稲白葉枯病菌ファージ (OP₁ ファージ) の 乾燥不活化に

対する種々の物質の保護効果*

脇 本 哲**

Satoshi WAKIMOTO: Protective effects of various materials against the drying inactivation of *Xanthomonas oryzae* phage (OP₁ phage).

1. 緒 言

ファージの溶液貯蔵の場合は雑菌繁殖に伴う不活化からファージを保護するため無菌的な条件が絶対に必要である。またファージの溶液中における不活化は同一条件下においてもファージを含む液の種類により著しい差異があり、アミノ酸、蛋白、糖類及び若干の無機塩類を含む微生物の増殖に好適な培地に浮遊させた方が活性の保存が良好であり、更に耐熱性も大であることは既報⁴⁾でのべた。バクテリオファージの保存は、従つて、種々の栄養分を含む増強液を限外濾過或は遠沈することにより無菌的に低温保存するのが普通であり、或は溶菌斑の形成されたシャーレをそのまま冷蔵し必要に応じて溶菌斑からファージを分離して使用するのが普通である。然し前者はサイズ、シェンベルランなどの細菌濾過器を通すことにより数分の1ないし数千分の1に力価の低下がみられ、また一方遠沈操作などにより、力価の減少を防ぎ而も完全に無菌的に貯蔵できたとしても、なお冷蔵中にファージの力価は漸次低下し、常に安定な力価のファージ液を供給することはでき難く、また後者は冷蔵中に寒天が漸次乾燥しファージも不活化するため数日毎に更新する必要がある、前者と同様に常に一定の高力価のファージ液を供給するわけにゆかない。

一定の高力価のファージ液が供給できれば、バクテリオファージによるバクテリアの定量⁵⁾の際、及びバクテリオファージにより多くの試料中のバクテリア数を比較しようとする際⁷⁾に極めて便利である。またファージの種類系統を多数保存する必要がある場合も度々の更新は容易でなく、より簡単な長期保存法が望ま

れる。

筆者は多種類のファージの保存と、更に必要な時に常に高い一定の力価のファージ液が供給できるようにする為の最も適当な保存法の探索を直接の目的として本実験を行った。

2. 実験材料及び共通の実験方法

稲白葉枯病菌ファージ (OP₁) を使用し、種々の乾燥処理前後におけるファージの力価測定には指示菌として稲白葉枯病菌 No.60⁶⁾ の馬鈴薯半合成培地⁴⁾ 斜面での 30°C 48 時間培養菌を使用した。

常温真空乾燥法：シャーレ中に丁度入る大きさの濾紙を敷き、これにカバーガラス (1.8 cm²) を並べ、その上に種々の物質に混じたファージの原液を 0.01ml/ずつ滴下してデシケーター中に入れ、200l/min の真空ポンプで2時間吸引し完全に乾燥させる。乾燥直後または真空中で一定期間冷蔵後取出し乾燥試料の乗ったそれぞれのカバーガラスを 1 ml/ ずつの殺菌蒸溜水と共に乳鉢中で磨砕し、その磨砕液の 0.01ml/ (即ち D₁0.01ml/) 或はその 100 倍稀釈液からの 0.01ml/ (即ち D₂0.01ml/) を取り常法に従つて稲白葉枯病菌 No.60 を指示菌として平板に流し、30°C、10~20 時間後に生じた溶菌斑を計数してファージの力価を知り保存性を比較した。

冷凍真空乾燥法†：CaVfCh 培地⁴⁾ または馬鈴薯半合成培地⁴⁾ で増強したファージ液或は保護効果を検べようとする物質の溶液と混じたファージ液を真空冷凍乾燥用特殊瓶 (Fig.1) に 1 ml/ ずつ入れ、共和式 RH 1000 型冷凍真空乾燥機により、-40°C 前後に凍結後約 6 時間真空乾燥し、真空のまま密栓し 5°C 前後の低温で貯蔵し、ファージの力価測定の際 1 個ずつ取出し 1 ml/ の殺菌蒸溜水で復元し、その力価を常法により測定した。

常温常圧乾燥法：真空乾燥法の場合と略同様であるが唯真空ポンプを使用せずデシケーター中でそのまま乾燥させた。

* 九州大学農学部植物病理学教室業績、本実験の御指導と論文の御校閲を頂いた吉井甫教授に深謝の意を表す。

** 九州大学農学部

† 凍結乾燥に際し御指導頂いた九州大学農学部船津勝助教授及び船津軍喜氏に謝意を表す。

Fig. 1

Special bottles used for preserving the freeze-dried materials under vacuum.

A : Freeze-dried OP₁ phage from the suspension of 0.001 per cent gelatin.

D : Freeze-dried filter paper saturated with OP₁ phage suspended in semi-synthetic media.

B : Freeze-dried OP₁ phage from the suspension of 0.1 per cent gelatin hydrolysate.

C : Freeze-dried OP₁ phage from the suspension of semi-synthetic media.

結 果

Table 1
Preservation of OP₁ phage activity under various drying conditions, with various added materials.

Methods for drying	Phages mixed with	Plaque counts per D ₁ † 0.01 ml								
		Before drying	Days after drying							
			0	2	5	24	30	60	120	180
F.D.*	CaVfCh media	8200	125	/	/	/	0	0	0	0
	Semi-synthetic media	101000	53500	/	/	/	44700	46600	43800	46500
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	2540	/	2550	2780	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	1800	/	1540	1400	/	/	/	/
	Distilled water	do	118	/	12	5	/	/	/	/
V.D.*	CaVfCh media	23400	520	0	0	0	/	/	/	/
	Semi-synthetic media	do	10800	10500	7600	6500	/	/	/	/
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	1520	/	1400	1480	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	610	/	520	560	/	/	/	/
	Distilled water	do	4	/	0	0	/	/	/	/
O.D.*	CaVfCh media	23400	/	80	0	0	/	/	/	/
	Semi-synthetic media	do	/	18000	12100	4600	/	/	/	/
	Gelatin hydrolysate (10%)	2750	/	171	7	/	/	/	/	/
	Gelatin (1%)	do	/	10	0	/	/	/	/	/
	Distilled water	do	/	0	0	/	/	/	/	/

Figures are the average number of plaques produced in three plates.

* F.D. : Freeze drying, V.D. : Vacuum drying,

O.D. : Ordinary drying within desiccator

† Solutions diluted one hundred folds with distilled water.

(1) 乾燥方法の差異及び培地の差異とファージ不活化との関係

異った3種の乾燥方法、即ち、冷凍真空乾燥、常温真空乾燥及び常温常圧乾燥により、異った培地、即ちCaVfCh培地、馬鈴薯半合成培地、ゼラチン溶液(0.01g/ml)、ゼラチン加水分解液(0.1gゼラチン/ml)及

び対照として蒸留水中に存在するファージを乾燥させた場合の力価の変化を一定期間後測定し比較した。行った実験区分及びその結果は Table 1 のようである。

Table 1 より特に生存率の高いのは冷凍真空乾燥である。常圧乾燥によれば培地の種類をとわず保存不可能のようである。またほとんどの肉眼的に乾燥した後真空中に移して冷蔵すれば概して真空乾燥の場合と変わらないようである。乾燥の際の不活化と最も関係の深いのはファージを含む培地の種類である。CaVfCh 培地は蒸留水中に 10 % カゼイン加水分解物を 0.2 % の割合に含ませ更に CaCl₂ を 0.05 % になるように添加した培地であり、馬鈴薯半合成培地は馬鈴薯煎汁にペプトン、蔗糖の他若干の無機塩類を含んだ培地である。ファージを含んだ液が後者の場合には前者の場合に比し何れの乾燥方法によるもファージの保護効果が大きく、特に冷凍乾燥の場合は長期間殆んど力価に変化がみられない。

(2) 真空乾燥によるファージ不活化に対する異種蛋白及び糖類の保護効果

異種の蛋白、糖類及びアミノ酸その他無機塩類を多量に含んだ馬鈴薯半合成培地はファージの液体保存の場合にも有効に保護効果を示すことは既報⁴⁾の通りであるが、乾燥によるファージ不活化の際にも CaVfCh 培地よりも保護効果が大きく更に以後の活性維持も良好であることが証明された。然らば如何なる物質が

乾燥の際ファージの保護作用を示すのであろうか。

種々の蛋白保護剤の内の数種につき、乾燥の際のファージの保護効果を比較した。使用した物質は蛋白としてゼラチン、アルブミン、糖類として可溶性澱粉、蔗糖、葡萄糖、その他にアラビヤゴム及びゼラチン加水分解物、対照として馬鈴薯半合成培地及び蒸留水を使用した。ゼラチン加水分解物はゼラチンを 20.5 % の HCl で 25 時間加水分解し減圧蒸溜により HCl の大部分を除いた後濃厚な苛性ソーダ液で pH7.0 としたものである。結果は Table 2 に示した。

Table 2 より、乾燥の際のファージ活性保護のためには蛋白が有効であり、用いた糖類はすべてその効果のないことが明らかである。従つてアラビヤゴムはその中に含まれていると思われる或種の蛋白により保護効果を示したものと考えられる。ゼラチン加水分解物の効果が最も著しいことは、これらの物質のファージ保護の機構が単に液気界面に形成される蛋白単分子膜の効果のみではないことを想像させる。

(3) 真空乾燥によるファージ不活化に対する各種濃度のゼラチンの保護効果

蛋白のファージ保護の機構は、液気界面における蛋白の単分子膜の形成によりファージの界面変性による不活化を防止することにあるとされている¹⁾。ゼラチンの存在は OP₁ ファージの乾燥不活化を防ぐことが判明したので、その濃度との関係を検討した。実験に

用いたゼラチンの濃度とその効果は Table 3 の如くである。

即ち Table 3 より、ゼラチンの濃度は 10⁻³g/ml 以上において保護効果が顕著である。然しながら 10⁻⁴g/ml 以上の濃度では常温において凝固するため不便である。従つてファージ保護の目的で添加する場合は 10⁻³~10⁻²g/ml になるようにするのが適當である。

Table 2
Protective effects of various materials against inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Materials	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01 ml		Per cent survived
		Before drying	After drying	
Gelatin	2×10 ⁻²	5100	1030	20
Albumin	do	do	1140	22
Soluble starch	do	do	1	0
Sucrose	do	do	1	0
Glucose	do	do	7	0
Gum alabic	1×10 ⁻¹	1435	320	22
Gelatin hydrolysate	do	1435	735	51
Semi-synthetic media		5100	1850	36
Distilled water		1435	8	0

Plaque counts are the average numbers of plaques produced in three plates

Table 3
Protective effects of varied concentrations of gelatin
against inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Concentration (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01ml		Per cent survived
	Before drying	Five days after drying	
10 ⁻¹	4400	885	20
10 ⁻²	do	865	20
10 ⁻³	do	825	19
10 ⁻⁴	do	215	5
10 ⁻⁵	do	21	1
0	do	29	1

Plaque counts are the average numbers of plaques produced in three plates.

(4) 真空乾燥によるファージ不活化に
対するゼラチン加水分解物の保護
効果

ゼラチン加水分解物の方が生のゼラチンよりも保護効果の大きいことが判明したので下記の如き各種の分解程度のゼラチン加水分解物を作りその保護効果を比較した。

- 1) 3倍量の 20.5 % HCl で 25 時間加水分解後減圧で大部分の HCl を除去、濃厚 NaOH 液で中和、pH7.0 とし最終濃度を 10⁻¹g/ml とす。
- 2) 3倍量の 20.5 % HCl で 2 時間加水分解、他は 1 と同様。
- 3) 3倍量の 10 % HCl で 6 時間加水分解、他は 1、2 と同様。
- 4) 3倍量の 10 % HCl で 2 時間加水分解、他は前と同様。

これらの対照として 10⁻²g/ml のゼラチン溶液を用

Table 4
Protective effects of gelatin hydrolysates against
inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Materials	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01ml		Per cent survived
		Before drying	after drying	
Vitamin free casein hydrolysate (Toshiba)	10 ⁻¹	528	221	42
Casein hydrolysate*	10 ⁻¹	do	213	40
Gelatin hydrolysate*	10 ⁻¹	do	315	60

* : Proteins were hydrolyzed for about two hours with 10 per cent hydrochloric acid.

いたものを設け実験した結果、真空乾燥により 1, 2, 3, 4 は何れも約 70 % の保護効果を示し相互間には全く差が認められなかつたのに比し、ゼラチンは約 35 % の保護効果しか示さなかつた。ペーパークロマトグラフによりこれらの分解程度を比較してみると、10 % HCl 2 時間加水分解したものでは分解が特に完全でなく、その他のものに比較して多くのニンヒドリン

発色スポットを現わした。即ち中間分解物即ち多くのペプチドを含むものと考えられる。

然しながらペーパークロマトグラフにより完全にアミノ酸に分解されていることを確認した市販カゼイン加水分解物（東芝化学製）も尚よく顕著な保護効果を示すことは Table 4 より明らかである。

即ち保護効果には純アミノ酸もあづかつて力のあることを如実に示しているものと考えられる。

またゼラチン加水分解物 (20.5 % HCl 2 時間) の各種濃度について保護効果を検討した結果は Table 5 の如くである。

これらゼラチン加水分解物中には中和に伴つて生ずる NaCl を多量に含むので、この NaCl の効果の有無を確かめるため、また試みに CaCl₂ をも含めて実験し、これら無機塩類の効果を検討した。結果は Table 6 のようである。

Table 6 より加水分解物中に含まれる NaCl、及び CaCl₂ はそれ自体は保護効果を示さないことが明らかである。

(5) 真空乾燥によるファージ不活化に対するゼラチン構成アミノ酸の保護効果

生のゼラチンよりもその加水分解物の方がファージの保護作用が著しく大であり、殆んど完全に分解されたゼ

Table 5

Protective effects of varied concentrations of gelatin hydrolysate against the inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Concentration of gelatin hydrolysate (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01 ml		Per cent survived
	Before drying	After drying	
10 ⁻¹	1095	675	62
10 ⁻²	do	435	40
10 ⁻³	do	193	18
10 ⁻⁴	do	1	0
10 ⁻⁵	do	4	0
Distilled water	do	2	0

Figures are the average numbers of plaques produced in two plates.

Table 6

Protective effects of varied concentrations of sodium chloride against inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Concentration of NaCl solutions (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01 ml	
	Before drying	After drying
10 ⁻¹	468	0
10 ⁻²	do	1
10 ⁻³	do	1
10 ⁻⁴	do	0
Distilled water	do	0
CaCl ₂ 10 ⁻¹ g/ml	do	0

Figures are the average numbers of plaques produced in three plates.

Table 7

Constitution of the mixed amino acids used for testing the protective effect against inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Amino acids	Concentration (g/l)	Amino acids	Concentration (g/l)
Glycine	26.9	Serine	3.2
Alanine	9.3	Threonine	2.2
Valine	3.3	Methionine	0.9
Leucine	3.4	Arginine	8.6
Isoleucine	1.8	Histidine	0.7
Proline	14.8	Lysine	4.6
Hydroxyproline	14.5	Hydroxylysine	
Phenylalanine	2.6	Aspartic acid	6.7
Tyrosine	1.0	Glutamic acid	11.2

pH 7.2

ラチン及びカゼインにおける充分なる保護効果は蛋白或はペプチドの単なる単分子膜形成によるファージの界面変性よりの保護のみではなく、アミノ酸もファージ粒子へ可逆的に結合することにより乾燥即ち全粒子が界面にさらされる現象でのファージの不活化から保護する作用を持つているものと考え、ゼラチン構成アミノ酸 (Hydroxylysine を除く) をその構成割合に混じ NaOH により pH7.2 とし乾燥の際の保護効果を検討した。使用したアミノ酸の種類と割合は Table 7 のようである。その保護効果の実験結果は Table 8 のようである。

Table 8 からゼラチンの割合に混合した純粋のアミノ酸によつても相当程度の保護効果があることが明らかになった。

(6) 真空乾燥によるファージ不活化に対する個々のアミノ酸の保護効果

ゼラチン構成アミノ酸で真空乾燥に伴うファージの不活化がかなり阻止されることを証明したが、更にこの構成アミノ酸がすべて同様に保護作用を示すものか、或はそれらの中の特殊のアミノ酸のみが現わす効果であるかを明らかにするため、Table 7 のそれぞれのアミノ酸を 2×10⁻²g/ml になるようにし、これにファージを加えて真空乾燥を行った。その結果は Table 9 の如くである。

ゼラチン構成アミノ酸の内 Leucine と Tyrosine は、pH7.2 において難溶の為用いなかった。Table 9 から

Table 8

Protective effects of the mixed amino acids which constitute gelatin hydrolysate against the inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Materials	Plaque counts per D ₁ 0.01 ml		Per cent survived
	Before drying	After drying	
Mixed amino acids	13800	2600	19
Gelatin hydrolysate	do	6900	50
Distilled water	do	8	0

Figures are the average numbers of plaques produced in three plates.

Table 9

Protective effects of various amino acids contained in gelatin hydrolysate against inactivation of OP₁ phage under vacuum drying.

Amino acids	Concentration (g/ml)	Plaque counts per D ₁ 0.01 ml		
		Before drying	Just after drying	Four days after drying
Glycine	2×10 ⁻²	4300	485	55
Alanine	do	do	68	2
Valine	do	do	0	1
Isoleucine	do	do	0	0
Proline	do	do	54	1
Hydroxyproline	do	do	0	1
Phenylalanine	do	do	0	0
Serine	do	do	3	2
Threonine	do	do	11	7
Methionine	do	do	2	1
Arginine	do	do	0	0
Histidine	do	do	430	435
Lysine	do	do	27	11
Aspartic acid	do	do	136	160
Glutamic acid	do	do	260	285
Dist. water		do	1	0

Each solution was adjusted to pH7.2 with NaOH.

Figures are the average numbers of plaques produced in two plates.

アミノ酸の保護効果は特異的なものでありすべてが同一の作用を示すものではないことが判明した。而して Glycine, Alanine 及び Proline は乾燥直後は或程度の保護効果を示すが貯蔵期間中にその効果は著しく失われる。これに比し Histidine, Aspartic acid 及び Glutamic acid は乾燥直後から永く顕著な保護効果を維持する。その他 Threonine, Lysine, Serine 及び Methionine も微弱ながら効果を示すようである。Valine, Isoleucine, Hydroxyproline, Phenyl-

alanine, Arginine などは全く効果を示さない。

(7) 冷凍真空乾燥によるファージの活性保存

馬鈴薯半合成培地に増強したファージまたはゼラチン、ゼラチン加水分解物などと混じたファージは冷凍乾燥後においても半分以上の力価が保存されるが、真空中で冷蔵すれば以後長期間にわたり全く力価に変化が見られないことが明らかになった。多くのファージ系統を一定の力価の下に保存しようとする場合、従ってこれらと混じたファージ液を特殊瓶(Fig. 1)に入れて冷凍乾燥し真空低温保存するのが便利である。

単なる保存が主目的で而も屢々取出して使用する必要或は郵送の必要のある場合などは、馬鈴薯半合成培地増強ファージ液を約 1 cm² の濾紙に吸わせ特殊瓶に入れて冷凍乾燥すれば乾燥後も特に強い吸湿性はなく便利である(Fig. 1, D)。必要に際して1枚ずつ取出して使用できる。生否の判別は OP₁ にあつては稲白葉枯病菌 No. 60 の平板上にこの濾紙を置き 30°C に数ないし十数時間保ち、濾紙の周囲に阻止帯が作られるか否かで行う(Fig. 2)。

使用の為取出す際に真空は破れるが、馬鈴薯半合成培地と共に冷凍乾燥し外気と完全に遮断して湿気を防ぎながら冷蔵したものにあつては 1956 年 6 月 9 日の試料が 1957 年 11 月 23 日現在なお完全に活性を維持している。

3. 論 議

一般に蛋白は界面において変性する。このいわゆる界面変性 (surface denaturation) の機構は界面張

Fig. 2

Freeze-dried OP₁ phages mixed with semi-synthetic media and impregnated to filter paper are still active after 17 months of storage in a refrigerator.

Plaques are produced around the paper disks on the plating culture of *Xanthomonas oryzae*.

力による蛋白のペプチド結合の非可逆的膨潤或は結合様式の変化によるとされている。液体中のバクテリオファージの不活化も略同様の現象が想像されている。Adams¹⁾ は液気両相の界面においては気体の種類をとわず不活化が進行すること、従つて振盪その他による両相の界面の拡大はファージの不活化を促進することを報告し、更に生の異種蛋白の添加は界面に蛋白膜を作りこれがファージを界面変性から保護するものと説明している。

真空乾燥の場合は乾燥に伴いすべてのファージ粒子が気相と接すると考えるべきであろう。この時異種蛋白の存在は、液気両相の界面に数Åないし数十Åの蛋白単分子膜を作り、これが結局はファージ粒子を掩いファージと気相との直接の接触を阻止し、ファージを界面不活化から保護するものと考えられる。この観点に立てば、アラビヤゴムはそれに含まれる蛋白によりまたゼラチン、カゼインなどの加水分解物は単分子膜を当然作り得ると考えられる蛋白の不完全分解物即ち種々のペプチドの混在にそれらの保護効果の根源を求めべきであろう。然しながら馬鈴薯半合成培地、蛋白水解物などと共に冷凍真空乾燥或は常温真空乾燥したファージが乾燥直後から長期間力価に変化が見られないのに対し、CaVfCh 培地或は蒸溜水と共に乾燥させたファージは乾燥後も冷蔵期間中に次第にその

活性が失われてゆく事実、また殆んど完全にアミノ酸に分解されたゼラチン及びカゼインの加水分解物が生の蛋白よりも保護効果の著しく大きいことなどから乾燥の際の不活化の保護機構は単に蛋白分子膜のみに帰し難いのではないかと考えられる。これは Luria³⁾ らの全く異つた方法、即ちX線によるファージの不活化に対して異種蛋白即ちゼラチン、アルブミンなどがよく保護する事実の証明、而も糖類などはその効果を示さないという報告、また著者⁴⁾ の培地の種類によるファージの耐熱性の変化などの証明からも首肯し得る。

著者は、或種のアミノ酸も可逆的によくファージ蛋白に結合し、乾燥に際してファージ活性基の保護の役割をなすものと考え、ゼラチン構成アミノ酸について実験した。ゼラチン (10⁻¹ g/ml) の割合に混合されたその構成アミノ酸は 10⁻³ g/ml のゼラチン加水分解物の保護効果約 50 % に比して劣るが、約 20 % の保護効果を示し、更に個々のゼラチン構成アミノ酸の内では Histidine, Aspartic acid 及び Glutamic acid の保護効果が大きく、貯蔵中もその効果が安定である。Glycine, Alanine 及び Proline も一時的に保護作用を示すが、減圧低温保存していても、その効果が長く続かず、40日後には既に大部分の保護作用を喪失する。これらの現象が如何なる機構により示されるのかはファージの活性基に関連した多くの面白い問題を提起するものと思われるが、現在の処明らかでない。

4. 要 約

稲白葉枯病菌ファージ (OP₁ ファージ) は蒸溜水と共に乾燥させるならば、冷凍真空乾燥、常温真空乾燥及び常温常圧乾燥などの何れの乾燥方法を選ぶともその直後に殆んど活性を失い、以後貯蔵期間中にも次第に不活化する。然るにゼラチン、アルブミンなどの蛋白を 10⁻³ g/ml ~ 10⁻¹ g/ml 程度含んだ液と共に乾燥させる場合は冷凍真空乾燥により約 60 %, 真空乾燥により約 20 % のファージ活性を維持し、また 10⁻¹ g/ml 程度の濃厚なゼラチン或はカゼインなどの加水分解物と混じて冷凍乾燥させた場合はファージの活性はよく維持され 70 % 以上に及び、真空乾燥の場合も約 50 % 生存する。馬鈴薯半合成培地と混じて乾燥させた場合は冷凍真空乾燥、常温真空乾燥の何れによるも約 50 % 生存する。またゼラチン加水分解物中の個々の構成アミノ酸では 2 % 液において比較的によく保護するが、その効果の1時的なものは Glycine, Alanine 及び Proline であり、4日後においても尚保護効果を維持しているものは Histidine, Glutamic acid

及び Aspartic acid である。

OP₁ ファージの乾燥に際し蛋白, またはその分解産物の添加により不活化から保護される機構は, 蛋白及びペプチドによる単分子膜の形成と共に, これらのファージへの或種の結合によりその活性基を保護するものと考えられる。そして種々の糖類及び CaCl₂, NaCl などの無機塩類はこの作用を有しない。

ファージ類の保存には, 従つて蛋白を 10⁻²~10⁻³ g/ml 含む液或はそれらの加水分解物或はまた馬鈴薯半合成培地と共に冷凍真空乾燥させるのが最も便利で確実である。(1957 年 12 月 17 日受理)

引用文献

- 1) Adams, M. H. : Jour. Gen. Physiol., 31 : 417~431. (1948).
- 2) Bull, H. B. and H. Neurath: Jour. Biol. Chem., 118: 160~163. (1937).
- 3) Luria, S. E. and F. M. Exner: Proc. Nat. Acad. Sci., 27: 370~375. (1941).
- 4) 脇本哲: 九大農学芸雑誌, 14: 485~493, (1954).
- 5) 脇本哲: 九大農学芸雑誌, 15: 151~160, (1955).
- 6) 脇本哲・吉井甫: 九大農学芸雑誌, 15: 161~169. (1955).
- 7) 脇本哲: 白植病報, 22: (1957)

Summary

This investigation deals with protective effects of several materials against inactivation of *Xanthomonas oryzae* phage (OP₁ phage) during desiccation.

OP₁ phage particles are mostly inactivated during any one of the following procedures: freeze-drying, vacuum drying, or drying in an ordinary desiccator under normal room temperatures, when the phage particles are suspended in distilled water. If the phage particles are suspended in a solution of protein such as gelatin or albumin, at a concentration of 10⁻³ gram per ml or more, about 70 per cent of the phage activity is protected in the case of freeze-drying, and 20 per cent in the case of vacuum drying.

Concentrated (10 per cent) solution of gelatin hydrolysate protects the phage activity almost completely against inactivation, in the case of freeze drying; 50 per cent or more, in the case of vacuum drying. When the phage particles are dried together with semi-synthetic media containing potato extract, peptone, sugar and certain inorganic salts, about half of the activity is protected in the case of freeze drying; about 35 to 40 per cent in the case of vacuum drying.

If the phage suspensions, are dried under ordinary atmospheric pressure and temperature, the phage activities decrease rapidly, even when protective materials are added (Table 1).

Ten per cent solution of mixed amino acids is equivalent to gelatin hydrolysate, protects

ca. 20 per cent of the phage activity, in the case of vacuum drying (Table 8).

Among amino acids which constitute gelatin hydrolysate, glycine, alanine and proline (two per cent solution in each case) show a certain protective effect against inactivation of the phage, in the case of vacuum drying (Table 9).

Histidine, glutamic acid and aspartic acid (at the same concentration), protects 10 per cent, 6 per cent and 3 per cent, respectively, at pH 7.2.

These protective effects are retained for more than 4 days (Table 9).

Mode of action of these proteins, protein hydrolysates and amino acids in protecting the OP₁ phage against inactivation during drying procedures seems likely to be the protection of the phage particles, not only by forming protein- or peptide- monomolecular membrane, but also by somehow combining with active portions of the particles.

Neither carbohydrates such as soluble starch, sucrose, glucose, nor inorganic salts such as CaCl₂ and NaCl show protective effects.

For the preservation of the phages, the most favourable method is the freeze drying of the phages with 0.001 to 0.1 per cent solutions of protein, protein hydrolysate, or with semi-synthetic media. Phage preparations with constant high titres are thus available, whenever required.

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)