がある。

終りにポーログラフに関して御教示を頂いた広島大学教授品川睦明博士及び油脂の取扱に関して御指導を頂いた当試験場長畑忠太博士に厚く感謝致します。

(本研究は 1955 年 1 月 日本化学会中国四国支部例会で講演した)

(1) A. VINET <i>Compt. Rend. soc. biol.</i> ,
139, 155 (1945).	No. 3, 296 (1953).
(2) F. GONZALLZ ; <i>Science</i> , 101, 494(1945).	(7) J. V. SCUDI and R. P. BUHS : <i>J. Biol. Chem.</i> , 144, 599 (1942).
(3) K. A. OSTER and M. J. GOLDEN ; <i>J. Am. Pharm. Assoc.</i> 37, 429 (1948).	(8) KOFLER <i>Helv.</i> , 28, 702 (1945).
(4) 富安行雄, 豊水正道, 野中 進, 塚本隆一
醸酵工雑, 29, 187 (1951).	(9) NOVELLI : <i>Science</i> , 94, 447 (1941).
(5) 田中薫樹, 川北兵蔵 : 醸酵工雑, 30, 211
(1952).	(10) PINDER and SINGER : <i>Analyst</i> , 65, 7
(1940).
(6) 増尾栄太郎, 岡林 直 : 塩野義研年報,	(11) E. B. HERSHBELG, J. K. WOLF and L. F.
FIESER <i>J. A. C. S.</i> , 62, 3516 (1940).

Summary

Vitamin K₃ can be determined polarographically in a buffered solution containing 0.1 N potassium chloride and 20 per cent of isopropanol. The polarogram (Fig. 1.) shows the well defined reduction wave at -0.25 volt vs. S.C.E. (at pH 7.0), under this condition the wave heights are proportional to the concentration of vitamin K₃ (Fig. 5.).

For the determination of vitamin K₃ in food products, the wave heights of polarograms of sample solutions prepared as follows are measured ; A : the ether extract from the food product is dissolved in 2 volume of isopropanol and then 3 volume of 1/3 N potassium chloride aqueous solution and 5 volume of MCILVAINE's buffer solution (pH 7.0) are added to this solution ; B : the same sample added with known concentration of standard vitamin K₃ is treated as above. Then the vitamin K₃ in the food product can be calculated with the following equation.

$$a = b \times \frac{\alpha}{\beta - \alpha}$$

a : vitamin K₃ in food product, b : added standard vitamin K₃,
 α : wave height of A solution, β : wave height of B solution.

If the polarogram shows irregular form as Fig. 4., the two sample solutions must be filtered with dry filter paper.

Cl. acetobutylicum の Bacteriophage に関する研究 (第 2 報)

該 Phage Activity の測定法に就て (其の 1) 稀釈検定法に就て

木下祝郎, 寺本賢一郎 (協和醸酵東京研究所)

昭和 30 年 2 月 22 日 受 理

Studies on Bacteriophages for *Cl. acetobutylicum*. Part 2. On the Method
of Assay of Phage Titer (1) On the Dilution Assay Method.

By Shukuo KINOSHITA, Ken'ichiro TERAMOTO (The Kyowa Fermentation
Industry Co. Ltd., Tokyo Research Laboratory)

緒 言

Phage activity (phage titer) を測定する方法は数種の一般法が知られているが、その最も簡易な方法は液体培養基中で host の lysis を観察する方法で KRUEGER は本法を *Staphylococcus* の phage に就き精細に検討し、phage particle の対数と溶菌時間との間にある条件下で直線の関係がある事を見出した。これは溶菌時間測定法^(1,2)と呼ばれる。

GRATIA⁽³⁾ は agar layer 上で phage が host を溶菌して生ずる plaque (溶菌斑) を計算して titer を定める所謂 Plaque count 法を提案した。

著者はアセトン・ブタノール菌の phage の activity の測定に対し液体法と agar layer 法につき若干の検

討を行つたので以下これらにつき報告する。

ブタノール菌の嫌気性は実験操作上著しい制約となり、従来の方法のそのままの適用は極めて困難であつた。

I. 稀釈検定法の検討

本法は phage sample の 10 倍稀釈系列を作り、その各の一定量を液体培地中で生育中の host に加え、その結果生ずる phage 現象 (lysis, 醗酵停止等) を示標として観察し、phage 現象を生じない最高の phage 稀釈倍数を以つて原 sample 中の phage titer とする方法である。勿論この値は比較的な値を与えるものに過ぎない。KRUEGER は lysis と時間との関係を検討し、測定精度を $\pm 5\%$ 内にある如き条件を定めたが、その場合でも titer が 10^4 以下の場合には適用出来ない事を述べている。

ブタノール菌の一種 *Cl. madisonii* の phage について SYLVESTER⁽⁴⁾らは糖蜜培地でガスの発生を示標として研究を進めたが、後に GOLD, WATTON⁽⁵⁾等はこの方法に不満を感じ KRUEGER の方法を適用した実験結果について報告した。

著者は先ず GOLD 等の方法即ち lysis を見る方法の適用の可否について検討したが、host 及び phage が異なる為か GOLD 等の用いた透明合成培地中で lysis を生ぜしめる事が出来なかつた。そこで用いる medium の選択が必要となつた。

(a) **Medium の選択** 具備すべき medium の性質は次の如き点とした。

(イ) 出来るだけ少量の inoculum size でも以後の host の生育 lag が著しく長くない事 (接種量は 0.1ml ~ 0.5 ml で試験した)。

(ロ) 出来るだけ淡色透明で lysis の観察に便なる事。

試験菌として 3 株のブタノール菌を用い下記の如き成分を種々の濃度に組合せて予備実験を行つた。

C 源 : glucose 0.25~2.0% ; sucrose 1% ; molasses 1.0~5.0%

N 源 : peptone, tryptone, liver ext., beef ext., yeast ext., casein, casein hydrolysate 等をそれぞれ 0.1~1% 宛単独に用いた場合或いは 2 種を組合せた場合。

Salts : K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, Salts mixture A, Salts mixture B (ビタミンの bioassay 用培地に準ずる)。

Vitamin : Biotin, *p*-aminobenzoic acid.

還元剤 : Na-thioglycollate

実験の結果試験菌の 3 株 (KH 30, KN18, ZNH-5) に共通して (イ) (ロ) の条件を満足したものは、次の如き組成の tryptone-glucose-molasses medium (TGM 培地) であつたので、以下の実験は本培地を用いる事とした。

TGM 培地の組成 : Glucose 20 g, tryptone 10 g, molasses 10 g, K_2HPO_4 2 g, pH 6.8~7.0 (殺菌前)。水道水で 1 l とする。

(b) **Lysis の観察** : TGM 培地を用いる時は菌は速かに生育するので、著者の phage A (original phage A と呼ぶべき事がより正しい事が後に判つた) とその host KH 30 とで実験を行つた。

Phage の一定量と host とを混じ、37° に培養し (試験管内) 経時的に観察を行うと、host cell は phage infection に依り管底に沈澱し液は一見透明化する如く見えた。併しこの沈澱を振盪し比濁測定を行うと結果は区々であつて、phage の稀釈倍数に応じた lysis の時間的關係は認め難かつた。この原因は明らかでないが、主として使用した phage と host との系の性質に基づくものであらうと推察された。

(c) **ガス発生を観察** : 醗酵に依るガス発生の有無を観察する事は、菌の活力を判定する上で最も鋭敏且つ容易な方法であるので、phage の作用を見る為には好適である。併し或る assay tube のガス発生が完全に止るという現象はその tube 内のすべての host cell が phage infection を受けた場合と考えられ、かかる完全 infection を起す条件は複雑な原因に依り左右されると考えねばならない。

その原因の一つとして考えられるのは host の inoculum size であらう。即ち結果の判定を下す時間を一定にすれば、その時間内に host と phage の増殖がそれぞれ起り、phage は次々と host cell に infection をなし、終いにはすべての host cell が infection を完結する事になる筈であるから、initial の host cell 数は当然問題となる。且つ周知の如く嫌気性菌では inoculum の量が medium の嫌気度等にも関係し、host の lag

の長短となつて現われて来るので, titer の判定に至大の関係を有する。

Table 1 に inoculum size 及び medium の還元剤として添加した Na-thioglycollate が titer に及ぼす影響について示す。

Table 1. Effect of Inoculum Size and Na-thioglycollate upon Phage Titer Readings

Methylene blue	Na-thioglycollate	Inoculum size ml	Control	Phage dilution						Titer
				10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
none	none	0.1	+ ㊦	- ○	- ○	± ○	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ⁴
		0.2	+ ㊦	- ○	- ○	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ³
		0.5	+ ㊦	- ○	- ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ³
		1.0	++ ㊦	- ㊦	- ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ³
	0.2%	0.1	+ ㊦	- ○	- ○	- ○	± ○	± ㊦	+ ㊦	10 ⁵
		0.2	+ ㊦	- ○	- ㊦	- ○	- ㊦	± ㊦	+ ㊦	10 ⁵
		0.5	++ ㊦	- ㊦	- ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ³
		1.0	++ ㊦	- ㊦	- ㊦	++ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	10 ²
0.0002%	none	0.1	+ ㊦	- ○	- ○	- ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+ ㊦	10 ⁴
		0.2	+ ㊦	- ○	- ○	- ㊦	+ ㊦	+ ㊦	+	10 ⁴
		0.5	++ ㊦	- ○	- ㊦	- ㊦	± ㊦	+ ㊦	++	10 ⁴
		1.0	++ ㊦	- ㊦	- ㊦	- ㊦	+ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	10 ⁴
	0.2%	0.1	+ ㊦	- ○	- ○	- ○	± ○	+ ㊦	+ ㊦	10 ⁵
		0.2	+ ㊦	- ○	- ○	- ○	± ㊦	+ ㊦	+	10 ⁵
		0.5	++ ㊦	- ㊦	- ㊦	+ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	++	10 ³
		1.0	++ ㊦	- ㊦	+ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	++ ㊦	10 ²

Note ; +, - etc.....gas evolution

○, ㊦, ㊦ etc.....turbidity (○ clear, ㊦ a little turbid etc)

Strain ; KH30 Phage ; Original phage A

結果の判定は培養 24 時間後に行つた。予想されるが如く, inoculum を多く用いれば phage titer は低く, 少く用いれば titer は高く出る傾向が見られた。Na-thioglycollate を 0.2% 添加し, inoculum が 0.1~0.2 ml と 1.0 ml の場合, phage titer の判定は 10⁵ → 10² の如く異つて来る。即ち medium を還元状態に保ちつつ少量の inoculum を使用する場合は, phage の検出は鋭敏であるといえる (Inoculum が 0.1 ml 以下となると phage の影響がなくとも菌の生育が不均一となり易かつた)。

メチレンブリーを assay medium に少量添加して置く時は酸酵の停止に依り青色を発し, ガスを僅かに発生中のものとの区別がつけ易い。又 Table 1 より見られる如く, 菌の lysis は inoculum 0.1 ml の場合は判然とするが, 0.5~1.0 ml となるとガス発生は停止しているものでも完全 lysis は生じないので, 判定に迷いが生ずるが, かかる場合メチレンブリーの発色は判定の目安として便利である。

亦 Na-thioglycollate の添加量は 0.1% に減じた方がメチレン・ブリーの発色を鋭敏ならしめ, 好結果である事を別の実験で知つた。

(d) **Dilution Assay の操作法** : 以上述べて来た諸点を考慮に入れて次の如く操作する事とした。

(イ) 培地 TGM 培地にメチレンブリー 0.0002%, Na-thioglycollate 0.1% 添加したものを使用する。

これを試験管に 9 ml 宛分注し殺菌保存し, 使用直前に煮沸急冷後使用する。

(ロ) Inoculum : Indicator strain の soil stock culture より TGM 培地で active culture を作り同培地に 1 回移植後約 15~18 時間目の菌液を 0.1 ml 種菌として用いる (12×10⁸ cell/ml)。

(ハ) Phage sample : Phage sample は殺菌した 1% molasses soln. で 10 倍稀釈系列を作る。この 1 ml を TGM 培地に植菌と同時に添加する。phage 液と, 菌液とがよく接触するように数回ピペットで吸入, 吸出を行う。

(ニ) 培養温度 : 37°

(ホ) 培養時間 (観察時間) : 20~24 時間。

(ヘ) 判定 : 肉眼観察に依り培養の透明化, ガス発生の有無, メチレンブリーの発色の程度等を検する。

考

察

著者は phage 濃度と溶菌時間との間に一定の関係を見出せれば便利と考えて, 液体培養基中で lysis の進行を測定しようとしたが, 予備実験に於て不成功であつた。この原因は明らかではないが, 用いた phage-host の系の性質に依るものと思考される。随つて最も初歩的なガス発生の観察を採用する事となつた。この方法と雖も

inoculum size や培地の性質に依り titer の読みは大きく変動するが、方法自体は操作容易である利点がある。但し結果の精度を高める為には同一稀釈に於て多数の試験管を用意しなければならぬので、煩雑さを加える事は免れない。

要 約

Cl. acetobutylicum の phage について、その activity を稀釈法で測定する場合の条件について若干の検討を行った。

Inoculum size や培地の還元性等は titer の読みに大きな変動を来す要因であつた。

感度の良いと思われた検定法につき説明した。

終りに臨み本研究に当り終始御懇篤な御指導を賜つた東大 坂口教授、朝井教授に深く謝意を表します。又本研究の実施並に発表を許可された協和醸酵社長加藤博士、前研究所長川崎博士に深謝致します

(1) KRUEGER, A.P. <i>J. Gen. Physiol.</i> , 13, 553 (1930).	(4) SYLVESTER, J.C. <i>Unpublished. Ph.D. Thesis. of Univ. of Wisconsin</i> (1943).
(2) KRUEGER, A.P. : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 13, 557 (1930).	(5) GOLD, W. and WATSON, D. W. : <i>J. Bact.</i> , 59, 17 (1950).
(3) GRATIA, A., <i>Ann. Inst. Pasteur</i> , 57,	

Summary

Several conditions for the practical method of assay for phage activity against *Cl. acetobutylicum*. KH 30 were investigated.

By the preliminary experiment, KRUEGER's method was found difficult to be applied for our phage-host system, so the classical limiting dilution method was adopted. The following medium composition was found favorable for the assay medium; tryptone 1%, glucose 2%, cane molasses. 1%, K_2HPO_4 0.2%, methylene blue 0.0002%, Na-thioglycollate 1%, pH 6.8~7.0.

0.1 ml. of the 15~18 hr.-incubated culture in the above medium was used as inoculum for each assay tube (total liquid vol. 10 ml). Inoculum size affected considerably upon phage titer readings.

Cl. acetobutylicum の Bacteriophage に関する研究 (第 2 報)

該 Phage の Activity の測定法に就て

(其の 2) Plaque Count 法の適用

木下祝郎, 寺本賢一郎 (協和醸酵東京研究所)

昭和 30 年 2 月 22 日 受理

Studies on Bacteriophages for *Cl. acetobutylicum*. Part 2. On the Method of Assay of Phage Titer (2) Assay by Plaque Count Method

By Shukuo KINOSHITA and Ken'ichiro TERAMOTO (The Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd., Tokyo Research Laboratory)

II. Plaque Count 法.

Phage の溶菌作用は agar plate 上で溶菌斑 (plaque) として現われる事は早くより認められ、GRATIA⁽¹⁾ (1936) はこれを計数する事に依り phage の力価を測定する Plaque count 法を提案した。この方法の妥当性は後に LURIA⁽²⁾ 等に依り電子顕微鏡に依る phage 粒子の実測値と plaque 数とがよく一致する事に依り証明せられた。ADAMS⁽³⁾ は Plaque count 法の一般的実施法について詳述している。

Plaque count の一般法は特定の host と phage との関係に於てはしばしば適当な改変を加えて使用する事が必要とされ、WATSON⁽⁴⁾ は乳酸菌の phage に於て Limiting dilution method と Plaque count 法を比較した時、後者の値が低く出る現象に遭遇し、又 NELSON⁽⁵⁾ は乳酸菌の或る種の phage に就て、WATSON の方法では plaque を形成し得ない phage の存在する事を指摘した。

WATSON は亦ブタノール菌の 1 種 *Cl. madisonii* の phage の定量を試み host の嫌気性の為 Plaque count