報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 73, No. 11, pp. 1173~1180, 1999]

細胞増殖を制御する細胞音波研究法の改良：回転台を用いた
波動エネルギー等外部の影響によるばらつきの修正遠藤成朗*, **, 高柳 周**, 菊間聖太郎**, 真坂絵理**, 平岡七恵**,
藤野光士**, 遠藤 桂**, 西川義尚*, 松橋通生** ***

(*東海大学工学部工業化学科, **東海大学開発工学部生物工学科, ***東海大学総合科学技術研究所)

平成 11 年 6 月 11 日受理

Refinement of the Method for Research on "Biosonics", Sonic Wave
Regulation of Cell Growth: Use of a Turntable to Balance
the External Effects such as Oscillatory EnergiesShigeo ENDO, Shu TAKAYANAGI, Seitaro KIKUMA, Eri MASAKA, Nanae HIRAOKA,
Akito FUJINO, Katsura ENDOH, Yoshihisa NISHIKAWA, and Michio MATSUHASHI
Tokai University School of Engineering, School of High-technology for Human Welfare
and Research Institute of Science and Technology, 317 Nishino, Numazu 410-0395

Our environment is full of a variety of oscillations, or their pulses, which produce sound waves with different waveforms and frequencies. Cells such as bacteria are thought to survive and grow by accepting these sonic signals, based on our several published and unpublished experiments. To more precisely measure the effects of sonic signals on the functions of cells, it is important to balance the external effects such as oscillatory energies, which are converted to sonic signals that it radiate the experimental system and promote and sustain the growth of bacteria.

In this communication an improved method for measuring the response of cells to the growth-promoting and/or growth-sustaining effects of sound waves is described. This improvement was done by placing the Petri dishes containing the cell cultures on a slowly rotating turntable in a thermoregulated, ventilated incubator. This not only excluded unbalanced background values among cultures, but also resulted in markedly low background values in zero-control experiments that omitted sonic signal donor materials. Moreover, shielding the Petri dishes with aluminum foil or iron plates and rotating the cultures resulted in almost complete discrimination of the external effects such as oscillatory energies. (Received June 11, 1999)

Key words: bacteria; electromagnetic; growth regulation; oscillatory energy; sonic signal

緒 言

細菌などの細胞に微弱な音波や超音波を発信したり感受したりする能力があって、このような微弱な音響シグナルが細胞同士のコミュニケーションに用いられ、生活環境からの音響シグナルの応答に働いていることは間違いないと思われる⁽¹⁻³⁾。

すなわち前者については枯草菌 *Bacillus subtilis* か

ら好炭素バチルス菌 *B. carboniphilus* に対する厚さ 1 mm の鉄板越しの増殖促進効果がみいだされており⁽¹⁾、また直接に *B. subtilis* から周波数 9 kHz およびその倍音を中心とする音波の発信が検出され、ついで *B. carboniphilus* にスピーカから同様な周波数の音波を与えてその増殖を制御する⁽³⁾ などの実験が行われた。一方、後者について筆者らは黒鉛（グラファイト）^(2, 4) などの無生物物質がある種の細胞に対して増

殖促進の遠隔効果を示すことをみだし、これらが空中の電磁波の断続波を超音波に変換して細胞に作用することを推定した（文献5および論文投稿準備中）。しかしこれらの現象を厳密に解析しようとする、おそらく空中からの電磁波などのエネルギーが不均一に実験系に注がれている結果、実験器具や実験材料に当たって音波に変換されるされかたが均一でないため、きれいな再現性のある結果が得にくいことがしばしばあった。このことは完全実験系でも、電磁波の照射や光音響変換物質をできるだけ除いたゼロコントロール実験でも見られることであった。例えばエタノール・ストレス下に酵母を用いたプレート実験で、電氣的に温度制御された恒温培養器や恒温培養室の中のわずかなセンチのプレートの位置の違いによって酵母菌が生えたり生えなかったりすることがあり、しかもその増殖の位置的パターンは日ごとに变化した（未発表データ、および松橋通生、加藤 敬、高柳 周、菊間聖太郎、鈴木 穰、吉村正裕、1998年日本農芸化学会大会講演要旨集46頁参照）。このような実験条件の位置的・時間的不均一性を平均化して定量性と再現性に優れた実験結果を得るために、1分間に2～3回転する回転台を小型ファンで空気かくはんした培養器内に設置し、実験試料をその上に並べることによって満足すべき定量性と再現性のある結果を得ることができるようになったが、そればかりでなく、同時にいくつかの予期しなかった、まだ十分解析できていない新しい観

察結果も得られ、そのあるものはさらに次の段階の研究の出発点となった。

実験方法

菌株および培養法：静岡県愛鷹山の空气中より分離した好炭素バチルス菌 *Bacillus carboniphilus* Kasumi 6 株^(6,7) は筆者らの保存株を用いた。菌培養の培地は Bacto Antibiotic Medium 3（通称 Bacto ペナッセイ培地、Difco Laboratories, Becton & Dickinson, Baltimore, MD, U.S.A.）を用い、これを塩濃度を下げるために水で2倍に薄めたものをそのまま、または改めて1% KClを加えて塩濃度をあげ、ポリスチレンペトリ皿（岩城ガラス（株）製90×15 mm）中1.5%の寒天で固めた平板培地に普通5000～20,000の孢子を含む少量の培地懸濁液を沈降吸収させ、42～44℃に温度調節した培養器（東京理化ソフトインキュベーター EYELA SLI-600ND または同450ND）に2～3日間培養した。44℃におけるこの培養条件は原則として音響ドナーがない限り音響応答側の細胞を生育させないので、「本来致死的な条件 ordinarily non-permissive condition」と呼んだ^(1～3)。培養は小型のファンで空気かくはんして内部の温度を均一に保っている培養器中にセットした通常の静置培養のほか、同じ形式・条件の培養器中の回転台（ターンテーブル）の上で行った。

回転台：Fig. 1 に示すように SANKYO(株)製シン

Fig. 1. Construction of the Experimental System, Including Inoculated Petri Dishes Rotating on a Turntable and Shielded by a Double Layer of Aluminum Foil.

Fig. 2. Positions of Petri Dishes on the Turntable.

Numbers indicate the position number of the Petri dishes shown in Tables I and II. For experimental details see the legend to Tables I and II and Materials and Methods.

クロナスモーター M2AJ24ZB32 型または多摩川精機 (株) 製ステッピングモーター TSS3384N3 型 (共に 1 分間 2 回転) を用いて軽量プラスチック製のターンテーブル (直径 550 または 470 mm, 厚さ 3~25 mm) を右まわり (上からみて時計まわり) に回転させた。まだ明らかになっていない理由から、多くの場合右まわりの方が左まわり (上からみて反時計まわり) より低く安定したコントロール値 (バックグラウンド) を与えたので (未発表データ), 一般に右まわりの回転を実験に用いた。

遮へい実験: いままでの研究成果から好炭素細菌 *B. carboniphilus* の増殖には細胞⁽¹⁾ や音響発生器からの音波⁽³⁾ や、音波に変わりうると思われる外部からの電磁波などのエネルギー⁽²⁾ が必要であることがわかったので、実験はいつも対照として厚さ 1 mm の鉄板または厚さ 15 μ m のアルミホイル 2 枚で遮へいした実験系をおいて比較した。遮へいのため金属板またはホイルでペトリ皿を覆うと、ペトリ皿内部の湿度の上昇が避けられないので、このような実験を行うときは、ペトリ皿はアルミホイルで遮へいする方もしない方もすべてポリエチレン製の蓋のついた気密なポリプ

ロピレン製のタッパーウェア (直径 120 mm, 高さ 80 mm, 厚さ 2 mm) 中に 90×15 mm の標準型のペトリ皿 1 個, または 60×15 mm の小形ペトリ皿 2 個をペトリ皿の蓋を上にしておき、覆いを閉じて気密にした。遮へい実験の場合はさらにタッパーウェアの外部を厚さ 15 μ m のアルミホイルで 2 重に覆った。この上からどの場合もポリ塩化ビニリデンの薄膜 (10 μ m) で覆って試料室の気密性をできるだけ同じになるように努めた。代表的な実験例における試料の配置を Fig. 2 に上面からの鳥瞰図で示す。

鉄板を越えた *B. subtilis* の音響シグナルを好炭素バチルス菌 *B. carboniphilus* に作用させる実験: 実験法はほぼ前報⁽¹⁾ に記したとおりであるが、変更点は Fig. 3 と Table III の説明に書き加える。

コロニー形成率の算出法: *B. carboniphilus* 菌が寒天培地上で毎回確実に 100% のコロニー形成を行う培養条件はまだ得られていないが、0.25% のグラファイト粉末 (Graphite B または C)^{(1),(6)} を含む Trypticase Soy Broth (Baltimore Biological Laboratories, Becton & Dickinson, Baltimore, MD, U.S.A) を 1.5% の寒天で固化したものの表面にまいて 37°C で

Fig. 3. Construction of the Experimental System for Measuring Transmission of Sonic Signals from Cells of *B. subtilis* to Those of *B. carboniphilus* through a Barrier of 1 mm-Thick Iron Plate.

For details of experiments, see the legend to Table III and Materials and Methods. For the placement of Petri dishes containing sonic signal donor cells at the top of the lower polyacrylic box see refs. (1, 10).

培養したとき、比較的安定した高いコロニー形成率を与えたので、現在のところ一応この条件でコロニー形成率 100% と仮定して生菌数 (viable counts) を計数し、これを分母として他の条件におけるコロニー形成率 (%) を算出した。

実験結果

固形寒天培地上静置培養と回転台上のゆっくりした回転培養のバックグラウンド値の比較: Table I は 1.5% 寒天で固形化した 1% KCl を加えた 2 倍希釈ペナッセイ培地に *B. carboniphilus* 菌をまき、これを「本来致死的条件」よりやや緩い 43°C に設定した培養器中の棚上に静置したもの (A) と、他の同様に調整した培養器中の回転台上で 1 分に 2 回転させたもの (B) を比較して示したものである。実験は 6 個の同条件のペトリ皿を同一の棚 (A) または同一の回転台 (B) 上におき、6 つの実験結果をすべて記載してその平均値と標準偏差とをだした。棚上の静置実験 (A) の条件は高い KCl 濃度における本来致死に近いストレス条件であったにもかかわらず、今回の実験結果のように往々にしてコロニー形成率が高く出ることがあり、し

かもペトリ皿ごとのその揺らぎも大きいのが特徴であった。しかしこれに反して回転台上の実験 (B) の結果はコロニー形成率はるかに低く一応本来致死的条件にあてはまり、しかもその揺らぎも少なく、値がそろっているのがわかる。6 つずつのペトリ皿の実験結果の平均値と標準偏差を下に示してある。この A, B の実験は系の中に特に音響ドナーが入っていないので、いままでの細胞⁽¹⁾ やスピーカ⁽³⁾、またはグラファイトなどの無生物物質^(2, 4) の声を聞かせる実験のゼロコントロール実験に相当するが (A)、このように大きな、しかも変動しやすいゼロコントロール値 (バックグラウンド値) が時折生ずることがあったので、信頼性のある実験結果を得るために実験を注意深く、しかもペトリ皿の位置を交換しながら極めて多数回行わなければならなかった。ペトリ皿を回転台上で回転させた実験 (B) ではこの値もその揺らぎもずっと小さかったので、回転台の導入がいかに標準的な実験法の確立に寄与したかがわかる。

この実験結果のもう一つの特徴は、実験系 (ペトリ皿とそれを覆うタッパーウェア) をアルミホイルで覆うことによってバックグラウンド値 (A, B) が著しく

Table I. Effects of the Use of a Turntable to Stabilize Colony-formation in the Absence of Sound Emitters but under High KCl Stress^a

Position number of Petri dishes	(A) Stationary		(B) Turning on a turntable	
	Shield		Shield	
	None	Al-Foil	None	Al-Foil
	(%)	(%)	(%)	(%)
1, 3	99.75	47.23	5.50	0.02
2, 4	66.11	38.63	5.37	0.11
5, 7	50.19	29.76	5.67	0.01
6, 8	36.82	53.58	5.72	0.30
9, 11	77.48	53.96	5.59	0.10
10, 12	69.03	42.31	5.46	0.03
Average of six experiments	66.56	44.25	5.55	0.10
Standard deviation	13.31	6.30	0.09	0.06

^a Bacteria used: *B. carboniphilus* strain Kasumi 6, 1.3×10^4 spores per plate. Culture plates contained 2-fold diluted Bacto Penassay Broth, 1% KCl and 1.5% agar. Incubation was carried out at 43°C in two electrically thermoregulated EYELA SLI-600ND incubators for 40 h under continuous ventilation with a small electric fan. Turntable was rotated clockwise at 2 rpm (B). Experiments without a turntable (A) were run with the Petri dishes located similarly to those on the turntable. Numbers in % indicate colony-forming efficiencies. For the position numbers of Petri dishes see Fig. 2.

低下したことであるが、特に回転台上でペトリ皿を回転させた場合はその値はほとんどすべてがゼロ近くになったことである (Table I(B)). さらにこのようにペトリ皿を回転台の上に乗せ、適宜アルミ遮へいを行うと、KCl ストレスを下げても結構低いバックグラウンド値が得られることがわかった (Table II(B)). このような低い KCl ストレス下では、回転台に乗せないと高くしかも変動の多い値が得られるものであるが (Table II(A)) 回転台に乗せると 6 例中 2 例ずつが特別に低い値を与えたのを除けば (Table II(B), ペトリ皿番号 9, 10, 3, 4) 他の計数値は互いに一応よく一致していた。なぜ回転台に乗せることによって KCl ストレスを下げてもバックグラウンド値が下がるようになったのかは検討を要する。

Table II. Effects of the Use of a Turntable to Stabilize Colony-formation in the Absence of Sound Emitters but under Low KCl Stress^a

Position number of Petri dishes	(A) Stationary		(B) Turning on a turntable	
	Shield		Shield	
	None	Al-Foil	None	Al-Foil
	(%)	(%)	(%)	(%)
1, 3	40.83	47.41	4.02	1.94
2, 4	71.59	39.51	3.40	1.53
5, 7	57.60	58.28	3.95	2.83
6, 8	9.00	59.50	4.63	2.50
9, 11	99.63	24.30	1.23	3.10
10, 12	49.78	32.55	1.12	2.12
Average of six experiments	54.74	43.59	3.06	2.34
Standard deviation	18.46	9.83	1.08	0.41

^a Bacteria used: *B. carboniphilus* strain Kasumi 6, 1.3×10^4 spores per plate. Culture plates contained 2-fold diluted Bacto Penassay Broth and 1.5% agar. Incubation was carried out at 43°C in two electrically thermoregulated EYELA SLI-600ND incubators for 63 h under continuous ventilation with a small electric fan. Turntable was rotated clockwise at 2 rpm (B). Stationary experiments without a turntable (A) were run with the Petri dishes similarly located to those on the turntable. Numbers in % indicate colony-forming efficiencies. For the position numbers of Petri dishes see Fig. 2.

回転台を用いた *B. subtilis* から *B. carboniphilus* への音波シグナル伝達実験: いままで *B. subtilis* から *B. carboniphilus* への厚さ 1 mm の鉄板を越えての (音波) シグナル伝達の測定をする上で最も困難であったのは実験系に *B. subtilis* を入れないゼロコントロール実験の値をいつもゼロにすることであった。このゼロコントロール値の不安定なことは特に 2 個のアクリル円筒箱をそれぞれ音響シグナルドナー細胞と応答側の細胞に 1 個ずつ用いた場合、それら 2 個の開口部で重ね合わせたために共鳴が高まり、よけい雑音の影響を受けやすくなったせいと思われる。よって過去の実験⁽¹⁾では、厳密を要する場合シグナルドナー側にはアクリル円筒箱を用いないで、シグナル応答者の方のみをアクリル円筒箱で覆うことにより、得られる値の大きさを大きくするよりは結果の再現性を優先さ

Table III. Transmission of Growth-promoting Sonic Signals through a 1 mm-Thick Iron Plate on a Turntable^a

Experiment	Medium	Temperature	Time	Donor <i>B. subtilis</i>	
				+	-
				(%)	(%)
1	2 × diluted Penassay broth + 1% KCl	44°C	3 d	0.36(°)	—
				0.19(*)	0.00(*)
2	2 × diluted Penassay broth	43°C	2 d	1.28(*)	0.00(*)
3	2 × diluted Penassay broth	42°C	2 d	1.96(*)	0.40(*)
4	2 × diluted Penassay broth + 1% KCl	42°C	2 d	0.75(*)	1.09(*)

^a Construction of the experimental system was as shown in Fig. 3.

[#] Petri dishes containing sonic emitter cells (sonic signal donor cells) were placed at the top of the lower polyacrylic box.

* Petri dishes with or without sonic emitter cells were placed at the bottom of the lower polyacrylic box as shown in Fig. 3.

せた。しかしターンテーブルを用いた新しい方法（ペトリ皿の配置法は Fig. 3 のとおり）によって、この種類の実験も大いに容易になった。すなわち、コントロール値はゼロに近く（Table III, 実験 1, 2）、実験の再現性も大いに上昇した。この実験は前の Table I と II の実験より大きな空間を要するので今回その統計学的処理を行えるほど多数の実験は行ってはいないが、KCl ストレスを下げて回転台の上でまわすことによってゼロコントロール値が下がり、実験に定量性と再現性が格段に増加したことを種々の実験条件を用いて示した。また KCl ストレスを下げたときは温度ストレスを同時に下げても *B. subtilis* 細胞の存在しないゼロコントロール値は低いままであったが（実験 3）、1% KCl を加えて KCl ストレスを高くしておいて温度を 42°C に下げたときはゼロコントロール値が *B. subtilis* 細胞を含む完全系と同じくらい高くなった。この現象の説明もまだされていない。

考 察

本研究の実験結果は細菌培養系を緩やかに回転させることが以下のように顕著な実験条件の水準化をもたらすことを示した。その結果、より信頼性の高い実験結果が得られるようになったが、そのことは同時に、実験系に入射される外部エネルギーのあり方について多くの示唆を与えた。

いま、1.5% の寒天を含む栄養培地に好炭素バチルス菌 *B. carboniphilus* をまいたペトリ皿を培養器中に

静置すると、「本来致死の」に近い KCl ストレス下でも、往々にしてかなりのコロニー形成が見られることがあり、しかもその現象の再現性は高いとはいえなかった。しかし同様な実験を回転台を用いて 1 分間 2 回転ほど回転させながら培養すると、この値が常にゼロに近くなることがわかった。しかも実験に用いたペトリ皿をアルミホイルで包んで外界の電磁波などのエネルギーから遮断すると、回転台の上で回転させたときのみ安定した低い値（「本来致死の条件」にふさわしい低いバックグラウンド値）をもたらししたが、回転させなかった場合はアルミニウム遮へいでコロニー形成率が低まるとはいえ、その低下は部分的で、ゼロに近い値にまでは下がらなかった。

何ゆえに培養系を回転台に乗せて回転させることにこのような効果があるかは全く空想の域を出ないが、もし想像されるいくつかの説明の一つとして記述することが許されるならば、次のように考えることができる。すなわち、われわれの実験空間は赤外線のパルスなどの音波シグナルの発生源に満ちているのではないか^(2, 4)。そしてこの場合、それらの波動は実験系内に空間的に均一に投射されていないと考える方が自然であろう。それゆえに数センチから数十センチでも異なる位置におかれた光音響転換物質⁽⁸⁾が（ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、寒天その他、ダイヤモンドや水晶を除くほとんどすべての物質が大なり小なり光音響転換物質となりうると考えられる）それぞれ位置的にも時間的にも異なる強さと頻度の赤外線

パルスなどの外部エネルギーの照射を受けるであろう。だから回転台の上で回転させることによって各実験系の受ける外部エネルギー照射を均一化できると考えてもよからう。このことは Table I(B) や II(B) のように回転台の上に乗せた多数の試料のコロニー形成率が均一化することをおおむね無理なく理解させる。なお恒温器内には小さな電動ファンを設置して空気が絶え間なく環流するようにしているので、恒温器内部の温度むらがターンテーブルの導入によって解消されるためではないことが明らかである。

しかしこれだけで理解できないのは、なぜ回転させるとコロニー形成率が均一化されるだけでなくその平均の大きさが回転させない静置培養の数分の一 (Table I) から数十分の一 (Table II) に減少するのか、ということである。これを説明するにはやや大胆な作業仮説を立てなければならぬであろう。すなわち、音響シグナルに応答する細胞はある一定時間シグナルを受け続けていることが必要と考えてみる。もしシグナルが途絶えれば「本来致死的な条件下」ではその細胞は死んでしまうとする。ところが実験空間内の外部エネルギーの投射はまだらになっているであろうから、回転台に乗せてまわすと、すべての音響シグナル応答側の環境が外部エネルギー投射を1分間に少なくとも何回か受けたり受けるのをやめたりして、その結果音響シグナルとその受容も断続する。これは応答する菌体の増殖に有利でないと考えれば、回転台に乗せてまわした試料のコロニー形成率が著しく減少するのも理解が可能であるようにみえる。以上の理論は今のところ全く空想の域をでないで、今後何らかの科学的方法で証明する必要があるのはもちろんである。

では次に、特に光音響転換物質を入れていないいわばゼロコントロール実験によるバックグラウンド値の測定ばかりでなく、実際に2枚のペトリ皿を重ね合わせた炭素粉末の遠隔効果の測定^(2,9)の場合にはどうなるのであろうか、ということが疑問になる。しかし炭素粉末の *B. carboniphilus* に対する遠隔効果は上記の文献 (2, 9) にあるように相当に強力であって、好運にもいまだ特に回転させないで静置した実験でも一応、バックグラウンドのばらつきを実験誤差内に収める十分説得力のある結果を繰り返し得ることができた。この実験に回転台を加えることは炭素粉末に入射する外部エネルギーを不連続にすることになるのでそ

の結果の解析はやや複雑になるであろうから、今回は行わないで、また別の機会に検討することにした。代わりに外部エネルギーを必要としない、細胞内部のエネルギーを用いて音響シグナルの発信を行っていると考えられる、*B. subtilis* の細胞 (音響シグナルドナー細胞) から *B. carboniphilus* の細胞 (音響シグナル応答側の細胞) へのシグナル伝達を回転台を用いて試みてみたのを Table III に示した。応答側細胞の「本来致死的な条件下」(1% KCl 添加, 44°C) では明らかに音響シグナルドナー細胞のあることによるコロニー形成率の増大がみられ、しかも予期したとおりシグナルドナー細胞の存在しないコントロール実験の値はゼロであって、文献 (1) の実験結果を確認する結果が得られた。しかし回転台に乗せることにより、静置実験では本来致死的でなかった、低い温度 (42~43°C) と低い塩濃度 (1% KCl を加えていない) を組み合わせた場合にもシグナルドナー細胞のないときはほぼ致死的になり、シグナルドナー細胞があるときには増殖 (または生存) 保護効果が現れているのは予期しなかったことであった。その機構も今後解明されなければならないことの一つである。低い温度 (42°C) と高い塩濃度 (1% KCl 添加) ではかえってシグナルドナー細胞の効果が現れず、コントロール値も増加しているのは今のところ全く説明できていない。

このように、回転台を用いて実験系をゆっくり回転させることにより、明らかに実験空間内の電磁波などのエネルギーの作用を均一化して細胞の音響応答実験を標準化することに成功した。しかしそれに伴ってなおいくつかのまだ説明できない現象が見つかり、自然界の法則とその実施の実状に、われわれの知らないところがまだ多くあることを感ぜさせられるしだいである。なおこの実験系を確立したことによってその後わかってきたいくつかの新しい現象とその機構については数回の学会発表で公にしているが、引き続き論文で発表していきたい。

要 約

われわれの環境は赤外線など数多くの波動やその断続波に満ちていて、それらの投射がさまざまな周波数や波形の異なる音響を産生していることは間違いない。細菌などの細胞はこれらの音響シグナルを摂受して自己の増殖の制御—促進と阻害—に利用していると

考えられる。細胞のこのような働きを測定するために、外部から実験系に入ってくる波動エネルギーなどの要因を遮断するか、少なくとも均一化することが大切である。本研究も小型のファンで空気を絶え間なくかくはんした恒温器内で1分間に2回転ぐらい回転する回転台を用いることによりほぼその目的を達成し、実験のゼロコントロール値(バックグラウンド値)を均一にすることができたが、同時に思いがけないことに、静置したものに比べてバックグラウンド値の大幅な低下がみられた。このような現象に対する解釈の一部は考察に述べられるが、今後の実験的解析によって証明していきたい。

謝 辞 本研究はサントリー(株)基礎研究所、三島海雲記念財団、サウンド技術振興財団、文部省科学研究費特定研究カーボンアロイ、NEDO 地域コンソーシアムの研究費の援助を受けて行われた。厚く感謝したい。

- (1) M. Matsuhashi, A. N. Pankrushina, K. Endoh, H. Watanabe, H. Ohshima, M. Tobi, S. Endo, Y. Mano, M. Hyodo, T. Kaneko, S. Otani, and S. Yoshimura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **42**, 315-323 (1996).
- (2) M. Matsuhashi, K. Endoh, A. N. Pankrushina, H. Watanabe, H. Yamamura, M. Komiyama, S. Endo, M. Tobi, H. Ohshima, Y. Mano, M. Hyodo, T. Kaneko, and S. Otani: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 225-230 (1997).
- (3) M. Matsuhashi, A. N. Pankrushina, S. Takeuchi, H. Ohshima, H. Miyoi, K. Endoh, K. Murayama, H. Watanabe, S. Endo, M. Tobi, Y. Mano, M. Hyodo, T. Kobayashi, T. Kaneko, S. Otani, S. Yoshimura, A. Harata, and T. Sawada: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 49-55 (1998).
- (4) M. Matsuhashi, S. Takeuchi, A. N. Pankrushina, K. Endoh, H. Watanabe, S. Endo, N. Hiraoka, M. Tobi, H. Ohshima, H. Miyoi, K. Murayama, H. Yamamura, T. Kaneko, and S. Otani: in "Supercarbon," ed. by S. Yoshimura and R. P. H. Chang, Springer, 1998, pp. 227-233.
- (5) M. Matsuhashi, K. Endoh, H. Ohshima, H. Yamamura, S. Endo, S. Takeuchi, S. Takayanagi, A. N. Pankrushina, T. Kaneko, S. Otani, and S. Yoshimura: Extended Abstracts of the International Symposium on Carbon- Science and Technology for New Carbons, Tokyo, 1998, Nov. 8-12, pp. 156-157.
- (6) M. Matsuhashi, A. N. Pankrushina, K. Endoh, H. Watanabe, Y. Mano, M. Hyodo, T. Fujita, K. Kunugita, T. Kaneko, and S. Otani: *J. Bacteriol.*, **177**, 688-693 (1995).
- (7) T. Fujita, O. Shida, H. Takagi, K. Kunugita, A. N. Pankrushina, and M. Matsuhashi: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 116-118 (1996).
- (8) A. G. Bell: *Am. J. Sci. Arts, Ser. 3*, **20**, 305-324 (1880).
- (9) M. Matsuhashi and K. Endoh: *TANSO* (Tokyo, in Japanese but Figure/Table Legends in English), **184**, 213-218 (1998).
- (10) 松橋通生, A. N. Pankrushina, 遠藤 桂, 渡辺 寛, バイオサイエンスとインダストリー (*Bioscience and Bioindustry, Tokyo*), **55**, 9-10 (1997).