量入れたために生じた差である。

合計 $\frac{P_0}{810} - \frac{P_1}{125}$ ところで $S_p = \frac{(810 - (-125))^2}{125}$ と求める。

これから FISHER 分布の檢定は、第4表の要因分析表に見るようにして求めるのである。

従つて表中 P₁, A₁, N₁, K₁, S₁, D₁, B₁ なる記號で表されたのは Phenyl acetic acid, acetic acid, nitrate, sulphate, phosphate 等いずれも STONE-FARRELL 基本培地の倍量に等しく、また倍量は STONE-FARRELL 培地の鹽類を2倍した組成に寒天を加えた斜面から移植したもので、しかも第1回の實驗に於いて示した成績を意味するものである。その他これに準ずる。

第3表 各組成に於ける寒天圓柱の示す阻止輪徑 (數字は mm×10, Y=10x-200 但しxは阻止輪徑)

		P ₀																															
		A ₀								A ₁																							
		N ₀				N ₁				N ₀				N ₁																			
		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁																	
		S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁																
		D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂																
x		225	152	224	270	226	265	216	238	228	251	235	241	216	212	179	211	232	215	107	203	140	243	162	231	105	213	103	127	175	241	203	190
		258	190	223	251	248	261	237	252	246	263	254	251	251	230	182	231	247	235	151	222	196	251	196	246	117	228	133	175	200	238	243	231
Y		25	-48	24	70	26	65	16	38	28	51	35	41	16	12	-21	11	32	15	-93	3	-60	43	-38	31	-95	13	-97	-73	-25	41	3	-10
		58	-10	23	55	48	61	37	52	46	63	54	51	51	30	-18	31	47	35	-49	22	-4	51	-4	46	-83	28	-67	-25	0	38	43	21

		P ₁																															
		A ₀								A ₁																							
		N ₀				N ₁				N ₀				N ₁																			
		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁		K ₀		K ₁																	
		S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁																
		D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂																
x		234	245	224	233	242	213	222	257	139	199	113	255	123	256	126	151	129	221	88	24	117	230	173	230	70	274	103	137	123	160	143	136
		244	259	237	251	251	271	252	262	185	200	176	263	189	291	188	188	144	247	147	239	166	262	203	250	187	262	152	181	174	173	166	174
Y		24	45	24	33	42	43	22	57	-61	-1	-87	55	-77	56	-74	-49	71	21	-112	48	-83	30	-27	30	-130	74	-97	-63	-77	-40	-57	-64
		44	59	37	51	51	71	52	62	-15	20	-24	63	-11	91	-12	-12	-56	47	-59	39	-34	61	3	35	-13	62	-48	-19	-28	-27	-34	-26

表に示された數字は阻止輪徑を10倍した數字で、Yはその數を10倍して200を引いた値である。それを要因分析法に従い推計學的に各成分毎の分散を調べ、これからどんな場合にペニシリン生産力に差を生ずるかを検討した。その方法を簡単に説明すれば次の通りである。(P₀+P₁)(N₀+N₁)(A₀+A₁)(K₀+K₁)(S₀+S₁)(D₁+D₂)(B₁+B₂)これを展開した場合の各項に相當する實驗値を求めるのである。ペニシリンの濃度の問題を扱うような場合には、生産ペニシリンその儘の値を取るよりもそのlogを取つたほうがよい。幸い阻止輪徑は濃度のlogに近い形にあらわれているから、その儘利用することにする。成績は第2表に示す通りである。

その分析の仕方であるが、先づ調査しようとする條件による實驗値の平方和を求め、それを誤差分散と比較し FISHER の分布を使つて有意の差があるかどうかを決めるのである。各條件に就いて求めた平方和は第3表に示す通りである。

次に参考迄に平方和の求め方を書けば、たとえば S_p を求める場合 (P₀-P₁)(A₀-A₁)×.....×.....を展開し P₀を含む項と P₁を含む項とに分ける。この差は P を倍量入れたために生じた差である。そこで S_p = $\frac{(810 - (-125))^2}{125}$ と求める。

これから FISHER 分布の檢定は、第4表の要因分析表に見るようにして求めるのである。

次に2重の交互作用の平方和を求めるには例えば下の場合

k	N_0	N_1
P_0	a	c
P_1	d	b

$$SP \times N = (a+b-c-d)^2/k$$

と求める。

以下詳細は省略する。

3重交互作用以上の項はこれを誤差分散の中に入れ、そして分布の表をひけば第4表に示すような分散が得られる。さて、表中の一つ一つの平方和を検討して見ると、表中*を1つ附したのは5%、*を2つ附したものは1%の危険率を以て有意の差ありといえるものである。SP, SA, SN, SS, SD, SB はいづれも1%で有意とあらわれている。即ち、フェニル醋酸、醋酸、

第3表 平方和

SP	6829.88	SN B	951.67	SP D B	395.5
SA	56204.88	SK S	134.07	SA N K	3751.9*
SN	23719.26	SK D	1358.51	SA N S	159.8
SK	2202.82	SK B	25.38	SA N D	7396.3**
SS	4641.07	SS D	402.57	SA N B	126.0
SD	57142.51	SS B	13.13	SA K S	11838.8**
SB	20986.88	SD B	2320.51	SA K D	3331.1*
SPxA	39.38	SPxA N	3994*	SA K B	134.1
SPxN	6286.01	SPxA K	3454.9*	SA S D	3334.1*
FPxK	1086.95	SPxA S	908.5	SA S B	168.9
FPxS	0.0073125	SPxA D	361.1	SA D B	12.7
SPxD	6800.70	SPxA B	92.9	SN K S	297.0
SPxB	376.76	SPxN K	1533.2	SN K D	4129.2*
SAxN	82.88	SPxN S	599.5	SN K B	37.2
SAxK	3644.45	SPxN D	59.1	SN S D	-5954.1**
SAxS	897.82	SPxN B	805.0	SN S B	182.9
SAxD	8994.76*	SPxK S	3.5	SN D B	82.0
SAxB	358.51	SPxK D	2747.3*	SK S D	3091.0*
SNxK	876.76	SPxK B	3.5	SK S B	4.2
SNxS	1547.07	SPxS D	1976.6	SK B D	2.3
SNxD	96.26	SPxS B	33.1	SS D B	64.7

硝酸鹽 硫酸鹽を倍量加えたものは、いづれも、もとのものとペニシリン生薬に差が生じており、しかもいづれも STONE-FARRELL 培地そのままよりも効力が低下を示しているということがいえるのである。

第4表

要因	SS	f	V
P A ⋮ B	165739.1	7	
PxA P×N ⋮ DxB	36824.4	21	
PxA×N ⋮ SxDxB	61367.2	35	
E	46590.5	64	728
T	310521.2	127	

また種菌培地による差も有意となつている。ただ本成績に於いて注意を要するのは、SD がはつきりと有意の差を示していることは、同一の条件で実験を繰り返したと考えられる所の第1回実験と第2回実験との間に明らかに効力の差異があるということを示していることである。その原因としては、たとえば種菌の年齢、使用原料の種目差、培地の製造方法の差なども考えられる。しかし詳細は今後更に検討を要すると考えられ、その原因が明白にされない限り、普遍的な実験法則をつかむことは困難であるといふことになる。

次に2つの条件の相乗作用をしらべるために2重交互作用項の大きさを見ると、第3表に見るようSPxN, SPxD, SAxD は1%で SAxK は5%で有意と出ている。この意味を考えると、本実験の成績ではフェニル醋酸の効果は Nitrate を倍

加することによつて違つて来、Nを倍加するとフェニル醋酸の効果は下つて来る、また第1磷酸加里の量を倍加したら醋酸の効果は違つて来、この場合は前の場合とは逆に第1磷酸加里を倍加すると醋酸の効果は増して来ると考えられる。また実験の繰返しによりフェニル醋酸及び醋酸の影響の仕方に差が生じて来ていることもいえる。

3重交互作用項については SNxSxD, SAxKxS が1%で SPxAxN, SPxAxK, SAxNxB, SAxKxD, SAxSxD, SNxKxD が有意となつて出ている。結論的には本 Strain を用いた実験に於いては STONE-FARRELL 合成培地の基本組成のほうが各量を單獨または併行して幾つかを同時に倍加する場合に較べて一般に好成绩を示している。即ち、STONE-FARRELL そのものの組成が最も economical であるといえ

るのである。

h. 平板培養法の特徴

1. 他の培養法に比し培養条件を一定に保つことが比較的容易であるので、出た結果は比較的ばらつきが少く、他の培養研究法では培養条件の影響のために区別出来ないような培養組成の影響も識別することが可能である。

2. 操作が簡便で、試料が少くてすみ、従つて培地組成の研究に當つて大體の方向を定めるのに最も有力な方法であると思われる。

3. 本法は一般に孢子が表面に一様に分布し、菌蓋は一齊に發育し、液層の厚さは極めて薄いから、その条件に近い表面培養の場合等に於いてはこれに近い値を示すものと思われるが、實際の深部または表面の工業生産の条件はこれとは相當に異なるから、その成績を直接生産に適用することは不適當であり、必ず工業生産と同じ条件に於いて確認試験を行なう必要がある。

IV. 総 括

1. 研究しようとする培地組成を含む Agar plate 上に孢子懸濁液を接種し、後これを圓筒状に打抜き *Staphylococcus* を接種した Bouillon agar 上に乗せ、その阻止輪の大きさからもとの培養液組成のペニシリン生産能力を判定しようとする平板培養法及びその平板上に Cup を立て、その中にペニシリン生産促進力の有無を検定しようとする物質を入れ、その物質を Agar plate 中と通じて擴散させ、Cup より適當な距離の Agar plate を何箇所か打抜き、その打抜いた寒天圓柱の *Staphylococcus* 阻止力を測ることにより、その添加物質のペニシリン生産促進能力を推定しようとする擴散培養法を使用した實驗成績に就いて述べ、本法がペニシリン生産用培地組成研究法として有望な點を述べた。

2. 擴散培養法は Strain 相互の、または Mutant 等の培養上の性質の差異を比較するに便利な方法である。

3. 平板培養法を用い、要因分析法に従い、STONE-FARRELL 合成培地組成の系統的研究を行なつた結果に就いて述べた。そして鹽の組成は、本實驗の範圍内に於いては、STONE-FARRELL の鹽の組成が一番良好であることを確めた。

終に臨み本實驗の取り纏めに當り、詳細な點に到る迄一々御懇切な御指導を賜つた東大物産内科増山元三郎先生に對し謹んで敬意を表する。

文 献

- 1) BEJERINCK : Arch, Neerland. 23: 367, 1889
- 2) 増山元三郎 : 少数例のまとめ方と實驗計畫の立て方 河出書房
- 3) RAPER, ALEXANDER & COGHILL : J. Bact. 48 (5): 639~660, 1944

Studies on the Media for Penicillin Production, IV

On the diffusion culture method and the plate culture method

SHIGETOSHI WAKAKI & YOSHINOBU YAMAGUCHI
Laboratory of Morinaga Medical Company

(Received October 23, 1948)

SUMMARY

(1) We have tried to apply the plate culture method, which is often used for the screening test of penicillin producing molds, to the culture media for penicillin production. The experiment procedure is as follows;

The agar plate (agar 2~3%) of testing culture medium is inoculated with the spore suspension, and incubated at 24°C for 2~3 days, then the column of *Penicillium* mat with agar media is stamped out and put on the bouillon agar plate inoculated with *Staphylococcus aureus*. The bouillon agar plate is incubated at 37°C for about 20 hours.

The penicillin producing capacity of the medium can be presumed from the diameter of the inhibited zone.

(2) We have attempted to analyse the effect of duplication of each composition in STONE-FARRELL medium on the penicillin productivity, by this plate culture method. The experiment was done according to the factorial procedure, and the results were discussed statistically. The results were summarized as follows ;

- 1) Duplication of the amount of phenylacetic acid, nitrate, acetate and the sulphate was decided to lower the potency, with the danger of 1% error.
- 2) The effect of composition of sporulating medium was also evident.
- 3) It was very curious to observe that the penicillin productivity between two successive experiments was not same, though these experiments seemed to have been practised under the same conditions.
- 4) Double interaction effects of phenylacetic acid and nitrate, and potassium acetate and potassium biphosphate, were evident : Duplication of the amount of nitrate resulted in a decrease of positive effect of phenylacetic acid, but the duplication of KH_2PO_4 resulted in an increase of promoting effect of potassium acetate.
- 5) The effect of phosphate and acetate was not same in the two repeated experiments.
- 6) Original composition of STONE-FARRELL medium is most economical.

(3) We have introduced, as a convenient modification of the plate culture method, the "diffusion culture" method for the study of penicillin production media. This is applied by BEIJERINCK's auxanography to study the penicillin production. The procedure is as follows ;

We poured the testing substance into the cups put on the agar plate which contains fundamental nutrients, and inoculated it with spore suspensions. After incubating at 24°C for several days, the cylindrical column of *Penicillium* mat with agar portion is stamped out, and put on the bouillon agar plate inoculated with *Staphylococcus aureus*. The bouillon agar plate is, then, incubated at 37°C for about 20 hours. From the relation between the diameters of inhibited zones and the distances of the stamped out points from cups, we can judge the promoting effect of the testing substance.

This method is very convenient in comparing the cultural characteristics of new molds and mutants from the standpoint of penicillin production and in testing the promoting effect of a substance. These two methods seem to be very promising as the method of penicillin production media.

アメンチアのペニシリン治療

G. ZANETTI ; Penicillin in therapy of amnesia.
Cervello (Naples) 23 : 447, Nov. 15, 1947

感染症に起因する5例のアメンチアに5日間ペニシリン治療を行なつて全治させた。患者は幻覚または昏睡を伴う急性の虚衰、不規則な発熱、著しい脱水、貧血、胃腸障害、急速な体重減少、尿排泄量の分離、血圧低下、尿尿を認めたものである。

(J. A. M. A. 136 (9) : 654, Feb. 28, 1948)

幼児の胃腸障害に於けるストレプトマイシン

B. CIMINO & G. PURRAZZELLA : Streptomycin in therapy of enterocolitis and acute nutritional disturbances in infants. Giornale di Medicina, 4 : 130, May/July 1947

赤痢菌及び大腸菌による胃腸障害の幼児に、体重1kg當り10~40mg(1日量)を6~8日間投與し、全例に於いて良好な結果を得た。その中1例に合併した糖尿も同時に治癒した。サルファ剤治療は失敗におわつてゐる。

(J. A. M. A. 136 (6) : 428, Feb. 7, 1948)