乳酸菌溶解酵素およびテンプレートファージの 産生条件について*

石 和 浩 美, 桜 井 稔 三
(ヤクルト研究所微生物部)

昭 和 46 年 10 月 11 日 受 理

Induction Procedures of Lytic Enzymes and Temperate Phages of Lysogenic Strains of Group C, *Lactobacillus* (Studies on Lytic Enzymes Acting on Lactobacilli Part I)

By Hiromi ISHIWA and Toshizo SAKURAI
Yakult Institute for Microbiological Research

The lytic enzymes acting on lactobacilli were found in the phage lysates induced from lysogenic bacteria, group C *L. casei* strains IAM 1043, R-094, C-47, C-201, and 3-793, out of 36 strains tested. In the process of induction of phage development in lysogenic strain IAM 1043, the lysis was affected by the growth temperature and pH value of the culture medium in the presence of 0.3 $\mu\text{g/ml}$ of mitomycin C even at the early log phase culture.

Both phage-like particles and lytic enzymes were first detected intracellularly at 180 minutes after addition of mitomycin C to the culture medium. The enzymes were not detectable in the culture of lysogenic strain without inducing treatment.

The hypothesis that the lytic enzymes synthesis was directed by the phage genome was discussed.
(Received October 11, 1971)

緒 言

乳酸菌の溶原株の発見に引き続き、テンプレートファージに由来する乳酸菌を溶解する酵素が発見された⁽¹⁾。ファージに由来する溶菌酵素は、大腸菌の T 2⁽²⁾, T 4⁽³⁾, λ ⁽⁴⁾ ファージ (muramidase) の研究を始めとして作用機作の解明されているものに glucosaminidase⁽⁵⁾, peptidase^(6,7), endopeptidase⁽⁸⁾, amidase⁽⁹⁾, fucosidase⁽¹⁰⁾ などがある。本研究の溶菌酵素を、卵白リゾチームと比較して溶菌試験を行なった結果、作用域が異なることから⁽¹⁾, 作用機作も異なることが推測される。

ファージの溶菌酵素は、細菌由来の溶菌酵素⁽¹¹⁾とともに細菌細胞壁の特異的な分解を行なうのに有用であり、特に乳酸菌の場合は細胞壁が厚く堅牢なため、一般に用いられている機械的または化学的方法では細胞を破壊し

にくいことから、緩やかな方法として酵素的溶菌ができれば、細胞壁の研究に加えて、菌体内物質の研究にも広く利用できる。

本酵素の研究を進めるために本報では、まずファージの宿主菌の分離を行ない、ファージ (溶菌酵素) の誘発の条件につき検討した。溶菌活性物質が酵素としての一般的性状を持っていること、熱誘発性変異株を分離して変異株の誘発条件を検討し、タンク培養法を確立したことについては続報する。

実験材料および方法

1. 菌株 乳酸菌の血清学的グループ C⁽¹²⁾ に属する *Lactobacillus casei* の溶原株である IAM 1043, C-43, C-201, 3-793, R-094 のうち IAM 1043⁽¹³⁾ を使用した。溶菌活性測定用の基質として, *L. casei* IAM 1045 を使用した。

* 乳酸菌溶解酵素の研究 (第 1 報)。

2. 培地 菌の培養は特記しない限り, MRT 培地⁽¹⁴⁾を使用した。また、一部に合成培地⁽¹⁵⁾を使用した。平板にコロニーを作らせる場合は, MRS 寒天培地⁽¹⁶⁾を使用した。緩衝液としては, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 1×10^{-3} M MgSO_4 を加えたものを使用した。

3. 抗生物質 マイトマイシン C (MC と略記) は, 協和醸酵工業(株)の製品を使用した。

4. 菌の培養法および濁度の測定法 液体培地で 1 夜培養した菌を 1/20 量新しい培地に接種して, 30°C で 2 時間静置培養し, 誘発処理を行なったのち培養を続けた。この間, 一定時間ごとに Klett 光電比濁計, 波長 660 nm (フィルター No. 66) で濁度の変化を測定した。

5. 菌の破壊法 冷緩衝液で洗浄した菌を超音波発生装置 (梅田電機製作所), 20 kc/s, 150 W で破壊した。

6. 電子顕微鏡によるファージ粒子の観察 誘発による溶菌液または超音波による溶菌液を, 冷凍遠心機 [富永製作所(株)] により沈渣を除き, 超遠心分離機 (日立 55 P-2 型) で 30,000 rpm, 60 分でファージ粒子を集め, これを 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.2) に懸濁して, リンタングステン酸でネガティブ染色し, 電子顕微鏡 (日本電子 JEM-7 A 型) を用いて観察した。

7. タンパク質の定量法および acid phosphatase の測定法 タンパク質の定量は, 銅-フォリン法⁽¹⁷⁾にしたがった。また acid phosphatase は, Bessey-Lowry-Brock 法⁽¹⁸⁾にしたがった。

8. 活性ファージの測定法 分離した変異株 C-4304 (本文参照) を指示菌として用い, 常法⁽¹⁹⁾にしたがった。ただし培養条件としては, 30°C で約 40 時間を要した。

9. 紫外線照射条件 15 ワットの殺菌灯 (東芝製) を使用し, 96 cm の距離 ($5.4 \text{ erg/cm}^2/\text{sec}$) で照射した。線量率は, 東芝殺菌線照度計 GI-1 型で測定した。

10. 基質の調製法 *L. casei* IAM 1045 を MRS 培地で, 30°C, 17 時間培養し, 遠心集菌後蒸留水で 2 回洗浄した。洗浄後, 菌体を蒸留水に懸濁し, その懸濁液に 1/20 量のクロロホルムを加えて, 低温 (5°C) 下, 18 時間攪拌した。クロロホルム処理後, 菌体を遠心分離し, 再び蒸留水で洗浄後, 凍結乾燥した。得られた粉末菌体は P_2O_5 存在, 減圧下, 室温でさらに 1 夜乾燥後, 密栓容器に入れて -10°C に保存した。

11. 酵素活性測定法 前記のようにして得た *L. casei* IAM 1045 のクロロホルム処理菌体粉末を, 0.5 mg/ml になるように 1/10M リン酸緩衝液 (pH 6.0, 1

$\times 10^{-3}$ M の MgSO_4 を含む) に懸濁して基質液とした。酵素活性は, 基質液 3.0 ml に対して粗酵素液を 0.2 ml 加え, 37°C における酵素液添加後の基質液の濁度の変化を 660 m μ の O.D. によって調べた (島津製作所製, SP-20 型光電比色計を使用)。粗酵素液添加後 10 分間の濁度の減少率から, 1.0 ml の粗酵素液が 37°C で 1 時間に溶解する基質の乾燥重量 (mg) を算定し, その値をもって粗酵素の酵素活性とした。

実験結果

1. 溶菌酵素を産生する菌株の検索

乳酸菌の溶原株から誘発により調製した溶菌液には, 乳酸菌細胞壁溶解酵素が含まれている。酵素産生の多い株を選ぶために, 溶原株の検索を試みた。1 夜培養菌を新しい培地に 1/20 量接種し, 30°C で 2 時間培養し, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の MC を加えて, 濁度の変化を経時的に測定した。溶原株の場合は, 数時間後に濁度の増加が止まり, 引き続き溶菌が起こるが, 溶菌の程度や時期は菌株により, かなり異なっていた。血清学的分類でグループ C に属する *L. casei* 36 株のうち, 15 株が溶原株として確認されている⁽²⁰⁾が, そのうち 5 株が特に顕著な溶菌を示し, ファージ粒子も各溶菌液から検出された。5 株について共通なことは, 誘発による溶菌が著しいこと, 形態的⁽¹³⁾に類似したファージを産生すること, 溶菌液中に乳酸菌を溶解する活性物質を含むことが上げられる。しかし最近, 活性ファージの宿主域の試験結果から, 5 株の間に差のあることが明らかになった (桜井未発表)。溶原株のうち溶菌の著しいものは, IAM 1043, C-43, C-201, 3-793, R-094 であった。

2. テンプレートファージの指示菌の分離

IAM 1043 から誘発により産生されるファージは, 他の *lactobacilli* を宿主にできなかった。そこで活性ファージ量を測定するために, ファージの指示菌の分離を行なった。まず IAM 1043 の対数増殖期の菌を 4 $\mu\text{g/ml}$ の MC で 30°C, 15 分間処理した後希釈し, MRS 寒天平板上にコロニーを作らせた。コロニーは, プロファージを有して誘発されなかった菌, およびプロファージを有しない菌によって作られたものである。これをレプリカプレートした後, マスタープレートに UV 照射を行ない, プロファージを有して MC で誘発されなかった菌でのファージの誘発を促した。次に, IAM 1045 の対数増殖期の菌 0.2 ml を軟寒天培地に混ぜて重層し, UV 照射し

たコロニーを覆い1夜 30°C で培養した。翌朝クロホルム蒸気をあてて指示菌を殺し、さらに 2~4 時間 37°C に保温すると、溶菌酵素を産生したコロニーのまわりでは、指示菌が溶けて溶菌の輪ができる。溶菌輪のできないコロニー、つまり誘発されずプロファージを有していない菌をレブリカプレート上から分離し、ファージに感受性になるものとして選別した。これらの分離株から、ファージの e.o.p. (efficiency of plating) が一番高い株 C-4304 を選んで指示菌に用いることにした。

3. 溶菌におよぼす培養温度の影響

溶菌誘発のための細菌の培養温度の検討を行なった。2 時間培養の菌液に 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の MC を加え、各温度の水槽で培養し濁度を測定した。Fig. 1 に示すように、溶菌の始まる時期には 32~37°C の間で差が認められないが、30, 28°C と温度が低くなるにしたがって遅くなった。溶菌液中の酵素活性は 28°C で一番高く、温度の上昇に伴って減少した。活性ファージ数も、酵素活性とほぼ平行して増減した (Table I)。20~25°C でも MC による誘発が認められたが、10 時間以上を必要とするた

Fig. 1. Change in Turbidity of the Culture of *L. casei*, Strain IAM 1043 Incubated at the Various Temperatures in the Presence of 0.3 $\mu\text{g/ml}$ of Mitomycin C.

The preculture was made by inoculating 5% volume of overnight culture in MRT broth, and grown for two hours at 30°C without aeration. 0.3 $\mu\text{g/ml}$ of MC was added to the cultures and they were incubated in the water bath adjusted at various temperatures: —●— 28°C, —▲— 30°C, —○— 32°C, —◆— 34°C, —◇— 37°C. The turbidities of the cultures were determined by Klett at the wave length of 660 nm after the number of hours shown on the abscissa had elapsed since MC addition.

Table I. Enzyme Activity and Phage Titer in Lysates Induced by 0.3 $\mu\text{g/ml}$ of MC at Various Temperatures

Temperature (°C)	Enzyme activity (mg*/ml/hr)	Phage titer (p.f.u.**/ml)
28	15.8	2.5×10^9
30	13.6	2.2×10^9
32	12.0	7.6×10^8
34	8.4	7.2×10^8
37	5.5	3.8×10^8

* lysed *L. casei* IAM 1045 in dry weight.

** plaque forming unit.

め、実験は 30°C で行なった。

4. 誘発に必要なマイトマイシンCの濃度

誘発に必要な MC 濃度を決定するために、30°C の培養液に 0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の MC を加えて濁度を測定し、また溶菌液の酵素を測定した。Fig. 2 に示すように、0.3 $\mu\text{g/ml}$ 以上で明瞭な溶菌が起こり、溶菌曲線にほとんど差がないが、酵素活性は 0.3

Fig. 2. Change in Turbidity of the Culture *L. casei*, Strain IAM 1043 Incubated in the Presence of Various Concentrations of Mitomycin C.

The various concentrations of MC were added in the culture medium at 30°C, and then turbidities were measured by Klett, at the wave length of 660 nm. —○— 0, —●— 0.05, —△— 0.1, —◇— 0.3, —◆— 0.5, and —■— 1.0 $\mu\text{g/ml}$ of MC. The lytic activities in lysates induced by 0.3 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of MC were highest in the present experiment.

Table II. Enzyme Activity in Lysates Induced by Various Concentration of Mitomycin C

Concentration of MC ($\mu\text{g/ml}$)	Enzyme activity (mg/ml/hr)
0	0
0.01	0
0.05	0
0.1	8.0
0.3	15.4
0.5	14.5
1.0	12.5

Fig. 3. Change in Turbidity of the Culture of *L. casei*, Strain IAM 1043 Incubated after Various Doses of UV Irradiation.

The condition of the preculture was described in the legend of Fig. 1. The cells were washed with 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), and then suspended in the same buffer. The cells in watch glass were irradiated by UV ($5.4 \text{ erg/cm}^2/\text{sec}$), with stirring at a room temperature, and then harvested by centrifugation. They were suspended in fresh broth, followed by incubation at 30°C. The turbidities were plotted against the incubation time.

(≈ 0.5) $\mu\text{g/ml}$ MCの方が1.0 $\mu\text{g/ml}$ MCより高かった (Table II). 0.1 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下では, 溶菌は起こらなかった. 以上は少量の MC を培地に加え継続的に作用させているが, 濃度を 3.0 $\mu\text{g/ml}$ にして 30°C, 15 分間作用させた後洗浄して, 新しい培地に移しても数時間後に溶菌が起こった. 前者は MC の使用量が少ないことと, 操作がきわめて簡単である等の利点があるため, 本研究は前者の方法に統一して実験を行なった.

5. 紫外線による誘発効果

一般に溶原株は, 紫外線 (UV) により誘発されることが古くから知られている⁽²¹⁾ので, UV による誘発実験を行なった. 2 時間培養した菌を緩衝液で洗って再び同液

Fig. 4. Change in Turbidity of the Culture of *L. casei*, Strain IAM 1043 Induced by Addition of 0.3 $\mu\text{g/ml}$ of Mitomycin C at the Several Bacterial Ages.

0.3 $\mu\text{g/ml}$ of MC was added to a part of the culture when the turbidities of the culture had reached to 30, 60, and 90 in Klett unit. $\downarrow$ indicates the time when MC was added in the bacterial culture. Lytic activities in lysates were in the order of Klett unit = 90 > 60 > 30. The values in () indicate enzyme activities (mg/ml/hr).

に懸濁し, UV を照射した. 遠心で菌を集め新しい培地に懸濁して, 30°C で培養した. Fig. 3 に示すように, 約 3 時間後に溶菌が始まった. 10 秒照射 (5.4 erg/cm²/sec) では, 濁度が一時減少し再び増加した. コロニーカウント法で生残菌数を測定した結果, これは約 50% の菌が溶菌に向かうが, 誘発されなかった菌が増殖するためであることを認めた. 99% 以上の誘発に必要な線量は約 200 erg (40 秒) であった.

6. 菌の age と誘発曲線

菌の増殖の各段階で誘発処理を行なった場合の溶菌曲線を追跡し, また溶菌液の酵素活性を比較した. 1 夜培養菌を培地に 1/20 量接種して 30°C で培養し, Klett unit が 30, 60, 90 に達した時点で 0.3 μg/ml の MC を加えて, 濁度を測定した. Fig. 4 に示すように, 菌濃度の異なる各点で誘発が起こり, 溶菌液の酵素活性は誘発時の Klett unit=90 の場合が一番高く, 60, 30 の順に低くなっていた. ただし対数増殖期後期に近づくと,

Fig. 5. Change in Turbidity of the Culture of *L. casei*, Strain IAM 1043 Incubated in the Presence of 0.3 μg/ml of Mitomycin C Adjusted at the Various pH Values.

The preculture (100 ml) was made as presented in Fig. 1. Aliquots of the culture were removed and then adjusted to the pH value at ...○... 5.0, —◇— 5.5, —○— 6.0 & 6.5, ...●... 7.0, and —●— 7.4. 0.3 μg/ml of MC was added in each culture and then incubated at 30°C. The turbidity of the cultures were determined by Klett at 660 nm. The values were plotted against the hours of incubation.

次第に誘発がかかりにくくなり, 静止期の菌には誘発が認められなかった.

7. 誘発におよぼす pH の影響

誘発時の培地の pH 値を 0.2 M 酢酸溶液または 1 M Tris 緩衝液 (pH 7.4) を加えて調整し, 0.3 μg/ml の MC を加えた. 30°C で培養した結果を Fig. 5 に示す. pH 6.0~6.5 の場合に溶菌が最も早く起こり, pH 7.4 では 3 時間遅れて急激な溶菌が起こった. 一方, pH 5.0 の場合は溶菌が 3 時間遅れ, かつ緩やかであり, 継続して 1 夜培養したが透明な溶菌液は得られなかった. 溶菌液の酵素活性およびファージ数は pH 7.4 で一番高く, pH 値が低くなるにしたがって低下した (Table III).

Table III. Enzyme Activity and Phage Titer in Lysates Induced by 0.3 μg/ml of MC at Various pH Values

pH Value	Enzyme activity (mg/ml/hr)	Phage titer (p. f. u./ml)
5.0	4	5.6×10^8
5.5	7	8.5×10^8
6.0	10	1.7×10^9
6.5	10	2.2×10^9
7.0	11	2.5×10^9
7.5	14	3.2×10^9

8. 誘発処理後のファージと酵素活性の経時的測定

MC により誘発処理をほどこした菌の内部で, ファージ粒子および溶菌酵素の産生される時期を検討した. 合成培地で 2 時間培養した後, 0.3 μg/ml の MC を加え, 1 時間ごとに 50 ml の培養液を取り出して氷冷した. 次に遠心で菌を集め, 冷緩衝液で洗った後 10 ml の緩衝液に懸濁し, 氷冷しながら超音波で菌を破壊した. 再び遠心分離 (7000 rpm, 15 分間) により得た上澄を, 緩衝液で 24 時間の透析を 2 回くり返した. Fig. 6 (a) は, 菌の増殖曲線を示す. 時刻 0 で 0.3 μg/ml の MC を加えた. 濁度は 4 時間目に最高値に達し, 引き続き溶菌が起こった. (b) は単位タンパク質当りの溶菌酵素活性の相対値を示した. 酵素活性は 2 時間目までは認められなかったが, 3 時間目から検出された. (c) は菌体由来と思われる acid phosphatase の活性 (相対値) を示した. 単位タンパク質当りの acid phosphatase の活性はほぼ一定であることから, ファージの増殖は菌体由来の acid phosphatase の合成には, ほとんど影響を与えていないと認められる.

誘発後, ファージ粒子の形成する時期を調べるために,

Fig. 6. Production of Intracellular Lytic Enzyme(s) after Addition of Mitomycin C in the Culture Medium of *L. casei*, Strain IAM 1043.

Preculture was made as previously using synthetic medium. An aliquot of culture was removed from the culture bottle at every 60 minutes since the addition of $0.3 \mu\text{g/ml}$ MC. The washed cells by phosphate buffer were suspended in the same buffer and then disrupted using sonicator in ice bath. After removing debris by centrifugation, the samples were dialyzed against phosphate buffer. (a) Induction curve was determined by reading the turbidity of the culture by Klett at 660 nm. (b) Lytic activities (in arbitrary unit) per protein were measured by reading the decreasing rate of the turbidity of the substrate, IAM 1045, by Klett at 660 nm soon after mixing 10% volume of lysate. (c) Acid phosphatase (in arbitrary unit) per protein was measured by Bessey-Lowry-Brock's method.

試料の一部を超遠心分離により濃縮し、電子顕微鏡で観察した。2時間目までのいずれの試料からも、ファージ粒子はほとんど見つからなかったが、3時間目からは多

Fig. 7. Change in Turbidity of the Culture of *L. casei*, Strain C-4304 With or Without Phage Infection.

The log phase culture of C-4304, cured strain of IAM 1043, was infected by phage which was prepared from IAM 1043, and then incubated at 30°C. The turbidities determined by Klett at 660 nm were plotted against incubation time. —○— m. o. i. = 20, —●— no phage.

量の粒子が確認された。

9. ファージの感染による溶菌

IAM 1043 から誘発により得たファージは、C-4304 に感染し数時間後に溶菌を起こす。C-4304 にファージ (m. o. i. = 20) を感染させた場合の溶菌曲線を Fig. 7 に示す。溶菌液には、多量の活性ファージ ($\sim 1 \times 10^{10}/\text{ml}$) と酵素活性 (12 mg/ml/hr) が検出された。

考 察

誘発により調製した *Lactobacillus casei* IAM 1043 の溶菌液中に、乳酸菌溶解酵素⁽¹⁾が含まれている。誘発後菌体内物質を経時的に抽出し、酵素活性を測定し、ファージ粒子を観察した。その結果、2時間目までの試料からは溶菌活性もファージ粒子も検出されなかったが、3時間目からは多量に見出された。一方、IAM 1043 の変異株である C-4304 にファージを感染させて得られた溶菌液中にも、酵素が含まれていた。以上の結果から、この溶菌酵素はファージに由来するものと考えられる。誘発のための至適培養温度は 30°C 付近にあり、ファージ

ブラックも 30°C, 2 日間培養で得られるが, 37°C ではブラックができない。また, 誘発時の pH 値がファージおよび酵素の収量に影響を与えた。pH 7.4 の場合は, 6.0 と比較して溶菌は約 3 時間遅れたが, ファージおよび酵素の収量は高かった。同様の結果は, C-4304 のファージ感染によって得られた溶菌液にも見られた。

誘発に必要なマイトマイシン C の濃度は, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であり, 大腸菌 *E. coli* K 12 (λ) の誘発の場合⁽²²⁾ と差が認められなかった。

要 約

乳酸菌の溶原株, *Lactobacillus casei* IAM 1043 を用いて乳酸菌溶解酵素の産生条件を検討した結果, 対数増殖期の培養液にマイトマイシン C を加え培養を続けると数時間後に溶菌が起こり, 溶菌液に乳酸菌溶解酵素が含まれていることを認めた。誘発に必要な MC の濃度は 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であり, 至適培養温度は 28~30°C で, 至適 pH 値は 6.0~6.5 であった。

ファージと溶菌酵素の産生に強い相関があることから酵素がファージに由来することを支持する結果を得た。

本研究の一部は昭和 45 年 10 月, 日本遺伝学会第 42 回大会 (於東京) で発表した。

- (1) H. Ishiwa and T. Yokokura: *Japan. J. Microbiol.*, **15**, 539 (1971).
- (2) W. Weidel and W. Katz: *Z. Naturforsch.*, **16 b**, 156 (1961).
- (3) A. Tsugita and M. Inouye: *J. Biol. Chem.*, **243**, 391 (1968).

- (4) L. W. Black and D. S. Hogness: *ibid.*, **244**, 1968 (1969).
- (5) S. S. Barkulis, C. Smith, J. J. Boltralik and H. Heymann: *Bact. Proc.*, **32** (1964).
- (6) N. E. Welker: *J. Virology*, **1**, 617 (1967).
- (7) J. M. Goeptert and H. B. Naylor: *ibid.*, **1**, 701 (1967).
- (8) A. Taylor: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 16 (1970).
- (9) N. E. Welker and L. L. Campbell: *Bacteriol. Proc.*, **126** (1966).
- (10) I. W. Sutherland: *Biochem. J.*, **104**, 278 (1967).
- (11) 小谷尚三: 蛋白質 核酸 酵素, **13**, 1136 (1968).
- (12) M. E. Sharpe: *Dairy Sci. Abstr.*, **24**, 109 (1962).
- (13) T. Sakurai, T. Takahashi and H. Arai: *Japan. J. Microbiol.*, **14**, 333 (1970).
- (14) 村田 晃, 添田栄一, 猿野琳次郎: 農化, **43**, 311 (1969).
- (15) 赤堀四郎, 水野三一郎: 蛋白質化学, **1**, 192 (1957).
- (16) J. C. de Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe: *J. Appl. Bact.*, **23**, 130 (1960).
- (17) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (18) 赤堀四郎編: 酵素研究法, **4**, 699 (1961).
- (19) H. M. Adams: "Bacteriophages," Interscience, Publishing Company, Inc., New York (1959).
- (20) H. Ishiwa, S. Kodaira, T. Yokokura and T. Sakurai: in preparation.
- (21) A. Lwoff: *Bact. Rev.*, **17**, 269 (1953).
- (22) N. Otsuji, M. Sekiguchi, T. Iijima and Y. Takagi: *Nature*, **184**, 1079 (1959).