Pulp disc 法によるビタミン及びアミノ酸の微生物定量法 (第 2 報)*

数種の B 群ビタミンの定量について (その 2)

小嶋 尚夫, 松谷 豊 (東北大学農学部)

昭和 32 年 6 月 21 日 受理

緒 言

前報⁽²¹⁾において微生物定量法を簡易化する為に Pulp disc 法の適用を試みた結果、本法がこれらのビタミンの定量に適用し得ることを認めた。本報では前報で設定した方法によって種々の試料中の各々のビタミン量を定量し、その分析結果に検討を加えた。即ち、試料液系列の定量値、試料に既知量のビタミンを添加せる際の回収率、試験管を用いる比濁法で得られる定量値との比較を行った。又、本法の標準曲線及び定量値の再現性を調べ、本法における定量値の変動範囲を求め、併せて食塩等の共存物質の影響を検討した。その結果、満足すべき成績が得られたので報告する。

実 験 方 法

(1) 定量法： 各々のビタミンの定量は前報で設定した条件に基づいて行った。

(2) 試料： 定量に供した試料は次の 6 種類で夫々の調製法を次に示した。

(a) *Rhizopus* 属菌の培養濾液：供試菌株は土壌より分離した *Rh. sp.* で、窒素源をカザミノ酸で置き変えた Czapek の培地に 30°, 5 日間振盪培養を行った。

(b) *Rhizopus* 属菌の培養菌体消化液：(a) の条件で得られた培養菌体を洗滌後、乾燥した乾燥菌体 1 g に対しパパイン 100 mg, タカジアスターゼ 100 mg を加え、酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中でトルオールを重畳して、37°, 24 時間消化を行った。

(c) *Rhizopus* 属菌麹培養物の抽出物 (以下 *Rh. エキス* と呼ぶ)：上記の菌を澱粉粉粒、麩その他を原料として固体培養を行って得られた麹を熱水で抽出して濃縮し、エキス状にしたもの。

(d) 酵母エキス：市販 (和光純薬) の酵母エキス乾燥粉末。

(e) 肝臓エキス：三共製薬より恵与された肝臓エキス乾燥粉末。

(f) 脱脂糠の消化液：脱脂糠 1 g に対しパパイン 100 mg, タカジアスターゼ 100 mg を加え、酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中でトルオール重畳下で、37°, 24 時間消化を行った。

実験成績並びに考察

(1) 試料希釈系列と生育帯： 各試料について希釈液の系列を作り、夫々の試料濃度と生育帯の直径の長さ

第 1 図 試料濃度と生育帯直径との関係

A: *Rhizopus* 菌体, B: *Rhizopus* 培養液, C: *Rhizopus* エキス,
D: 酵母エキス, E: 肝臓エキス, F: 脱脂米糠

* Studies on the Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids by the Pulp Disc Method. Part II. On the Assay of Several B-Vitamins. (2)

By Hisao KOJIMA and Yutaka MATSUYA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tôhoku University)

第 1 表 Pulp disc 法の再現性 (ビタミン)

ビタミンの種類		定量値 (mm)		再現率
		I (γ/ml)	II (γ/ml)	II/I (%)
チアミン	A	26.0	27.3	105
	B	4.1	4.1	100
ピリドキシン	A	2.65	2.45	93
	B	3.50	3.55	99
ニコチン酸	A	37.5	36.8	98
	B	33.3	33.3	100
パントテン酸	A	5.05	5.15	102
	B	25.8	26.8	104
ビオチン	A	8.7	9.0	103
	B	49.7	50.0	101

A: 酵母エキス, B: *Rhizopus* エキス, I, II: 実験番号

との関係を求めると第 1 図のようになって、標準液系列で得られる生育帯の直径と濃度との直線と同じ関係を示し、この範囲では 'Drift' は認められない。供試した何れの試料も各々のビタミンについて同様な結果が得られた。即ち、この事は異った濃度で得られる分析値が互によく標準曲線にのることを示している。

(2) 再現性 上記の試料の中、酵母エキス, Rh. エキスについてそのビタミン量を再度定量した結果を第 1 表に示したが、各試料の定量値の変動は ±5% の範囲内にある (但し酵母エキスのピリドキシンのみは 7% の差を示した)。

(3) 回収率 各々の試料

に夫々の標準ビタミン液を既知量添加して、その回収率を測定した。その結果を一括して第 2 表に示したが、殆んど大部分が 90~110% の範囲にある事が認められた。

(4) 試験管法 (比濁法) の定

量値との比較 Pulp disc 法では寒天培地を用いるので試験管法と比較して、定量すべきビタミンの拡散という条件が加わるし、定量菌株の培養条件も異なるので、両者を比較するために比濁法と本法を同時に行って、夫々の定量値を求めた。各々のビタミンについて得られた成績は一括して第 3 表に示したが、比濁法に比較してみると各々のビタミンや試料によって変動があったが、その差は最高 ±20% 以内にある。

(5) 定量値の変動範囲

各々のビタミンについて、標準液濃度 3 段階をとり、各々の濃度において 12~23 枚の Pulp disc を浸漬して同一操作で生育帯を生ぜしめ、その測定値の変動の範囲を求めて見た。即ち各

第 2 表 Pulp disc 法の回収率 (ビタミン)

ビタミンの種類	試料	Rhizopus 菌体	Rhizopus 培養液	Rhizopus エキス	酵 母 エキス	肝 臓 エキス	脱脂 糖
		γ/ml	γ/ml	γ/ml	γ/ml	γ/ml	γ/ml
チアミン	試料中の量	0.87	0.90	3.8	27	0.70	3.2
	添加量	0.14	0.08	0.4	8	0.40	0.8
	合計量	1.01	0.98	4.2	35	1.10	4.0
	見出せる量	1.00	1.10	4.7	35	1.10	4.0
	回収率 %	99	112	112	100	100	100
ピリドキシン	試料中の量	0.38	0.60	2.30	2.8	0.10	0.85
	添加量	0.10	0.30	0.60	2.0	0.10	0.14
	合計量	0.48	0.90	2.90	4.8	0.20	0.99
	見出せる量	0.50	0.90	2.95	4.8	0.18	1.00
	回収率 %	104	100	102	100	90	101
ニコチン酸	試料中の量	5.5	3.5	20.0	3.6	20	4.0
	添加量	0.6	0.4	1.5	1.0	3	0.5
	合計量	6.1	3.9	21.5	4.6	23	4.5
	見出せる量	6.7	4.3	21.0	4.7	22	4.4
	回収率 %	110	110	102	102	96	98
パント テン酸	試料中の量	1.75	2.3	18.8	4.8	3.00	3.8
	添加量	0.25	0.5	2.5	1.0	0.75	0.5
	合計量	2.00	2.8	21.3	5.8	3.75	4.3
	見出せる量	1.98	2.9	21.5	6.0	3.80	4.5
	回収率 %	99	104	101	103	101	105
ビオ チン	試料中の量	10.0	19	20.5	8.0	14.0	5.8
	添加量	2.5	5	5.0	2.5	2.5	1.2
	合計量	12.5	24	25.5	10.5	16.5	7.0
	見出せる量	12.0	26	26.0	10.0	16.0	6.8
	回収率 %	96	108	102	95	97	97

第 3 表 Tube 法 (比濁法) との定量値の比較

試料 (per ml)		<i>Rhizopus</i> 菌 体	4 倍濃縮 <i>Rhizopus</i> 培養液	25% <i>Rhizopus</i> エキス	20% 酵 母 エキス	10% 肝 臓 エキス	20% 脱脂糖
ビタミンの 種類及び定量法		(γ)	(γ)	(γ)	(γ)	(γ)	(γ)
チアミン	Pulp disc 法	1.74	1.5	4.6	60	1.35	7.0
	Tube 法	1.80	1.5	4.0	55	1.20	6.6
ピリドキシン	Pulp disc 法	0.76	1.20	3.3	5.4	0.20	1.7
	Tube 法	0.80	1.08	3.6	5.4	0.25	1.7
ニコチン酸	Pulp disc 法	10.0	10.8	36	72.0	40	7.0
	Tube 法	10.35	10.7	33	73.3	51	6.5
パントテン酸	Pulp disc 法	2.50	5.0	27.5	10.0	6.0	8.6
	Tube 法	2.15	4.8	24.5	10.25	6.0	9.6
ビオチン	Pulp disc 法	0.020	0.048	0.046	0.016	0.024	0.012
	Tube 法	0.022	0.050	0.053	0.019	0.021	0.015

々のビタミンの同一濃度の標準液に浸漬した Pulp disc により生じた生育帯直径の測定値の平均及び不偏分散推定量を算出し、その値から定量値に相当する信頼限界を得て定量値の変動範囲とした⁽²²⁾。その結果は第 4 表のように変動範囲は ±6% 以内にあることが認められ、比濁法による定量の精度に劣らないことを認めた。但しパントテン酸では 10% 内外の変動範囲を示したが、他に更に繰返し行った所 7% 以内に入るの、習熟して注意深く行えば変動範囲は少くなる。

第4表 定量値の変動範囲

ビタミンの種類	ビタミン量 (per ml)	例数	標準 誤差	不偏分散 推定量	信 頼 限 界		変動 範囲
					直径測定値 (mm)	ビタミン量	
チ ア ミ ン	5 γ	13	1.209	1.5844	42.71 $\pm$ 0.25	5 γ $\pm$ 250my	$\pm$ 5%
	500my	12	1.081	1.2752	32.63 $\pm$ 0.23	500my $\pm$ 25my	$\pm$ 5%
	50my	13	1.154	1.4437	22.65 $\pm$ 0.23	50my $\pm$ 2.5my	$\pm$ 5%
ピリドキシン	5 γ	22	1.550	2.5190	41.70 $\pm$ 0.22	5 γ $\pm$ 250my	$\pm$ 5%
	500my	22	1.348	1.9039	31.81 $\pm$ 0.20	500my $\pm$ 25my	$\pm$ 5%
	50my	22	1.013	1.0763	22.49 $\pm$ 0.14	50my $\pm$ 2my	$\pm$ 4%
ビ オ チ ン	1 γ	20	1.097	1.2684	37.70 $\pm$ 0.17	1 γ $\pm$ 50my	$\pm$ 5%
	100my	20	0.857	0.8253	28.82 $\pm$ 0.14	100my $\pm$ 5my	$\pm$ 5%
	10my	20	0.823	0.7126	20.69 $\pm$ 0.13	10my $\pm$ 0.5my	$\pm$ 5%
パントテン酸	50 γ	14	2.290	5.6500	44.25 $\pm$ 0.43	50 γ $\pm$ 5 γ	$\pm$ 10%
	5 γ	14	1.635	2.8797	33.72 $\pm$ 0.31	5 γ $\pm$ 400my	$\pm$ 8%
	500my	14	1.922	3.9787	23.26 $\pm$ 0.36	500my $\pm$ 45my	$\pm$ 9%
ニコチン酸	50 γ	23	1.194	1.4841	36.52 $\pm$ 0.17	50 γ $\pm$ 3 γ	$\pm$ 6%
	5 γ	23	1.015	1.0766	28.13 $\pm$ 0.14	5 γ $\pm$ 300my	$\pm$ 6%
	500my	23	1.022	1.0914	19.78 $\pm$ 0.14	500my $\pm$ 30my	$\pm$ 6%

第5表 共存物質による影響 (ビタミン)

		生 育 帯 直 径 (mm)							
食塩濃度*(%)		20	10	5	3	2	1	0.5	0
ビ タ ミ ン 類	チ ア ミ ン	32.2	32.3	32.2	32.4	32.2	32.2	32.2	32.3
	(1 γ /ml)	32.3	32.2	32.2	32.3	32.3			
	ピリドキシン	35.1	35.0	35.1	35.1	35.1	35.1	35.0	35.1
	(1 γ /ml)	34.8	35.1	35.4	35.1	35.0			
	ニコチン酸	31.2	31.1	31.2	30.8	31.1	31.5	31.5	31.5
	(1 γ /ml)	30.8	30.5	30.7	30.9	31.0			
リボフラビン濃度*		生 育 帯 直 径 (mm)							
(γ /ml)		10	5	1	0.5	0.3	0.1	0	
ビ タ ミ ン 類	チ ア ミ ン	32.2	32.2	31.8	32.6	33.0	32.2	32.3	
	(1 γ /ml)	32.2	32.2	32.2	32.2				
	ピリドキシン	35.2	35.2	35.1	35.3	34.8	35.4	35.2	
	(1 γ /ml)	35.2	35.0	35.2	35.1				

* 何れも添加後の最終濃度を示した。

の影響もないから、醤油、味噌中のビタミン測定には試験管法よりも勝れているといえる。又、定量に用いたチアミン要求酵母は当初、リボフラビンによって生育阻害をうけたのでこの点を本法で検討した。同時に供試した酵母菌株についても検討したが、いずれも生育阻害は認められなかった。しかし、定量の条件によっては生育帯に影響を認めた事もあるのでチアミン要求酵母については更にこの点の考慮を要する。その他の物質の共存による影響については検討を行わなかったが、Pulp disc 法では寒天培地を使用するので、定量物質の拡散に影響する物質が共存した場合には、その影響をうけると考えられる。従ってこの様な場合には、共存物質の影響を除くような対策を講じなければならない。又、Foster 等⁽¹⁾は拡散の難易の差を利用して B₁₂ とチミジンの分別定量をカップ法で行った事がある。定量菌株に対して類似活性を持つ代替物質が拡散性に相異がある場合には両者の分別を行う事も考えられるし、拡散性の異なる阻害物質が共存する様な場合にもその影響を除きうる事も考えられる。

以下、第1報を含めて考察、総括、文献を記載する。

考 察

著者等の試みた Pulp disc 法と従来行われている試験管を用いる比濁法又は酸度滴定法と比較考察し、併せて本法を実施するに当たって特に考慮すべき点について触れる。本法を試験管法と比較して見ると(前報第1図参照)

- (1) 定量操作が簡単で多数の試料の処理が容易である。特定の測定装置等を必要とせず、Potable な特長がある。
- (2) 定量範囲が著しく広い。
- (3) 最小有効濃度が高く感度の点では劣っている。
- (4) 定量培地は寒天を添加して滅菌した儘保存できるので、長時間の保存が可能で定量操作も培地調整とそ

(6) 共存物質に

よる影響 試料の定量において、共存する事が予想される食塩及び硫酸ソーダによる影響を検討するために、各々のビタミンの標準液系列に添加した場合の影響を検討したが、各々 20% 以下の濃度では殆んど測定値に影響が認められなかった(第6表)。従って

食塩も硫酸ソーダも各々のビタミンの拡散並びに定量菌株の生育に影響を及ぼさない。その機構は不明であるが試験管中でみられる定量菌の生育阻害が何らかの形で減退されるか、或いは食塩等がビタミンとは別個に拡散して塩濃度が分散して影響しないのかもしれない。要するにこれらの共存物質が高濃度(例えば食塩 20%)に共存しても本法が適用できるし、着色上

れ以後の操作を別個に行い得る。

(5) 培養時間が 15 時間以内であるので他の方法より短時間で定量可能である。

(6) Pulp disc を用いるので操作が更に簡易で他のカップ法等に比し、殆ど汚染される事はない。

(7) 試料は少量で行えるし、その儘直接測定出来るので殺菌による影響や試料が着色していてもその影響をうけない。又、揮発性溶剤中の試料は溶剤を放逐する事によりその儘直接定量する事ができる。

(8) この方法で得られる標準液における測定値の変動は少く誤差範囲は $\pm 6\%$ である。

等の特徴を承げる事ができる。従来行われて来た試験管を用いる比濁法又は酸度滴定法では実験操作が煩雑であるし培養時間が長い欠点がある。又、拡散法に比較すると低含量の感度で測定するので種々の条件に影響される事も考えられる。これらはいずれも定量の目的により寧ろ欠点となる場合もある。著者等の検討したこの方法では操作が著しく簡易化され、感度は落ちるが定量範囲が著しく広がる点で実際の試料の定量には有利な事が多い。又 Pulp disc を使用する点でカップ法等より操作が一層容易となり、殆ど雑菌の汚染するような事はないのでその目的によって、工場分析や Routine assay 等で定量の簡易性が望まれる場合には有利である。

本法を実施するに当って特に考慮すべき点を挙げると、実験結果の部で触れたように詳明な生育帯を安定した条件で測定する事である。この為に定量するビタミンの種類に適当な菌株を使用し、適当な接種菌濃度で定量する事が必要であり、適当な培養時間で測定する事が望まれる。又、試料の種類によっては拡散に影響をうけるような場合を考慮しなければならないが、著者等の供試した試料では比濁法と略一致した値が得られている。

総 括

ビオチン、ニコチン酸、パントテン酸の定量に *Lact. arabinosus*、チアミンの定量にチアミン要求酵母、ピリドキシンの定量に *Sacch. carlsbergensis* を夫々使用して Pulp disc 法の適用を試み、種々の条件を検討して定量条件を設定し、従来の試験管法に比して操作が簡易であって、しかも種々の有利な点を認めた。各々のビタミンについて検討の結果は次のように要約される。

(1) 定量範囲は試験管を用いる比濁法又は酸度滴定法に比し著しく広くなり、この範囲内では標準液濃度の対数と生育帯直径の関係は直線関係になる。しかし、最小有効濃度が高くなり、感度は劣る。

(2) 接種菌濃度が高い場合には生育帯直径は小となるが、生育帯周縁は鮮明になる。菌濃度の低い場合には生育帯直径は大となるが、周縁は不鮮明になる傾向がある。

(3) その他、培地の寒天濃度、寒天層の厚さ、培養時間等、二、三の基礎条件を検討し適当な条件を設定した。

(4) 数種の試料のビタミンの定量成績について試験管法と比較した。その結果、本法と試験管法で大きな差異が認められず、ビタミンの定量法として満足すべきものである。

以上の結果から Routine assay として適当であると考える。

終りに、本研究に当り、定量菌株の分与に種々御便宜を戴いた東北大学農学研究所の古坂教授、定量菌株の分与を戴いた東大坂口研究室、並びに試薬その他について御便宜を戴いた三共製薬研究室の宮沢 滋氏、食研の杉村敏一郎氏に感謝の意を表する。又本研究に対し、種々御援助を戴いた日本皮革株式会社社長、伊藤勇二氏、並びに日本皮革研究所の諸氏に深謝する。

尚、本報告は昭和 31 年 5 月、第 13 回日本農芸化学会東北支部小集会、並びに昭和 31 年 8 月、第 8 回日本農芸化学会東北支部大会に於いて講演した。

(1) J. C. Foster, J. A. Lally, H. B. Woodruff : <i>Science</i> , 110, 507 (1949).	(7) A. Jones, S. Morris : <i>ibid.</i> , 76, 588(1951).
(2) A. L. Bacharach : <i>Nature</i> , 160, 640(1947).	(8) S. Morris, A. Jones : <i>ibid.</i> , 78, 15(1953).
(3) A. L. Bacharach, W. F. J. Cuthbertson : <i>Analyst</i> , 73, 334 (1948).	(9) A. Jones, S. Morris : <i>ibid.</i> , 79, 586(1954).
(4) D. S. Genghof, C. W. H. Partridge, P. H. Carpenter : <i>Arch. Biochem.</i> , 17, 413(1948).	(10) W. F. J. Cuthbertson, H. F. Pegler, J. T. Lloyd : <i>ibid.</i> , 76, 133 (1951).
(5) A. Jones, S. Morris : <i>Analyst</i> , 74, 333 (1949).	(11) W. F. J. Cuthbertson, H. F. Pegler, C. Quadling, V. Herbert : <i>ibid.</i> , 76, 540 (1951).
(6) A. Jones, S. Morris : <i>ibid.</i> , 75, 613(1950).	(12) E. Harrison, K. A. Lees, F. Wood : <i>ibid.</i> , 76, 696 (1951).

- (13) F. E. Larkin, R. E. Stuckey : *ibid.*, 76, 151 (1951).
 (14) J. S. Simpson, D. F. Harris : *ibid.*, 82, 210 (1957).
 (15) 安藤忠彦, 池田庸之助 : 科研報告, 28, 380 (1952).
 (16) 辻 弘二, 弘田 一, 安藤康正 : ペニシリン, 1, 585 (1948).
 (17) 佐藤正弘, 斎藤恭子等 : 本誌, 31, 675 (1957).
 (18) E. E. Snell, J. L. Wright : *J. Biol. Chem.*, 139, 675 (1941).
 (19) L. Atkin, W. L. Williams, A. S. Schultz, C. N. Frey : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 15, 141 (1943).
 (20) 佐藤正弘, 山田弥一, 植村定治郎 : 本誌, 30, 492 (1956).
 (21) 小嶋尙夫, 松谷 豊, 男沢照子, 今野 周, 植村定治郎 : 本誌, 32, 33 (1958).
 (22) 増山元三郎 : 少数例のまとめ方と実験計画のたて方 (1949).

プラーク形成異常現象に関する研究 (第1報)*

異常現象の発現と二, 三の知見

木下祝郎, 奥村拓二 (協和醸酵東京研究所)

昭和 32 年 6 月 21 日 受理

緒 言

著者らはファージ lysate の plating を行う際, 屢々 plate 上におけるファージ粒子の濃度とプラーク形成との関係が一致せぬ場合を経験した⁽¹⁾. 即ち通常の plating に従えば, ファージ濃度の甚だ高い plate では indicator organism の全面溶菌が起り, ファージ濃度の低い plate において始めて個々のプラークが形成される筈である. 然るにここに述べる phage-host system においては, ファージ濃度の低い plate 上のプラーク形成は正常なるにもかかわらず, ファージ高濃度の plate においては indicator organism の溶菌が起らず, 一見ファージを含まないかの如く見える. 以下この種の異常現象の発現とその原因究明のため行った実験の結果につき報告する.

実験材料と方法

使用菌株 : *B. subtilis* PCI 219 斜面培養より一白金耳を採り 15 ml の glucose bouillon に加え 28° で一夜振盪培養したものを host organism として用いた.

ファージ株 : L₁ かつて *B. licheniformis* のファージとして下水中より分離せるもの. *B. subtilis* をも host としうる. ファージ lysate 一滴を host organism (*B. subtilis*) 0.3 ml と共に 15 ml の培地に加え, 振盪増強を行う. ファージ lysate は無菌濾過後使用した.

培地 : glucose bouillon beef ext. 3 g, peptone 5 g, yeast ext. 2 g, glucose 5 g, NaCl 5 g, 蒸溜水 1,000 ml, pH 7.2. host organism の培養, ファージの増強及びファージ lysate の diluent に用いた.

glucose bouillon agar base layer (glucose bouillon+agar 2%) 及び over layer (glucose bouillon+agar 1%) として plating に使用した.

Plating method : plaque count assay における一般法⁽²⁾を準用した.

実験結果

1. 異常現象の一般例 以上の phage-host system を用い, 一系列の plating を行う時は前述のプラーク形成異常現象が認められる. 本現象の一般例を下に示す.

ファージ稀釈倍数

プラーク形成状態

原液*

10⁻¹

10⁻²

10⁻³

プラーク形成せず. indicator organism は uniform に生育す.
(異常現象の発現部)

* Studies on the Abnormality of Plaque Formation by Bacteriophage of *Bacillus subtilis*. Part I. Its Occurrence and Some Findings.

By Shukuo KINOSHITA and Takuji OKUMURA (Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd. Tokyo Research Laboratory)