第2表よりわかる様に MG 値はいずれも上記の泳動諸条件の影響を比較的受けない恒数となることがわかる。

しかし此等 MG 値はアミノ酸^(4,6)、血清蛋白⁽⁶⁾の場合に比べて幾分誤差範囲が広がっているが、B 群を除いては実用上先ずさしつかえないであろう。この様に幾分標準偏差が大きく、中でも滴下位置による影響が大きい色素が多い理由としては、第7図に示した様に MG 値が各泳動物質の滴下位置—泳動距離グラフの平行という前提に立っているためで、前記 B, C, D, E 各群別は R 値近似による便宜的群別で各群内の色素が厳密に平行なグラフを持たないことに帰因するであろう。このことは第5図(I)とB群の MG 値を対照して見ても充分うかがえる所である。この様に MG 値は血清、アミノ酸の場合の定義より更に広く、泳動物質の滴下位置—泳動距離グラフの平行という前提の下で更に他の物質に応用されるのではないかと考えられる。

総 括

- 1) 色素の蒸発を許す水平型濾紙電気泳動装置内の泳動距離を検討した。
- 2) 色素類を毛管分析により数群に分離することが出来、この際の移動率が懸垂型電気泳動装置内の泳動距離に極めて密接に関連のあることを知った。
- 3) 色素系及びその官能基と泳動方向の関係を調べると共に、之等色素の泳動速度が時間的に対数減衰に近似した減速を示すことを知った。
- 4) 従来の MG 値の定義を更に拡大し、これによる色素類の MG 値を求めた。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導を賜った九州大学大島康義教授に厚く感謝の意を表する次第である。又試料の御供与並びに御教示を戴いた三栄化学工業株式会社神原秀三郎氏に対し深く感謝する次第である。

(1) 坂本清、斎藤綱子：本誌、32, 181 (1958)。	(4) 坂本清、植岡和子：本誌、30, 463 (1956)。
(2) 坂本清、斎藤綱子：本誌、32, 275 (1958)。	(5) 坂本清、斎藤綱子：Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22, 55 (1958)。
(3) 坂本清、植岡和子：Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 98 (1956)。	(6) 坂本清、斎藤綱子：本誌、32, 279 (1958)。

放射状菌に関する研究*

ジヒドロストレプトマイシン共存下に於ける ビタミン B₁₂ の定量について

中沢鴻一、柴田元雄、山本弘一、東出栄治、神崎俊彦（財団法人 醗酵研究所）

昭和 32 年 9 月 2 日 受理

緒 言

E. L. Rickes 等⁽¹⁾によって *Streptomyces griseus* の培養液中からビタミン B₁₂（以下 B₁₂ と略す）が抽出されて以来、多くの放射状菌の培養液中に B₁₂ が生産されることが明らかになった。我々が分離した *Streptomyces humidus* に於ても同様に B₁₂ 産生能が認められたが、この菌はジヒドロストレプトマイシン（以下 DSM と略す）を生産するのでその共存下に於ける B₁₂ 定量法が要望せられた。そこで DSM 共存下に於ける B₁₂ 定量法を検討したので報告する。

B₁₂ の定量法としては理化学的定量法、微生物による定量法、動物による定量法等があるが、醗酵液の様に多くの物質が含まれ、しかも微量の B₁₂ が存在する場合には微生物による定量法が最も適している。B₁₂ の微生物による定量法は M. S. Shorb, G. M. Briggs⁽²⁾が肝臓濃縮物を *Lactobacillus lactis* Dorner の growth factor であることを発見して以来、乳酸菌による定量法が多く行われ⁽³⁻¹⁰⁾、米国薬局法でも *Lactobacillus leichmannii* を用いている。その他の微生物としては B. D. Davis, E. S. Mingiols によって *Escherichia coli mutant* を用いる方法⁽¹¹⁾その他⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾がある。又乳酸菌、大腸菌変異種では B₁₂ 以外の物質に影響されるので原生動物即

* Studies on Streptomyces. Assay of Vitamin B₁₂ in the Presence of Dihydrostreptomycin.

By Kōiti NAKAZAWA, Motoo SHIBATA, Hiroichi YAMAMOTO, Eiji HIGASHIDE and Toshihiko KANZAKI (Institute for Fermentative Processes, Osaka)

ち *Euglena gracilis* による方法⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾, *Ochromonas malhamensis* による方法⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ がある。しかし今ここで目的としている DSM 共存中の場合の B₁₂ 定量については乳酸菌では DSM の影響を受け易く⁽²¹⁾⁽²²⁾, 原生動物ではその影響はほとんどない⁽²¹⁾が, 定量に長時間を要するので DSM の影響が比較的少く, 又定量に要する時間も短い大腸菌変異株を用い, その定量法を検討した。

実 験 方 法

定量に用いた菌 *Escherichia coli* mutant # 313* (以下 *E. coli* と略す) で, 対照として *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 (以下 *L. leich.* と略す) を用いた。

保存培地, 前培養培地, 検定用培地は第 1, 2, 3 表の様な組成である。定量に用いた試験管は 15×160 mm のクロム硫酸⁽²³⁾ 及び蒸溜水で洗滌

した径の均一のを, 200°C, 3~

4 時間乾熱殺菌した後使用し接種量

は前培養培地に 20~24 時間前培養後

第 1 表

保存用培地

肉 エ キ ス	3(g)
ペ プ ト ン	5
寒 天	2
蒸 溜 水	11
pH.....	7.0
15 lb, 10 分加圧殺菌	

第 2 表

前 培 養 用 培 地

K ₂ HPO ₄	7(g)
KH ₂ PO ₄	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
クエン酸·H ₂ O	0.4
NaCl	2.5
dl-メチオニン	0.1
グルコース	2.0
蒸 溜 水	11
pH.....	7.0
15 lb, 10 分加圧殺菌	

第 3 表

検定用培地 (A)

(倍 強 培 地)	
K ₂ HPO ₄	14(g)
KH ₂ PO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
クエン酸·H ₂ O	0.8
NaCl	5.0
l-アスパラギン	4.0
グ ル コ ー ズ	4.0
蒸 溜 水	11
pH.....	7.0
10 lb, 10 分加圧殺菌	

遠沈し, 上澄液を捨て, 菌体を生理的食塩水に懸濁し, 原液の 50 倍稀釈液の一滴を用いた。尚菌体を含む全醱酵液とその濾液とをくらべると, 前者は後者の約 10 倍量の B₁₂ を含有している即ち菌体中に B₁₂ のほとんどが含まれていることが分った。一方試料の処理法については動物組織, 体液, 醱酵液, 植物組織等で熱処理⁽¹⁵⁾ (16)(24)(25), 酵素処理⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾, 緩衝液処理⁽²²⁾があるが, NaHSO₃ 又はアルコール処理の方が水とか緩衝液処理よりも良いと報ぜられている⁽²⁸⁾ し, この実験でも 2, 3 検討したが, 時間を要せずに一番効果がよいので次の様な塩酸アルコール処理を行った。即ち 60% エチルアルコールと N/10 HCl を 1:1 の割合に混合した溶液を用いて菌体含有醱酵液より B₁₂ を抽出し, その濾液を試料とした。接種したものは 37°, 17~18 時間培養後 13%ホルマリンを 10 cc ずつ入れて Hilger 比色計で 580 mμ の filter を用いその吸光度を測定し, 標準曲線を作成してそれから B₁₂ の含量を算出した。尚対照として *L. leich.* を用いたがこれは USP XV に基いて行った。

結 果

1. 回収率 *Streptomyces humifidus* の醱酵液で夫々組成の異なるもの 9 個を試料として *E. coli* 及び *L. leich.* を定量菌として B₁₂ の含量を測定した。第 4, 5 表に示す通りである。即ち *E. coli* では 87.3~105.0%, *L.*

第 4 表 *Escherichia coli* mutant # 313 の回収率

試料 番号	加えた 試料の 量 (cc)	添加標準 B ₁₂ の 量 (mg)	試料だけ の B ₁₂ 力 価 (mγ)	試料と標 準 B ₁₂ を 加えた B ₁₂ 力価 (mγ)	回 収 率 (%)
1	0.4	0.17	0.387	0.580	103.5
2	0.4	0.17	0.490	0.632	97.5
3	0.4	0.17	0.630	0.698	87.2
4	0.4	0.17	0.040	0.221	105.2
5	0.4	0.17	0.374	0.522	96.2
6	0.4	0.17	0.390	0.488	87.3
7	0.4	0.17	0.005	0.180	103.0
8	0.4	0.17	0.320	0.460	94.0
9	0.4	0.17	0.390	0.590	105.0

第 5 表 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 の回収率

試料 番号	加えた 試料の 量 (cc)	加えた標準 B ₁₂ の 量 (mg)	試料のみ の B ₁₂ 力 価 (mγ)	試料と標 準 B ₁₂ を 合わせた B ₁₂ 力価 (mγ)	回 収 率 (%)
1	0.4	0.17	0.380	0.550	100.0
2	0.4	0.17	0.400	0.490	86.5
3	0.4	0.17	0.552	0.635	87.5
4	0.4	0.17	0.360	0.505	97.1
5	0.4	0.17	0.445	0.555	90.0
6	0.4	0.17	0.270	0.455	103.0
7	0.4	0.17	0.560	0.715	98.0
8	0.4	0.17	0.012	0.174	96.8
9	0.4	0.17	0.315	0.505	96.0
10	0.4	0.17	0.295	0.410	88.2

Leich. の場合は 86.5~103.0% である。尚 *E. coli* によ

る測定の回収率については, 麻生等⁽²⁴⁾ は Davis 培地では 82~120%, Burkholder 培地では 90~109%, J.

* この菌は当社光工場製造第二課石田課長より譲渡されたものである。

S. Chiao et al.⁽²⁹⁾ は Davis 培地で振盪培養をして 95~108%, F. J. Bandelin et al.⁽¹⁶⁾ は Burkholder 培地で 96~106%, 池田⁽²²⁾ は 89~105% としている。又乳酸菌については松田⁽³⁹⁾ が *L. lactis* Dorner で 91.7~107.9% と示している。であるから文献値と大体同様な値を示している。

2. 再現性 試料は *Streptomyces humidus* の醗酵液と肝臓抽出液について行い、醗酵液は全培養液を塩酸アルコールで前に記載した様に抽出した 10 倍液を冷所に 2 週間保存し、その間 1~3 日間隔で定量した。試料は 5 種類用いたが 4 種類は *Streptomyces humidus* の組成の異なる醗酵液で、他は肝臓の抽出液である。結果は *E. coli* については第 6 表, *L. leich.* については第 7 表に示す通りである。それでこの定量方法によると *E. coli*

第 6 表 *Escherichia coli* mutant #313 の再現性 (括弧内は平均を 100 とした時の%)

回数 試料番号	1	2	3	4	5	平 均	標準偏差
	(mγ/cc)						
I	—	391(100)	435(111)	365(93)	373(95)	391(100)	28 (7.1%)
II	573(116)	495(99)	569(112)	453(90)	427(85)	503(100)	55.1(10.9%)
III	129(102)	117(93)	147(116)	120(95)	125(99)	126(100)	10.5(8.3%)
IV	164(103)	160(100)	151(95)	194(122)	157(100)	159(100)	16.2(10.2%)
V	144(102)	137(97)	141(100)	143(101)	—	141(100)	2.7(1.9%)

第 7 表 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 の再現性

回数 試料番号	1	2	3	4	5	平 均	標準偏差
	(mγ/cc)						
I	—	434(104)	450(108)	408(98)	372(90)	416(100)	26.4(6.3%)
II	488(92)	566(106)	565(106)	466(88)	567(106)	533(100)	44.5(8.3%)
III	114(89)	149(116)	128(100)	114(100)	138(107)	129(100)	14.0(10.9%)
IV	192(100)	177(93)	192(100)	203(106)	—	191(100)	9.2(4.7%)
V	205(108)	188(99)	185(97)	184(97)	—	191(100)	8.2(4.3%)

については標準偏差が 10.9%, *L. leich.* についても 10.9% である。尚文献値は K. R. Johanson⁽¹⁴⁾ は約 4%, 麻生等⁽²⁹⁾ は 18.2~4.8% である。又酒井⁽²⁰⁾ は誤差範囲を 10~15% としている。であるからここに示した方法で十分に B₁₂ と定量することが出来る。

3. 定量に及ぼす抗性物質の影響 B₁₂ の定量の際の抗性物質の影響については酒井等⁽²¹⁾ は *L. lactis* Dorner を用いる酸滴定法で SM10γ/cc で対照の 75% であった。又池田⁽²²⁾ は *E. coli* はオーレオマイシン、ストレプトマイシンは 10γ/cc では全然生育せず、1γ/cc の時にはペニシリン>テラマイシン>オーレオマイシン>ストレプトマイシンの順に生育が悪くなり、0.1γ/cc では対照と大差ないと報じている。又安藤等⁽³¹⁾ は *L. lactis* を用いる重層法ではストレプトマイシン 25γ/cc で阻害されることを報告している。ここでは *E. coli* 及び *L. leich.*

第 8 表 *Escherichia coli* mutant #313 の DSM に対する感受性*

DSM γ/ml	0	0.2	0.5	0.8	1.0	1.5	2.0	4.0
vit. B ₁₂ mγ/ml								
0.02	100	97	95	96	99	84	90	83
0.05	100	101	104	103	97	86	77	73
0.1	100	102	105	104	109	86	80	63
0.2	100	102	102	102	107	—	37	—
0.5	100	97	102	112	102	26	5	3

第 9 表 *Lactobacillus leichmannii* の DSM に対する感受性*

DSM γ/ml	0	0.05	0.1	0.20	0.50	0.80	1.0	2.0
vit. B ₁₂ mγ/ml								
0.02	100	105	100	98	84	65	55	9
0.05	100	99	100	98	95	71	23	5
0.10	100	94	102	99	92	58	19	6
0.20	100	99	96	100	78	45	19	4
0.50	100	97	97	96	94	46	34	16

* DSM を 0 とした時の生育度(濁度)を 100 とした時の DSM の各段階の生育度(濁度)を%で表わしたものを。

について B₁₂ の夫々の量に対して DSM の量を 0 mγ/cc から 8 段階に分けて試験し、その吸光度を DSM 0 の時を 100 とした場合の百分率を次の 8, 9 表で示している。

これによると *E. coli* は DSM が 1γ/cc まで、*L. leich.* では 0.1~0.2γ/cc まで DSM が存在していても定量出来る。即ち試料の推定 B₁₂ 量が 5 mγ/cc である時は *E. coli* を使用する時は DSM が 100γ/cc, *L. leich.* の時は 10~20γ/cc までは存在しても菌の生育に影響なく定量出来る筈である。

尚、DSM 以外の抗性物質が試料中に存在している時の影響は表 10 の通りである。この場合は B₁₂ 標準溶液 0.6 mγ/cc になる様に入れて、7 種の抗性物質を夫々含量

第10表 *Escherichia coli* mutant #313 の各種抗生物質に対する感性 (抗生物質 0 の時の生育を 100 とした時の生育量を表わしたもの)

抗生物質 菌の種類 抗生物質 γ /cc	TM*		CB*		AM*		NM*		Pc*		CM*		SM*	
	O**	R**	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.1	106	104	108	106	112	108	102	100	100	100	112	102	102	95
0.5	110	100	111	108	111	116	108	98	100	100	102	110	100	98
1.0	110	99	114	105	110	109	108	110	100	100	100	100	105	93
2.0	110	100	114	112	112	108	112	98	100	104	112	112	108	90
5.0	111	79	102	111	0	0	0	0	6.2	41.5	100	71	97	90
10.0	86	63	93	82	0	0	0	0	7.4	4.1	88	62	35	93
20.0	54	17	49	57	0	0	0	0	0	0	—	—	0	87
50.0	10	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	0	88

* TM; Terramycin, CB; Carbomycin AM; Aureomycin, NM; Neomycin, Pc; Penicillin CM; Chloromycetin SM; Streptomycin

** O; *E. coli* mutant R; *E. coli* mutant で DSM 耐性菌

を変えて抗生物質が 0 の時の吸光度を 100% として、それに対する百分率を挙げた。この表から分る様にテラマイシン、カルボマイシン、オーレオマイシン、ネオマイシン、ペニシリン、クロロマイセチン、ストレプトマイシンは検定培地中で 2.0 γ /cc までは影響なく定量出来る。尚、この表で、O は今まで使用して来た *E. coli* で、R は後に述べる耐性菌を夫々示し、各々生育度を示している。耐性菌については後の項で述べることにする。

4. ジヒドロストレプトマイシン耐性菌の育成及び定量 前に述べた様に DSM が試料中に 10 γ /cc (B_{12} が 0.5 γ /cc の場合) 以上存在すると *E. coli* では B_{12} の測定は出来なくなる。それで *E. coli* の DSM 耐性菌を育成して之による DSM 共存中の B_{12} の定量を行おうと試みた。

B_{12} 定量菌の耐性については E. Harrison et al. ⁽³²⁾ が *E. coli* を用いて SM の 2000 γ /cc 耐性菌を、又安藤 ⁽³¹⁾ 等は *L. lactis* Dorner で 14 代継代培養して 1000 γ /cc 耐性菌を育成している。しかしいずれの報告も耐性菌による B_{12} の定量についての詳しい報告はなされていない。

E. coli 及び *L. leich* の両方について DSM 耐性菌育成を行ったが、その方法は保存培地に DSM を入れて順次その量を増加させる。この培地に DSM の多い方へ継代培養してゆく方法をとった。この様な継代培養の方法で 12 代で 1000 γ /cc の DSM 耐性菌を育成した。一方この継代培養の間に Back-mutation, DSM-dependent について検討を加え、その様な事実がないことを確かめ、又耐性度の夫々の段階の耐性菌が B_{12} に対して正常又はそれに近い response curve を描くかどうかを確かめた。尚、*E. coli*, *L. leich* 共に DSM に 500 γ /cc まで耐性になったものを夫々通常の保存培地に継代培養して耐性度が落ちないことを検定培地で調べた。この実験で *L. leich* はその継代培養を 13 代した時 DSM が検定培地中に 5 γ /cc 入った時に DSM の影響をうけて、標準曲線が描けなくなるので *L. leich* の耐性菌についての検討は一応中止して、*E. coli* についてだけ行った。

以上の様にして *E. coli* について Back-mutation, DSM-dependent の懸念の少ない DSM 耐性菌を育成したが、Bacteria の形態に対する抗生物質の影響としては A. D. Gardner ⁽³³⁾ が *Clostridium welchii* 等で調べた所によると抗生物質の量が完全阻止よりも少し低濃度で細胞の大きさが 10 倍位になり、分裂し難くなるとしているがここで育成した *E. coli* については細胞の大きさの増大という事実は観察し得なかった。

この様にして育成した耐性菌を用いて B_{12} の定量を行うわけであるが DSM に耐性でない *E. coli*, 即ち通常の B_{12} 定量菌を *E. coli*/O と表わし、耐性菌を *E. coli*/R と

第 1 図

第11表 *E. coli*/O と *E. coli*/R によるA培地に於ける定量値の比較

	<i>E. coli</i> /O による B ₁₂ 力価 (A) (my/cc)	<i>E. coli</i> /R による B ₁₂ 力価 (B)	B/A×100 (%)
1	362	418	116
2	87	111	127
3	484	515	106
4	567	505	89
5	420	440	104
6	425	525	123
7	1100	1520	138
8	1210	1595	132

65~70%である。又 *E. coli*/O, *E. coli*/R で醗酵液中の B₁₂ 定量を行うとその測定値は第 11 表のようになる。即ちこの百分率は *E. coli*/O の測定値を 100 とした時の *E. coli*/R の測定値を百分率で表わしたものであり、*E. coli*/R の測定値は 89% と言うものを除いて他は 104~138% となっている。これは *E. coli*/R の標準曲線の傾斜が小さいことを示している。それでこの標準曲線を *E. coli*/O のそれに戻す為に培養時間の延長、接種量の増加を試みたが、前者では 24 時間、40 時間にした時生育の戻りの程度は平均 5%, 10% で、後者では 2 倍の時平均 3%, 50 倍の時平均 6% であった。しかし培養時間の延長では不便であるし、接種量増加では戻り方が少ないので、検定培地を検討した。

E. coli に対する改良培地では C. J. Bessel et al. (35) の最少培地, P. R. Burkholder (15), Shive (36) のアミノ酸を添加したもの, J. Boguka (37), N. Grossowicz et al (38) によるカゼイン分解物を添加したもの等が報告されている。ここでは検定培地に Burkholder の培地の 6 種のアミノ酸即ち *dl*-トリプトファン, *L*-グルタミン酸, *L*-アルギニン, *L*-プロリン 各々 200 mg/l ずつを添加して (これを B 培地とする), *E. coli*/R で標準曲線を作ってみたが、これでは *E. coli*/O で A 培地を用いた時の response に対し平均 80% の response である。所がアミノ酸を 2 倍量添加すると response が 110~120% に増加した (第 2 図)。これを標準曲線として醗酵液の B₁₂ を定量すると第 12 表の様になり、*E. coli*/O の定量値と比較すると 94~112% で測定出来た。

尚この 6 種のアミノ酸の中どの 1 種だけを加えても

第 2 図

する。*E. coli*/R について DSM 以外の抗性物質に対する感受性を検定培地で試験すると第 10 表の R の項のようになる。即ち Walaw, Szylski et al (34) も述べている様に SM 耐性菌になっても SM 以外のものについては抵抗性を獲得して居らず、又 E. Harrison et al. (32) も述べている様に耐性菌はその生育度が小さい。即ち耐性菌による B₁₂ の標準曲線は第 1 図の様になり DSM が検定培地中に存在するしないに拘らずその生育量は 37°, 17~18 時間培養では *E. coli*/O に対して

第12表 *E. coli*/O と *E. coli*/R による C 培地での定量値の比較

	<i>E. coli</i> /O による B ₁₂ 力価 (A) (my/cc)	<i>E. coli</i> /R による B ₁₂ 力価 (B)	B/A×100 (%)
1	327	328	100
2	153	171	112
3	68	64	94
4	554	549	99
5	674	630	94
6	177	178	100
7	428	450	105
8	148	145	98

第13表 *E. coli*/R に対する検定培地 (C 培地)

K ₂ HPO ₄	14(g)
KH ₂ PO ₄	6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
クエン酸・H ₂ O	0.8
NaCl	5.0
<i>L</i> -アスパラギン	4.0
<i>dl</i> -トリプトファン	400(mg)
<i>L</i> -グルタミン酸	400
<i>L</i> -arginine hydrochloride	400
<i>L</i> -histidine hydrochloride	400
グリシン	400
<i>L</i> -プロリン	400
グルコース	4.0(g)
蒸溜水	11
pH	7.0
10 lb, 10 分 autoclave 殺菌	

単一アミノ酸では response を正常に戻すことは出来なかった。

考 察

この報告では DSM 共存の試料について B₁₂ 定量法を検討した。定量菌に *E. coli* を用いると言うことは Back-mutation の危険性ありとして一般にあまり広く用いられていないのであるが、現在までの所その様な懸念はなく、その上培地組成が簡単で、抗性物質に対する感受性も乳酸菌より小さく、定量操作が簡単である等の理由により抗性物質共存の醗酵液などの B₁₂ 定量に際し適している。

B₁₂ の定量の場合の抗性物質の阻害除去の研究としては安藤等⁽³¹⁾によって SM の阻害除去が報告されている。それによると (1) SM 拮抗物質添加, (2) 定量菌に SM 抵抗性を与える, (3) Paper chromatography による等が挙げられている。この実験でも DSM 拮抗物質を使用しようと試みた。それについて I. C. Wells, J. W. Cornforth and A. T. James⁽⁴⁰⁾, L. Söderhjem and B. Zetterberg⁽⁴¹⁾, R. F. Pitfilds and J. W. Foster⁽⁴²⁾ の報告がある。この中で inositol, L-phenylalanine を検討したが、いずれも効果がなかった。それで耐性菌を育成し、これを検討したのであるが、この耐性菌は A 培地では生育度が非常に落ちる。しかしアミノ酸を添加することによって回復した。以上のことから *E. coli* の DSM 耐性菌に対して Burkholder 培地の 6 種のアミノ酸を添加することにより C 培地を作りこれによって DSM 共存中の B₁₂ を定量することが出来る。

要 約

(1) *E. coli* 及び *L. leich.* を用いて *Streptomyces humidus* の醗酵液を試料として回収率、再現性を調べ *E. coli* では 87.3~105%, 10.9%, *L. leich.* では 86.5~103.0%, であった。

(2) *E. coli* 及び *L. leich.* の抗性物質に対する影響を調べ、DSM では *E. coli* は検定培地 1 cc 当り 1 γ まで *L. leich.* では 0.1~0.2 γ まで DSM が存在しても測定が可能である。尚 B₁₂ は検定培地 1 cc 当り 0.05~0.5 mγ の範囲である。他の抗性物質に対しては *E. coli* で検定培地 1 cc 当りテラマイシン、クロロマイセチン、カルボマイシン、オーレオマイシン、ネオマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシンが 2 γ まで存在しても定量に阻害は認められない。

(3) *E. coli* を DSM の入った保存培地に継代培養することにより、12 代で DSM 1000 γ/cc の耐性菌を育成し、その B₁₂ に対する response が異状になってないことを確めた。

(4) この耐性菌を用いて B₁₂ の定量を行ったが、生育量が小さく満足な標準曲線を得られなかったので、検定培地の改良を行い、6 種のアミノ酸を添加した検定培地で定量することにより、*E. coli*/O で A 培地で定量した値と比較し 94~112% の範囲で定量出来る。

終りに御指導、御鞭撻戴いた醗酵研究所長 佐藤喜吉博士、研究所長、桑田智博士、研究所第二部長 立岡末雄博士に深甚の謝意を表すると共に定量菌の分譲及び御教示を戴いた光工場製造第二課長 石田安成氏、並びに種々御助言を仰いだ研究所第三部 川島実氏に御礼申し上げる。又実験の細部について終始協力された森たかね氏に感謝する

(1) Edward L. Rickes et al.: <i>Science</i> , 108, 634 (1948).	(9) H. W. Loy, Jr. et al.: <i>J. Assoc. Offic. Agr. Chemists</i> , 31, 161 (1952).
(2) Mary S. Shorb: <i>Science</i> , 107, 397 (1948).	(10) M. Pontecorvo: <i>Rev. ist. sieroteraps ital.</i> , 26, 419 (1951).
(3) C. E. Hoffmann: <i>J. Biol. Chem.</i> , 181, 635 (1949).	(11) K. A. Brownlee et al.: <i>J. Bact.</i> , 62, 433 (1951).
(4) B. S. Capps et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 178, 517 (1949).	(12) B. D. Davis et al.: <i>J. Bact.</i> , 60, 17 (1951).
(5) H. T. Thompson et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 184, 175 (1950).	(13) 池田裕人: ビタミン, 10, 268 (1956).
(6) H. R. Skeggs et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 184, 211 (1950).	(14) K. R. Johansson: <i>Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.</i> , 83, 448 (1953).
(7) W. F. J. Cuthbertson: Abstract Commun. 1st Intern. Congr. Biochem., 79 (1949).	(15) P. R. Burkholder: <i>Science</i> , 114, 459 (1951).
(8) J. M. McLangham et al.: <i>Rev. can. biol.</i> , 11, 120 (1953).	(16) F. J. Bandelin et al.: <i>J. Am. Pharm. Assoc.</i> , 43, 474 (1954).
	(17) S. H. Hunter <i>Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.</i> , 70, 118 (1949).

- (18) G. I. M. Ross: *J. Clin. path.*, 5, 250 (1952).
 (19) Ford: *Brit. J. Nut.*, 6, 324 (1952).
 (20) S. H. Hunter: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55, 852 (1953).
 (21) 酒井平等: 本誌, 27, 377 (1953).
 (22) 池田裕人: ビタミン, 10, 366 (1956).
 (23) E. H. Stapert: *J. Am. Pharm. Assoc.*, 43, 382 (1954).
 (24) 麻生和衛等: 本誌, 27, 680 (1953).
 (25) 奥田邦夫等: ビタミン, 10, 154 (1956).
 (26) B. S. Schweigert: *Fed. Proc.*, 10, 394 (1951).
 (27) H. C. A. Tarr: *Fed. Proc.*, 11, 297 (1952).
 (28) Carl H. Krieger et al: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemist.* 35, 726 (1952).
 (29) J. S. Chiao et al: *Appl. microbiol.*, 1, 42 (1953).
 (30) 松田竜夫: ビタミン, 6, 45 (1953).
 (31) 安藤忠彦等: 科研報告, 28, 380 (1952).
 (32) Eleanor Harrison et al: *Analyst*, 76, 696 (1951).
 (33) A. D. Gardner: *Nature* 146, 837 (1940).
 (34) Waclaw et al: *J. Bact.*, 64, 489 (1952).
 (35) C. J. Bessel et al: *Chemirty & Industry* No. 28 561 (1950).
 (36) Shive: *Vitamin method*, 2, 700 (1951).
 (37) J. Boguba et al: *Prozemyst Chem.*, 32, 14 (1953).
 (38) N. Grossowicz et al: *Harefuach*, 46, 141 (1954).
 (39) I. C. Wells: *J. Biol. Chem.*, 196, 331 (1952).
 (40) J. W. Cornforth et al: *Biochem. J.*, 58, xlviii (1954).
 (41) L. Söderhjem et al: *Abstracts World. Med.*, 6, 118 (1949).
 (42) R. F. Pitfilds et al: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 84, 568 (1953).

醗酵微生物のファージ現象に関する研究 (第 4 報)*

細菌アミラーゼ工場に侵入したファージの分離

北原 覚雄, 金子 太吉 (東大応微研)

昭和 32 年 9 月 26 日 受 理

Bacillus subtilis 系細菌を利用するアミラーゼの工業生産には、初期には固体培養法が行われていたが戦後深部培養法が採用されるようになった。ところが深部培養に変えて以来、各工場共予想しない溶菌現象に見まれ、その被害は甚大な場合もあったという。しかしその原因は解明されることなく、各工場は確固たる対策のないまま、あらゆる努力を払って溶菌を回避しようとしてきた。1955 年福田⁽¹⁾がアミラーゼ生産菌を攻撃するファージを実験室的に見出して以来、各工場もようやく上記の溶菌がファージに起因する可能性を考え始めたようである。一方野村⁽²⁾はこの種細菌が、通気培養から静置培養に移されると直ちに溶菌を始めること (anaerobic lysis) を報告した。

1955 年末著者等も某工場から、当時その工場にほとんど致命的な損害を与えていた溶菌現象についてその原因究明を依頼され、工場から送られた溶菌液について検討して、溶菌の原因がファージの混入であることを確かめ得た。その後他の 2 工場からも同様溶菌液の送付を受け、いずれの場合にもファージの混在を証明した。

本報ではこれらファージの分離と、溶菌曲線の検討について報告する。

材 料 及 び 方 法

使用菌株 *B. subtilis* K, M および S の 3 株はそれぞれの工場で実際に溶菌を起した菌株である。*B. subtilis* H はじめ T, N; *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* P₁₃, *B. amyloliquefaciens* F 等の諸株⁽²⁾ は当研究所野村氏から分譲を受けたものである。

B. subtilis H および K から出発してストレプトマイシン (SM) 耐性株 (それぞれ H/SM, K/SM と示す) を採った。H および K 株の生育や原株におけるファージ合成はそれぞれ 300 γ, 3 mg/ml の SM で完全に阻止されるが、原株を SM を含む培地で馴養して得た H/SM, K/SM 両株の生育およびファージ合成は 10 mg/ml 以上

* Bacteriophage Phenomena in Fermentative Microorganisms. Part IV. Isolation of Phages Causing the Troubles in the Production of Bacterial Amylase.

By Kakuo KITAHARA and Takichi KANEKO (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo.)