

図20 メタノール酸化性微生物の生育

2.2. 放線菌による抗生物質生産とバイオアッセイによる抗生物質の定量

抗生物質 (antibiotics) とは、「微生物が生産する物質で、他の細胞の生存・活動を阻害するもの」と定義されているが、その範囲は非常に広大で、抗腫瘍性物質といったものも含まれる。最初に発見されたものは、今回のバイオアッセイの実験でも用いるペニシリン (penicillin) である。この抗生物質は、細菌が増殖する際にその細胞壁の合成を阻害するものである。発見当初は万能薬としてもはやされたが、グラム陰性菌には効果が低いとされている。現在では非常に多くの抗生物質が発見され、また、天然の抗生物質を出発基質として新たな性質を有するものを合成してより役に立つものが造られ、医薬・農業・食品等で用いられている⁹⁾。

ここでは、1. 微生物の形態学実験で自然界より分離してきた放線菌が抗生物質を生産するか否かを、バイオアッセイという分析法で確認する。

2.2.1. バイオアッセイ 1：ペーパーディスクとアッセイプレートを用いた方法

抗菌性を調べるための試験に供する細菌を含んだ寒天培地をガラスプレートに蒔き、放線菌の培養液を染み込ませたペーパーディスクを載せて培養する。通常、細菌は一面に生育し寒天平板培地表面は不透明になるが、その細菌に対して抗菌性を持つ抗生物質が生産されているならば、そのディスクの周辺では細菌の生育が抑制され寒天平板は透明なままとなる（これを生育阻止環という）。こうして、抗生物質の有無を確かめる。また、既知の各種抗生物質 (penicillin 系、cephalosporin 系各2種類。いずれも細胞壁合成阻害の抗生物質¹⁰⁾) の溶液を同様に処理して、その抗菌性について確認してみる¹¹⁾。

2.2.1 (1) 分離放線菌の再培養

1. 各自が分離した放線菌2株について、それぞれ斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の放線菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28°Cで4～7日間振とう培養する。
3. 円形ろ紙およびロートを用いて、培養液を濾過する。
4. 得られた培養液を2.2.1 (3) バイオアッセイに供する。

2.2.1 (2) 被検細菌の培養・アッセイプレートの作成

4人1組で2枚のガラスプレートを使用する。1. 微生物の形態学実験で培養したグラム陽性菌及び陰性菌各1株を被検菌として使用する。

【実験方法】

1. 各被検菌の斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の細菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28°Cで1日振とう培養する。

- 得られた被検菌培養液から、乾熱滅菌したピペットで0.2 ml をとり、1.8 ml の滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl、オートクレーブ済、1.8 ml/16.5×105 mm、アルミホイル) 中に加えて、約10 倍に希釈する。
- 予め用意した寒天培地 (1.1.1. 培地の調製の細菌用培地、300 ml/500 ml 容三角フラスコ、アルミホイル) を5分間オートクレーブして、寒天を溶かした後、50°C ぐらいまで冷却する (このとき、アルコールで拭いた温度計をアルミホイルに穴をあけて培地に差し込み、温度を監視する)。
- 50°C 付近まで冷却した寒天培地に3.の希釈培養液 1 ml を無菌的に加えて、手早く泡立たないように静かに攪拌する。
- 攪拌後すぐに、バイオアッセイ用ガラスプレート (オートクレーブ済) に、平らに流し込み固化させる (このとき、ふたを少しだけずらして、蒸気を逃がす。固化するまで絶対に動かさないこと)。

2.2.1 (3) バイオアッセイ

【実験方法】

- 放線菌培養ろ液2種類 (4人分8種類) および標準抗生物質溶液20種類* (4種類×5濃度)、合計28種類を準備する。
- アルミホイル上に並べたペーパーディスク28個に各サンプルをピペットマンで0.05 ml ずつ染み込ませる。これを2セット (2プレート分) 用意する。
- ピンセットを用いて、適当な間隔でアッセイプレートの上ののせる (どの濃度の抗生物質が染み込んだペーパーディスクかを把握しておくこと)。
- 28°C で1日静置培養する。
- ペーパーディスクの周りにできた生育阻止環の直径 (mm) を測定する。

* 以下の4種類の抗生物質 (penicillin [グラム陽性], ampicillin [グラム陽性、グラム陰性、広域ペニシリン], cephalosporin [グラム陽性、グラム陰性], cephalixin [グラム陽性、グラム陰性]) について行う (各1 mg/ml の標準液100 ml ずつを当番が準備)。各班にて希釈を行い、10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ の計5種類を準備する。

【実験結果】

測定した結果を片対数グラフ用紙にプロットする (図2 1)。

阻止環の直径：普通目盛 (横軸) 抗生物質濃度：対数目盛 (縦軸)

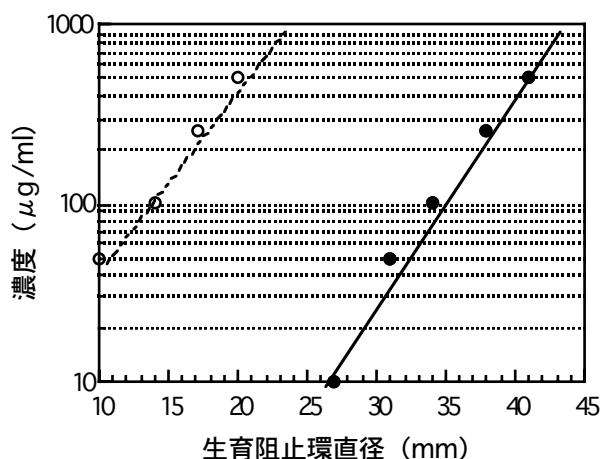


図2 1 抗生物質による生育阻止

2.2.2. バイオアッセイ 2：交叉培養法

抗生物質の生産性を試験するもう一つの方法として、交叉培養法 (cross streak method) を試みる。本法では、生産される抗生物質がどのような細菌に効力を示すかを調べる事ができる^{12,13)}。

【実験方法】

1. 放線菌の簡易スライド培養法で使用した放線菌の平板培養を使用する*。
2. 被検菌 2 株（グラム陽性菌およびグラム陰性菌）を図 2 2 のごとく画線する（コンタミしている場合は、できるだけその箇所を避けて画線する。スペースが狭い場合は、画線可能な範囲だけでよい）。
3. 28℃で被検菌を生育させ、それぞれの被検菌の生育阻止帯の長さ（mm）を測定する。

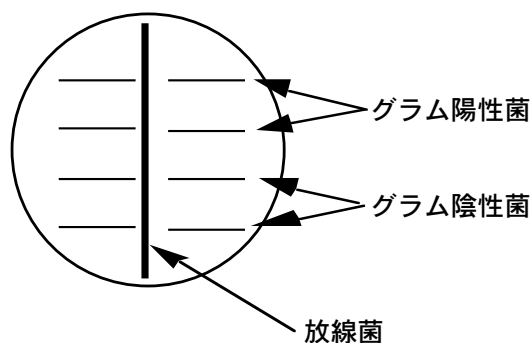


図 2 2 交叉培養法

*放線菌のスライド培養法を失敗した人は、もう一度培養を行う。

参考文献

- (6) 谷 吉樹 “応用微生物学” コロナ社、1992、pp. 84-85
- (7) 谷 吉樹、児玉 徹、倉根隆一郎 “バイオコンバージョン” 医学出版センター、1993、pp. 79-86
- (8) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 32
- (9) 谷 吉樹 “応用微生物学” コロナ社、1992、pp. 147-155
- (10) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 114
- (11) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 108-109
- (12) 緒方浩一 “応用微生物学概論” 同文書院、1972、pp. 107-108, 178-179
- (13) 京都大学農学部農芸化学科編 “農芸化学実験書” 第 2 巻、産業図書、1957、pp. 880-881