- (1) L. R. WETTER *Can. J. Botany*, 30, 685 (1952).
 (2) 松島 農化, 29, 87 (1955).
 (3) E. V. PECHMANN: *Biochem. Z.*, 321, 549 (1951).
 (4) 赤堀, 萩原等: 酵素化学シンポジウム, 8, 49 (1953).
 (5) T. ASTRUP and N. ALKJAERSIG: *Nature*, 169, 314 (1952).
 (6) 天野, 磯島, 藤尾 *Med. Jour. of Osaka Univ.*, 4, 255 (1953).
 (7) 吉田: 農化, 28, 66 (1954).
 (8) 蔭山: 醸工, 33, 53 (1955).
 (9) 三浦 農化大会講演 (1955).
 (10) 井口, 山本 農化, 29 387 (1955).

Summary

The influence of various inorganic actions and anions upon activity of *Aspergillus*-proteinase (Takadiastase) were investigated. Of the twenty cations tested, some ions of heavy metals, especially silver and mercuric ions, were found effective to cause inactivation of the enzyme. But the addition of other metals which have been known to affect the activity of peptidases, such as cobalt, manganese, and magnesium ions, did not increase the activity of this preparation. Of the twenty anions, ferrocyan and iodic acid ions seemed to be somewhat inhibitive toward this enzyme. It was found that the enzyme inactivated by the heavy metallic ions is reactivated by either hydrogen sulfide or thiosulphate. Despite of the enzyme characteristics suffering reversible inactivation heavy metals, it is difficult to assume whether the sulfhydryl groups are essential to the activity of this fungal proteinase, since specific reagents for the sulfhydryl groups, such as ferricyanide, iodoacetate, and *p*-chloromercuribenzoate had no significant influence on enzyme activity.

醱酵微生物のファージ現象に関する研究 (第1報)

各種乳酸菌ファージの分離

金子 太 吉 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 30 年 6 月 29 日 受 理

Bacteriophage Phenomena in Fermentative Microorganisms.

Part 1. Isolation of Phages Affecting Various Lactic Acid Bacteria.

By Takichi KANEKO (Inst. of Applied Microbiol., Univ. of Tokyo)

バクテリオファージに関する研究は過去 10 余年間に急速な進歩を遂げ、人体病原菌でそのファージの存在さえも知られていないようなものは、むしろ例外的である⁽¹⁾。

これに反し工業微生物のファージに関する研究は遙かに少く、ファージの存否も明らかでないものが多いが、ストレプトマイシン生産菌⁽²⁾、アセトンプタノール生産菌⁽³⁾のファージは本邦でも報告されているし、2,3-ブチレンジアミドコリン菌のファージも知られてはいる。併しながら世界的に最も広く研究されているのは乳酸菌 *Streptococcus lactis* 及び *S. cremoris* のファージであつて、各種チーズ製造の際の一問題として注目されている⁽⁴⁾。その他の乳酸菌ファージとしては、スイス・チーズのスターターより *S. thermophilus* のファージを見出したこと⁽⁵⁾、ピクルの製造に関与する *Lactobacillus plantarum* がファージの害をうけるらしいこと⁽⁶⁾、*Leuconostoc mesenteroides* の typing にファージを利用した例⁽⁷⁾などが報告されている。

乳酸菌は、乳製品は勿論、清酒の如き本邦独特の醸造物をはじめ、工業上極めて重要な菌であるにも拘らずそのファージに関する研究は本邦では全くみられず、又上にあげたもの以外の菌については、ファージの存否さえわかっていない。著者はなるべく性質を異にする乳酸菌について、そのファージの検出を試み、*S. lactis* のファージが本邦にも広く分布していること、*S. faecalis*, *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus brevis*, *L. mesenteroides* のファージも存在し、そのあるものは清酒の醪、醤油醪、乳製品工場内等から検出し得ること等を知つた。ここにその大要を報告する。

実 験

実験は概ね 3 期に分けて行つたが、その方法は本質的には同じである。

1) 使用菌株

第一期 *Streptococcus lactis* 4 株; *S. cremoris* 4 株; *S. faecalis*, *Lactobacillus arabinosus*, *L. delbrückii* 各 1 株及び *Leuconostoc mesenteroides* 2 株.

第二期 新に清酒の醗より分離した球菌及び桿菌, 計 16 株.

第三期: 第二期に用いたものの中, 桿菌 3 株, 球菌 4 株; *Leuconostoc mesenteroides* 3 株; *L. arabinosus*, *L. sake* 各 1 株; *L. delbrückii* 及び *Bacillus coagulans* 各 3 株.

2) 培 地

第一期及び第三期に用いた培地は Table 1 に示す. 第二期には麵汁を用いた. pH はいずれも 6.8~7.0, 寒天を用いるときは 1% とした.

Table 1. Composition of the Medium Used.

Expt. Series	I	III
Yeast extract	prepared from 50 g pressed yeast	3.5 g
Tomato juice	prepared from 100 g fresh tomato	—
Whey	prepared from 180 cc milk	—
"Polypeptone"	10 g	10 g
Glucose	—	10 g
Tap water	up to 1,000 cc	up to 1,000 cc

One drop of 10% solution of CaCl_2 was added to 5 cc of above medium immediately before use.

3) ファージ分離用試料

第一期: 乳製品 11, その他牛乳関係 9, 漬物類 10, 糞 25, 計 55 点.

第二期 生醗及び山梨醗 27, 速醗醗 14, 計 41 点.

第三期: 味噌 9, 麵類 5,

果物 7, 穀類 (主として麦芽) 20, 計 71 点.

但し, 第二期以外の場合には, 必ずしも凡ての試料と凡ての菌株との組合せは行わなかつた. 例えば乳製品中に *L. delbrückii* のファージが存在することは期待出来ないからである.

4) 検 出 法

試料中に少数しか存在しないファージをも検出出来るようにするため, 先ず増強を行つてから溶菌試験をした. 即ち, 試料を適量の培地に溶解又は懸濁し, その約 5cc 宛を試験管に分注, これに菌液 (それぞれ試験菌の適温で 1 夜培養したものを, 普通 2~3 株合併して) 1~3 滴接種して 1 夜培養する. 中和後清澄して Chamberland 型 L3 濾過器で濾過し, その濾液について溶菌作用の有無をみた. それには, 各試験菌 1~数滴 (菌株毎に一定量とする) を植えた約 7 cc の培地に, 供試濾液 0.1~0.5 cc を加えて, それぞれの菌の適温で培養しつつ, 濁度の変化を継時的にしらべる方法をとつた. 濁度は光電比色計を用い, 最初の 10 時間に少くとも 4 回, 約 20 時間後に 1 回測定した. 又この間 pH 値を成るべく 6.0 以上に保つように, 適時無菌的に 0.5 N NaOH を添加した.

この方法によつてファージによると認められる溶菌現象 (ある程度正常な増殖が起つてから溶ける現象) は起らなくとも, 疑問の余地のある場合にはそのまま植え継ぎ又は再実験した. 又第三期の実験に於いては, 溶菌試験を終つた培養を再び濾過し, その濾液について plaque 形成 (後述) の有無をしらべた. これらの方法の併用によつてはじめてファージの存在を見出し得た例も稀ではない.

5) 確 認

かくして見出された溶菌現象がバクテリオファージによるものであるか否かを知るため, 次の二つの試験を行つた.

i) Transmissibility: 溶菌作用を現した濾液を少くとも 3 回植えついで, なおその作用が消失しないことを確認した.

ii) plaque の形成 POTTER ら⁽⁸⁾ の方法に準じ, 下層を 1% 寒天培地 25 cc, 上層を菌液 0.1~0.5 cc, 供試液又はその稀釈液 0.5 cc, CaCl_2 (10%) 水溶液 0.5 cc, 1% 寒天培地 1.5 cc とし, 16 時間後に観察した. 溶菌作用を示した濾液は凡てこの方法で plaque を形成し得ることを知つた. 但し plaque 形成の条件は複雑で必ずしも安定した結果を得ていない. 二, 三の plaque の写真を Fig. 1 に示す.

6) 各ファージの分離源等について

以上の方法で分離確認出来たファージは, plaque の大きさ等と共に Table 2 に一括表示した. 以下各論的に若干の説明を加えることにする.

ファージの作用を受ける *S. lactis* の 3 株のうち 712, W-2 の 2 株は米国で, K-1 は本邦で, いずれもチーズのスターターから分離された菌株である. これらに作用するファージ LP-1 と LP-2 とは同一のわさび漬 (市

Fig. 1. Some Examples of Plaques Formed by Isolated Phages.
A) LP-7 on *S. faecalis* R, B) LP-10 on *L. arabinosus* 17-5,
C) LP-17 on *L. mesenteroides* S-8.

Table 2. List of Isolated Strains of Bacteriophage.

Host Strain	Phage	Plaque Size	Origin
<i>S. lactis</i> 712	LP-1	medium	"Wasabi-zuke" (a sort of salted wasabi)
" W-2	LP-5	medium	"Nara-zuke" (a sort of salted cucumber)
" K-1	LP-2	medium	"Wasabi-zuke"
" "	LP-6	small	"Nara-zuke"
" "	LP-7	large	spoiled milk from a dairy factory
" "	LP-8	small	soil in a dairy factory
" "	LP-9	large	fresh cheese
<i>S. faecalis</i> R	LP-4	medium	dung of hens (<i>Gallus gallus domesticus</i>)
"	LP-11	medium	"
"	LP-13	small	"
"	LP-14	large	dung of deers (<i>Cervus nippon nippon</i>)
"	LP-15	medium	dung of Canadian porcupines (<i>Erethizon dorsatum</i>)
"	LP-16	medium	dung of antelopes (<i>Capricornis crispus</i>)
<i>L. arabinosus</i> 17-5	LP-10	medium	feed for domestic ducks (<i>Anas platyrhynchos</i> var. <i>domestica</i>)
"	LP-12	medium	dung of domestic ducks
S-5 and S-8 (<i>L. mesenteroides</i>)	LP-17	large	"Kimoto" (natural starter for "Sake")
S-6 (<i>L. brevis</i>)	LP-18	medium	vegetable waste in kitchen
	LP-19	small	mash of "Shōyu"

販品) からとれたが、この2株は宿主域 (host range) を異にする。LP-5 と LP-6 も全く同様である。このように同一の試料から2株のファージが得られたのは、もともと2種 (species) のファージが存在したためか、或いは試料中には不純な系統のファージとして存在したものが、実験に用いた菌株によつて純化されたためか、いずれかの理由によるのであろう。

LP-7 は某乳製品工場内に放置されていた二等乳 (既に酸敗していた)、LP-8 は同じ工場敷地内の原乳積卸場の近くの土壌、LP-9 は別のチーズ製造所の生チーズ (このチーズは *S. lactis* K-1 の分離源とは別のスターターを用いて製造されたものである) から分離された。

S. faecalis R は bioassay 用の菌としてよく知られた菌株であるが、これを攻撃する6株のファージ中、LP-4、LP-11、LP-13 は地域を異にする3鶏舎から、他の3株は上野動物園の糞から得られた。

L. arabinosus 17-5 も bioassay 用の菌で、これに作用する2株のファージは同一舎内のアヒルの糞と飼料

から得たものであるから、恐らく同一株であろう。

S-5, S-6, S-8 は清酒の醗から新に分離した菌株である。ファージ LP-17 は仕込後 17 日目の正常な生醗から分離された。このファージの宿主のうち S-8 は同じ生醗から、S-5 は別の酒造場の醗から得た。LP-19 を分離した醤油醗も正常に醗酵していたものである。

なお *L. delbrückii* 及び *L. mesenteroides* のファージを分離する目的で、これらの菌を鶏に与えてその糞について実験してみたが、不成功に終わった。

7) S-5, S-6 及び S-8 の菌学的性質

醗から分離した細菌のうち、ファージの作用を受けることが明らかになったのは、これらの 3 株だけであつた。その菌学的性質は Table 3 に一括した通りであつて、S-5 及び S-8 は *Leuconostoc mesenteroides*, S-6 は *Lactobacillus brevis* に属する。

Table 3. Properties of Strains S-5, S-6 and S-8.

	S-5	S-6	S-8
Shape	cocci, single or in pairs	rods, single or in pairs	cocci, single or in pairs
Size (μ)	0.7 to 0.9	0.8×2.0 to 3.0	0.7 to 0.9
Gram stain	+	+	+
Spore formation	—	—	—
Relation to O ₂	microaerophilic	"	"
Optimum temperature	25 to 30°	"	"
Catalase	—	—	—
Nitrite from nitrate	—	—	—
Gelatin liquefaction	—	—	—
Acid in Litmus milk	+	—	+
Coagulation of milk	—	—	—
Production of gas	+	+	+
Lactic acid from glucose (%)	43	49	45
Lactic acid produced	l	dl	l
Acid from	Lactose	±	±
	Sucrose	+	+
	Arabinose	+	+
	Raffinose	+	+
	Xylose	±	±
	Mannitol	—	—

8) 分離ファージの宿主域 (host range)

分離したファージは、LP-17 が 2 菌株に作用するだけで、その他はすべて実験に用いた細菌の 1 株だけに特異的に作用する。次に、*S. lactis* K-1 及び *S. aecalis* R のファージが多数分離されたので、それらの異同を知る一方法として、個々のファージに対する抵抗株をとり、それらの resistance pattern をしらべた。その結果、Table 4 に示すように、前者のファージは少なくとも 3 種、後者のそれは

少なくとも 5 種のタイプに分けられることを知つた。なお抵抗株の分離は、secondary growth を示した菌を継代後、平板培養して単独のコロニーを釣る方法によつた。

Table 4. Host Specificity of Some Phage Strains Attacking the Same Host.

Host Strain	Plaque Formation by					Host Strain	Plaque Formation by					
	LP-2	LP-6	LP-7	LP-8	LP-9		LP-4	LP-11	LP-13	LP-14	LP-15	LP-16
<i>S. lactis</i> K-1	+	+	+	+	+	<i>S. faecalis</i> R	+	+	+	+	+	+
" /2	—	—	+	+	+	" /4	—	+	—	+	—	—
" /6	—	—	+	+	+	" /11	+	—	—	—	—	—
" /7	—	—	—	—	—	" /13	+	+	—	—	—	—
" /8	—	—	+	—	—	" /14	—	+	+	—	+	—
" /9	—	—	+	—	—	" /15	+	—	—	+	—	—
						" /16	+	+	—	+	—	—

Host strain designated as *S. lactis* K-1/2, for instance, is a mutant of *S. lactis* K-1 which is resistant to phage LP-2. Symbols + and — mean that plaques can and cannot be observed in the combinations concerned.

考

察

以上の実験で、乳酸菌は桿菌だと球菌だとを問わず、又ホモの醗酵をするものもヘテロの醗酵をするものも、バクテリオファージの攻撃を受ける可能性があることが明らかにされた。著者の分離し得たファージ株は株数に於ても、また種類に於いても、限られたものであるが、自然界には遙かに多種類のファージが存在するものと考えられる。このことは、実験に使用した菌株が限られていること、ファージが高度の特異性を持つこと、著者の方法では典型的な lytic phage しか検出出来ないが、実際にはそうでないファージもあり得ること等から容易に想像出来る。現に WHITEHEAD はその綜説⁽⁴⁾に於いて、乳酸菌のファージを最も確実に見出す方法はその菌をチーズの製造に用いることであると述べて、実験室的にファージを探すことの困難を強調している。

S. lactis のファージが多数、しかも乳製品工場内等から分離されたことは、勿論諸外国の報告からも当然予

想されたことではあるが、工業的な立場から一つの問題と思われる。デキストラン製造工場に於けるファージによる汚染はまだその例を聞かないが、*L. mesenteroides* のファージが存在することだけは疑問の余地がない。

しかしながら、ファージの存在は、必ずしもそれによる実質的な損害を意味するものではない。特に腸内、清酒の醗、醤油の醗、漬物類等の如く、多数の菌株が共存し、且多かれ少かれ特殊な生育条件下におかれている場合に、バクテリオファージがどれほどの作用を発揮し得るかは、それぞれの場合についての充分な検討によつてはじめて明らかになることであろう。

乳酸菌の lysogenicity については、既に REITER⁽⁸⁾, GRAHAM⁽¹⁰⁾ 等の研究もあり、自然界でのファージの分布を論ずるには、決して無視出来ない問題である。著者もこの点を考慮して二、三の実験を行つたが、否定的な結果しか得られなかつた。

本研究は主として東大農化坂口謹一郎教授、有馬啓助教授の御指導で行つたが、ファージ一般については東大伝研長野泰一教授はじめ同研究室の諸兄から直接指導して頂き、又菌の分類等は東大応微研において北原覚雄教授の御指導を仰いだ。Iowa State College の F. E. NELSON 教授から典型的な乳酸菌ファージ株を分譲して頂いた他、農技研矢野信禰、東大農化（当時）篠田晃、玉川大学中山大樹諸氏をはじめ、多くの方の御世話になつた。ここに深く謝意を表する。

（なお本報の概要は昭和 28 年 3 月日本農芸化学会東京支部例会において講演した。）

(1) P. NICOLLE : <i>Biol. Med.</i> , 38, 233 (1949).	(6) L. W. FAVILLE : Dissertation ; <i>Michigan State College</i> (1948). <i>Biol Abst</i> による.
(2) 相磯 他 : <i>J. Antibiotics</i> , 3, Suppl. B, 22 (1950).	(7) A. LEIVA <i>et al.</i> : <i>J. Bact.</i> 54, 709 (1947).
(3) 木下他 : 農化, 26, 104 (1952).	(8) N. N. POTTER and F. E. NELSON : <i>J. Bact.</i> 64, 105 (1952).
(4) H. R. WHITEHEAD : <i>Bact. Revs.</i> , 17, 109 (1953).	(9) B. REITER : <i>Nature</i> , 164, 164 (1949).
(5) F. E. NELSON : <i>J. Dairy Sci.</i> , 35, 483 (1952).	(10) D. M. GRAHAM <i>et al.</i> : <i>J. Dairy Sci.</i> , 35, 813 (1952).

Summary

An attempt was made to search for bacteriophages affecting lactic acid bacteria of various groups. Eighteen strains of phage were isolated ; 7 were found to be active against *Streptococcus lactis*, 6 against *S. faecalis*, 2 against *Lactobacillus arabinosus*, 2 against *L. brevis* and 1 against *Leuconostoc mesenteroides*.

醗酵微生物のファージ現象に関する研究（第 2 報）

乳酸菌ファージの増殖に及ぼす温度の影響

金子太吉, 岩野貞雄, 北原覚雄（東京大学応用微生物研究所）

昭和 30 年 6 月 29 日 受理

Bacteriophage Phenomena in Fermentative Microorganisms. Part 2.

Effect of Temperature on a *Leuconostoc* Phage.

By Takichi KANEKO, Sadao IWANO, and Kakuo KITAHARA

(Inst. of Applied Microbiol., Univ. of Tokyo)

一般にバクテリオファージは、その宿主が最も盛んに繁殖しつつある時期に、最も旺盛な増殖力を示すのであって、宿主の増殖速度が低下したり、培地の pH 値が低下したりすると、ファージの増殖速度もまた著しく減弱するものとされている。著者の一人はさきに生醗より乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* のファージを分離した⁽¹⁾が、酒母中の乳酸菌は温度のかなり低い頃から増殖し、且酒母の温度が菌の適温に達するまでにその pH 値は相当低くなっている。従つて、酒母育成の条件下に於てファージの増殖がどの程度可能であるかを明らかにするためには、先ず温度及び pH の影響を検討すべきであろう。