

緑膿菌型別用ファージの基礎的研究

—増殖用菌株の溶原性とファージ抵抗性変異株のファージ感受性—

林 敏 明

長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門

Fundamental Studies on the Bacteriophages for Typing *Pseudomonas aeruginosa* and Their Propagating Strains

Toshiaki HAYASHI (Department of Bacteriology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract: Using the bacteriophages and their propagating strains shown in Table 1, lysogenicities of the strains, sensitivities of the strains to the phages and sensitivities of phage resistant mutants to the phages were tested to clarify specificities of the phages. Growth inhibition of the strains with low reproducibilities were observed by spotting the culture filtrates of the strains (Table 2). Applying plaque assay method, lysogenicities were found in 20 combinations (Table 3). Differences between two methods may be caused by different induction rates by the time and also by pyocine activities when undiluted filtrates were spotted. From these results, it can be said that there is no misreading caused by lysogenic phages in the stocks of typing phages when $1-3 \times 10^6$ PFU/ml solutions were applied. In addition, frequent host-induced modifications were observed among lysogenic phages originated from the same culture filtrate grown on different hosts (Table 4). Sensitivities of the propagating strains to typing phages were shown in Tables 5 and 6. The same host range between the two phages was not seen in each method except between phages 44 and 1214 in the method of spotting 10^9 PFU/ml. This result shows specificity of each phage, and possibility to select two out of four non-lysogenic strains for propagating 12 phages. Forty-nine kinds of phage resistant mutants were isolated from 11 strains except GN3405, and a total of 410 mutants were tested for sensitivity to the phages (Table 7-13). Thirteen cases gained the sensitivity to originally insensitive phages and 16 cases lost the sensitivities to all phages in almost all strains. Six kinds of phage 119X resistant mutants originally not sensitive to phage 21 retained the sensitivities to the other phages and two kinds lost also sensitivity to phage 21, but there was no phage 21 resistant mutant isolated. This result indicates that phage 119X is specific to the other phages but there is some relation between phages 119X and 21. Table 14 summarised cross-resistances between two kinds of phage resistant mutants. Cross-resistance was

Received for publication, September 10, 1981

本研究の一部は九州微生物研究会からの研究費によって行われた。
長崎大学熱帯医学研究所業績, 第1,109号

always observed between phages 7 and 352, 7 and M4, M4 and E79, 1214 and M4, E79 and M4, and M4 and C11, whereas no cross-resistances were found between 7 and 1214 or F8, 352 and 44, 1214, F8, E79 or C11, F8 and M4, 21 and C188, 119X and eight kinds of phages. Finally, the similarity indexes of the lytic spectra of two phages on 410 mutants show the correlation between phages 7 and 352, 44 and 1214, F8 and E79 which support the typing method of Sakamoto *et al.* (1977) and between 44 and F8, 44 and E79, 1214 and E79, M4 and C11 (Table 15).

Tropical Medicine, 23(3), 119-133, September, 1981

緒 言

緑膿菌の型別法としては血清型別法, フェージ型別法, プロフェージ型別法, 2種のピオシン型別法, 化学的型別法があることは, Sakamoto *et al.* (1975) がそれぞれにつき文献を掲げて述べている通りである. 一方これとは別に本間 (1975) が血清型別法, 内藤 (1975) がフェージ型別法とピオシン型別法についての概説を行っている. これらのうち血清型別法のみは Homma *et al.* (1971) によって完成されたものである.

ピオシン型別法のうち, 特定の指示菌セットに対するバクテリオシン原性を利用した型別法に関しては, 当部門の内藤およびその関係者が基礎的検討と型別, さらに血清型別との併用を行ってきた. その経過に関しては最近の成果を発表した仲宗根 (1980) がその緒言でふれている.

一方フェージ型別法に関しては上記 Sakamoto *et al.* (1975) が引用した以降の進展はみられていないといえる. わが国においては, それまでにこの方面の研究報告はなく, 東京大学医科学研究所本間遜教授のもとで Dr. Sjöberg より入手の型別用フェージとそれぞれの増殖用菌株が保存されていた. これが醸酵研究所飯島貞二所長のもとへ移管され, 他由来の2種を加えた21種のフェージを用いて検討が加えられた (Sakamoto *et al.*, 1975). それでは707株に対する各フェージの感受性試験結果より得た similarity index を基礎に, 作用域の狭い4種を除外した17フェージを3, 3, 3, 2, 2, 2, 1, 1種の8群にわけ, I-III群による型別(A-H型)と各型をIV-VIII群により32亜型に分ける方法を提唱している. また指示菌9株を用いたプロフェージ型別法に対する言及もある. さらに氏らは手技

の簡易さからフェージ型別法について検討を進め, 上記I-III群を2種ずつに減じての型別, V群とVI群より1種を残しVII群を加えた3フェージによる亜型, 残るIV群のうちの1種とVIII群(1種)に新規分離の1フェージを加えた3種による Suffix を利用した型別コードを提唱するに至った (Sakamoto *et al.*, 1977).

当部門においてはピオシン型と対比させてのフェージ型の検討を企画して, 上記12種の型別用フェージとそれぞれの増殖用菌株の分与を受けたのであるが, 型別への利用に先立って一部基礎的検討を進めつつある. 本論文においては, 増殖用菌株の溶原性試験の結果と増殖用菌株由来のフェージ抵抗性変異株の各フェージに対する感受性試験成績について記述する.

材料と方法

菌株とフェージ

本研究に使用したフェージと各フェージに対応する増殖用菌株は表1に示した. 緒言で述べたように, これらの株は醸酵研究所飯島貞二所長の御好意により分与されたものである. これらは, E79がHollowayの研究室, ϕ S-5が醸酵研究所で分離されたものであるのを除き, 残る10フェージとその増殖用菌株はSjöberg & Lindberg (1968) が使用しているものである (Sakamoto *et al.*, 1977).

使用培地と緩衝食塩水

Sakamoto *et al.* (1975, 1977) の記載に従って, ポリペプトン (大五栄養), 酵母エキス (大五栄養), 塩化ナトリウムをそれぞれ1, 0.3, 0.2%の割合に精製水に溶解, pH 7.2としたものを基礎とし

Table 1. Strains used in this experiment

Propagating strain		Phage	
IFO No.	Symbol	IFO No.	Symbol
13739	7	20036	7
13740	352	20037	352
13741	44	20038	44
13742	1214	20039	1214
13743	F8	20040	F8
13744	M88	20041	E79
13745	M4	20042	M4
13746	C11	20043	C11
13747	21	20044	21
13748	C188	20045	C188
13749	119X	20046	119X
13750	G N3405	20047	φS-5

IFO: The Institute for Fermentation, Osaka.
All strains were kindly supplied by IFO.

た。液体培地（以下ブイヨン）として使用する場合、塩野谷・本間（1968）の la 型保持のため、硝酸カリウムを0.4%の割に加えた。固型培地および重層用軟寒天は上記基礎培地に寒天末（和光）をそれぞれ1.5%、0.8%加えたものを用いた。

ファージ原液の調製またはその希釈に用いた緩衝食塩水は、Yamamoto and Naito (1965) と同じく、1/15Mリン酸緩衝液に塩化ナトリウムを0.1M、硫酸マグネシウムを1mM の割で添加したものである。

ファージの増殖またはブラック算定

12種の型別用ファージは表1で対応させた増殖用菌株を用いて以下のようにして増殖を行った。増殖用菌株のブイヨン37°C 1夜培養を小試験管に0.1ml宛分注、これにファージ原液よりの10進希釈液列の0.25ml ずつを加え、37°C の温浴中に5-10分間置き、ついで各試験管に2.5ml の軟寒天を加えて混和、寒天平板上に重層した。37°C 1夜培養後溶菌状況を観察し、semiconfluent lysis を認めた平板またはその1段階高濃度の希釈液を用いた平板を選定、それぞれの軟寒天層をコンラージ棒で遠心管へかきとり、緩衝食塩水3.5mlを加えて室温約1時間置き、その3,000rpm、20分遠心上清を0.45μ のミリポアフィルターで濾過した。これらのファージ原液は5°C に保存した。

上記溶菌状況観察に際して、適当数のブラックを認めた平板についてはブラック数を数え、分与を受けたファージの力価を知った。新たに得たファージ原液についても上記に準じてブラック数算定を行った。

ファージ抵抗性変異株の分離

各増殖用菌株につき後出の表6を参考に感受性を示すファージに対する抵抗性変異株の分離を以下の方法で行った。その増殖用菌株に対して10⁹PFU/mlに相当するファージ希釈液（多くの場合原液の100倍）およびその10進希釈液列の0.25ml を、該当する菌株のブイヨン1夜培養の0.1ml と混じり、37°C 5-10分後、軟寒天2.5ml とともに寒天平板に重層、37°C に培養した。1夜後完全溶菌を示ししかもその中に集落形成を認めた寒天平板を選び、個々の集落をそれぞれトリプトソイ寒天平板に分離培養した。翌日分離塗抹の先端に近く孤立した1集落を選び、寒天平板の4カ所に穿刺、37°C 4-6時間培養後その上に親株の1夜ブイヨン培養0.1ml を軟寒天2.5ml で重層した。37°C 1夜培養後、穿刺部に発育した菌苔に一致しての溶菌またはブラック形成を認めた場合は溶原化株としてこれを除外、無変化であったものに該当するトリプトソイ平板上の残存集落を保存に移した。この際、それよりのブイヨン培養0.1ml を軟寒天で重層した平板上に該当ファージの高濃度液を滴下して抵抗性獲得の確認も行った。さらにNAC寒天にも移植して、それへの発育により緑膿菌であることを確認するとともに、産生色素を記録した。

目的とする親株に対して完全溶菌が認められなかった組合せについては、その組合せで増殖を行って得た高力価のファージ液を利用して上記と同様に行った。

以上によって分離不能の場合、武部（1972）の記載を参考に、目的とする親株を100mcg/ml に N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを含む0.1M クエン酸ソーダ緩衝液（pH6.0）で30分処理したもののブイヨン1夜培養液を用いて同様に実施した。

ファージ液の滴下法

被験菌株を軟寒天で重層した多数の寒天平板上に、各ファージを一定濃度に希釈したものをまたは特

定フェージの10進希釈液列を滴下する場合は同時に20試料を扱い得る多試料滴下装置を使用した。本装置は Sakamoto *et al.* (1975, 1977) に記載されているように醗酵研究所坂本博士の考案になるもので、同研究所の御厚意により当部門としても入手できたものである。なお本装置にツベルクリン用注射針26Gを使用した場合の1滴は0.01mlである。

実験と結果

滴下法による増殖用菌株の溶原性試験

増殖用菌株12株をブイオンに37°C 16-18時間培養、その大部分の4,000rpm 20分遠心上清を0.45 μのミリポアフィルターで濾過して得た液につき試験した。一方上記で少量残した各ブイオン培養の0.1 mlを2.5mlの軟寒天で重層した寒天平板を作成、それぞれの上に上記各濾液そのものを0.1mlのピペ

ットを用いて1滴ずつ滴下、37°C 1夜培養後滴下部に一致しての菌発育阻止またはブラック形成を観察した。この交差試験は新たに調製した濾液を用いて4回行い、その全成績を表2に示した。

144組合せのうち第1回に26組、第2回17組、第3回33組、第4回40組に菌発育阻止またはブラック形成が認められたとの結果であって、その現象発現は一定でない場合が多かった。これを何れかの指示菌に対する現象発現としてみると、菌株44と21の濾液では毎回、1214, C11, C188, GN3405の4濾液が3回、7, M88, 119Xの3濾液で2回、352, F8, M4の濾液が1回となる。

ブラック法による増殖用菌株の溶原性試験

前項と同様にして作製した増殖用菌株12株の濾液およびそれぞれの10進希釈液列の0.25mlを、交差的に各増殖用菌株のブイオン培養0.1mlとともに

Table 2. Lysogenicity among the propagating strains by spot method

Indicator strain	Culture filtrate											
	7	352	44	1214	F8	M88	M4	C11	21	C188	119X	GN3405
7			-- -+									-- ++
352	-+ -+		-- ++	+ --		-- +-		-- ++	+ --		+ --	+ --
44	-+ --								+ -+			-- +-
1214	-+ -+		-- -+						+ -+			-- +-
F8	-+ --		++ ++	+ --		-- +-	-- -+	+ ++	++ ++	-+ ++	-- +-	+ ++
M88	-+ -+		++ ++	+ ++						-- ++		-- ++
M4	-- -+		++ ++	+ -+	+ --	-- +-			+ --		-- +-	+ +-
C11		-- --				-- +-			+ ++			+ +-
21	-+ -+		+ ++					-+ -+		-- -+		-- +-
C188	-+ -+		-- -+	+ --		-- -+			-- -+		-- -+	
119X	-+ -+		+ ++	+ --		-- ++	-- -+	-+ -+	+ ++	-- -+		+ ++
GN3405	-+ -+											

Checker-board experiments were repeated four times using newly prepared filtrates.

Results were arranged as ^{Exp. 1, Exp. 2} and blanks mean no reaction at all.
Exp. 3, Exp. 4

37 °C 5-10分保った後軟寒天2.5 ml で寒天平板に重層, 1夜37 °C に培養後菌発育阻止を観察するとともにブラック数を算定した. 毎回新規に調製した濾液を用いて3回ずつ実施した結果を表3にまとめた.

144組合せのうち20組に溶原ファージが検出され, 表中に*印を付した4組では3回目にブラック形成が認められなかった. これら4組を除く組合せについて最高値と最低値の開きをみると3.7-0.5の間にあり, 3.0以上が5組, 2.0-2.9が3組, 1.9-1.0が4組, 1.0以下が4組となる. 菌株44の濾液は自己を除く11株中6株にブラック形成を示して最も溶菌域が広く, 5株に作用したGN3405の濾液がこれに次ぎ, C11, 21, C188の3濾液は2株に, 7, 1214の2濾液は1株にブラックを形成し, 残る352, F8, M88, 119Xの4株には溶原性が認められな

かった.

溶原ファージの作用域

表3に示した各組合せについて, それぞれ対応する菌株を指示菌としてブラックを純化後増殖を行い, 可及的に高力価のファージ液 ($3.2 \times 10^7 - 2.6 \times 10^{11}$ PFU/ml) を得た. これらのファージ液とその10進希釈液列の1滴を, 各増殖用菌株のブイヨン培養0.1mlを軟寒天で重層した寒天平板上に滴下, 1夜培養後溶菌像を観察記録した. 滴下部に一致して完全溶菌を示した最高希釈倍数を示したのが表4である.

ファージAは濾液の場合と同じく菌株M4のみが感受性を示した. ファージB-Gはいずれも濾液44に由来したブラックを, それぞれに感受性であった6種の株で純化増殖したものがあるが, それらの宿

Table 3. Lysogenicity among the propagating strains by plaque count method

Indicator strain	Culture filtrate												
	7	352	44	1214	F8	M88	M4	C11	21	C188	119X	GN3405	
7													
352													
44													
1214			1.0* 2.6	B								3.1* 7.6	R
F8			3.3 6.4	C			1.7 2.4	K	1.9* 3.2	L	2.6 6.2	N	
M88			5.3 5.8	D	4.5 5.3	H					3.5 5.6	P	2.7 3.8
M4	1.9 5.3	A	3.8 4.5	E									3.8 5.1
C11													1.0* 5.1
21			4.7 5.7	F									
C188													
119X			2.9 4.1	G					2.1 5.3	M	2.9 5.6	O	4.0 7.7
GN3405													3.3 5.3

Checker-board experiments were repeated three times using newly prepared filtrates.

Numbers indicate $\frac{\text{minimal}}{\text{maximal}}$ titers in $\log_{10}N/\text{ml}$ and blanks mean no plaque formation.

* : No plaque formation in Exp. 3. A-V are related to the next table.

Table 4. Host range of lysogenic phages among the propagating strains

Indicator strain	Lysogenic phage																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
7	*																			
352		2		2		2														
44		*	*	*	*	*	*													
1214		4		4				*								4				
F8		5	6	6	4	5	6		3	5		5							4	
M88		4	3	7	3	6	4	6						5			4			
M4	4	4	3	4	6		2		*							4	4	6	2	4
C11		2		2						*	*									4
21		2	3	4	3	6		2					*	*						
C188			3	4										*	*					
119X		2		3		2	6			2	3	4	3		3	3		2		5
GN3405				2													*	*	*	*

A-V were mentioned in Table 3 and RTD of these stocks propagated from each combination were shown by Gothic number. Number indicates RTD for each combination in $-\log_{10}N$ and * shows the immune relation between them.

主域は、菌株 F 8, M88がすべてに感受性, 7, 44が非感受性であったのを除いては、すべて異なっており、濾液の場合非感受性であった352, C11, C188, GN3405に感受性を認める場合があった。ファージHはその増殖用菌株M88のみではなく21が感受性を示した。ファージKはM4の濾液と同じく菌株F8のみが感受性であった。ファージLとM, NとO, PとQはそれぞれ濾液C11, 21, C188に由来し感受性を示した各2種の株で増殖したものであるが、LとNは濾液と同じ宿主域を示したが、M, O, P, Qの4ファージに対しては増殖株のみが感受性を示した。残るファージR-Vは濾液GN3405由来で5株の感受性株で増殖したものであるが、宿主域は、濾液には感受性を示さなかったF8を加えた6株のうちそれぞれ3, 2, 3, 2, 2株が感受性を示し、菌株M4は5ファージに感受性であったものの、他はすべて異なっていた。

増殖用菌株の型別用ファージに対する感受性試験 (滴下法)

分与を受けた12種の型別用ファージについては、変異ファージの株化を避けるため、ブラック純化を行わず直接対応する増殖用菌株上で増殖を行った。その結果119Xが 6.1×10^9 PFU/mlであったほかは

$1.6 \times 10^{10} - 5.1 \times 10^{11}$ PFU/mlのファージ原液を得、これを以下の実験に使用した。これらの原液から調製した 10^6 PFU/mlに相当する希釈液1滴を、各増殖用菌株のブイヨン培養0.1mlを軟寒天とともに重層した寒天平板上に滴下、1夜培養後の指示菌発育阻止状況またはブラック形成を記録した。日を替えて行った 10^9 PFU/ml相当液の滴下実験成績と同時に示したのが表5である。

高濃度ファージ液を滴下した結果では、菌株7とM4は全ファージに感受性を示し、F8と119Xは11種のファージに、352, M88, C11, 21は10種、44と1214は6種、C188とGN3405は3種のファージに感受性であった。しかしこれを多くのファージにとってファージ型別時に使用する1RTD液に相当するとみなされる 10^6 PFU/ml液を滴下した場合でみると、全ファージに感受性の株はなく、菌株M4が11種、F8は10種、C11と119Xで9種、352, M88, 21の3株がそれぞれ8種、7が6種、44と1214は4種、GN3405のみは変化なく3種、C188は1種のファージに感受性となった。両成績の間で最も差があったのは6種のファージへの感受性が認められなくなった菌株7であって、既に指摘したGN3405をも除外した10株では1ファージへの感受性がみられなくなったF8, M4, C11の3菌株を

Table 5. Sensitivity of the propagating strains to typing phages by spot method

Indicator strain	Typing phage											
	7	352	44	1214	F8	E79	M4	C11	21	C188	119X	ϕ S-5
7	2/3	2/2	/3	/1	/1	/1	3/3	2/3	1/3	/2	2/3	/2
352	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	/1	3/3	/1	3/3		
44			3/3	3/3	/1	/1			1/3		1/3	
1214		/1	2/3	3/3	/2	2/3			2/3			
F8	/2	1/3	1/3	1/3	3/3	3/3	2/3	3/3	1/2	1/3	1/3	
M88	3/3	1/2	1/3	1/3	3/3	3/3	/1		1/2	/1	1/3	
M4	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	/1	1/3	2/3
C11	1/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	/1	3/3	2/3		1/3	
21	3/3	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2			3/3	/1	2/3	/1
C188									/1	1/3		/1
119X	1/3	3/3	1/3	/1		2/3	3/3	3/3	2/3	/2	3/3	2/3
GN3405			2/3	2/3								2/3

Results were obtained by spotting $10^6/10^9$ PFU per ml suspensions of each phage.
 3 : confluent lysis, 2 : semiconfluent lysis, 1 : plaques, blank : no reaction.

除き、残る7株は2種のファージへの感受性の差であった。

増殖用菌株の型別用ファージに対する感受性試験 (ブラック法)

各型別用ファージを 10^9 PFU/ml になるように希釈した液を用いて、増殖用菌株12株すべてに対する

平板効果を2回求め、高い方の値を一覧としたのが表6である。

菌株M4と119Xは11種のファージに感受性を示し、10種のファージに感受性を示したのが7, 352, M88の3株、9種がF8とC11の2株、8, 7, 5, 3, 2種がそれぞれ21, 44, 1214, GN3405, C188の1株ずつであった。上記のうち各増殖用菌株

Table 6. Sensitivity of the propagating strains to typing phages by plaque count method

Indicator strain	Typing phage											
	7	352	44	1214	F8	E79	M4	C11	21	C188	119X	ϕ S-5
7	9.3	7.6	3.7	6.5	6.4	7.5	9.9	7.0	7.8		9.5	
352	9.4	9.7	9.9	8.6	8.2	7.4		9.6	8.0	8.9	3.5	
44			9.9	9.5	7.7	7.3			8.5	8.6	9.8	
1214			6.6	9.5	5.5	8.1			8.7			
F8	6.3		9.9	9.5	9.6	9.5	9.6	9.9	5.3		9.9	
M88	8.9	6.9	9.7	9.3	9.4	9.3	4.1	3.1	9.3		9.8	
M4	8.1	5.7	9.6	8.8	9.1	9.3	9.6	8.5	7.7		9.1	5.5
C11	9.0	7.1	9.9	9.3	9.6	9.5		9.9	7.9		9.4	
21	8.2	5.5	8.3	7.4	7.0	6.1			9.1		9.7	
C188									7.0	9.7		
119X	9.1	7.4	2.9	7.2		9.4	9.7	9.9	9.9	4.4	9.9	6.7
GN3405			8.2	8.5								9.0

Number indicates higher titer in $\log_{10}N/ml$ from two experiments.
 Gothic number means the titer on propagating strain.

について、対応ファージに対する平板効果に等しいかまたはそれ以上の値を示したファージを列記すると、菌株7に対するファージM4と119X、菌株352対ファージ44；F8対44，M4，C11，119X；M88対44，1214，F8，21，119X；M4対44；C11対44；21対119X；119X対C11，21であり、菌株44，1214，C188，GN3405では対応ファージのみが最高値を示していた。

ファージ抵抗性変異株の型別用ファージ感受性試験

材料と方法の項で述べたようにして分離できたファージ抵抗性変異株のブイヨン1夜培養0.1mlを軟寒天2.5mlとともに重層した寒天平板上に、型別用ファージの10⁹PFU/mlから10⁴PFU/mlに至る10進希釈液のそれぞれを滴下，1夜培養後に溶菌斑を観察した。以下表7-13においては10⁹PFU/mlまたはより低濃度の液まで完全溶菌を示した場合を+，10⁹PFU/ml液まで完全溶菌を認めたものを±，10⁹PFU/ml液のみで完全溶菌またはブラック形成を認めた場合は無変化の場合と合せて-と整理した。

菌株7由来抵抗性変異株:表7最上段に示したように1RTD液で完全溶菌を示す7，M4，119Xの3種のファージに対しては抵抗性変異株が分離できた。7/7は試験した10株がすべて同時にファージM4と119Xに対しても抵抗性を示し，親株が非感受性であったファージC188に対して感受性を示していた。7/M4は分離できた10株のうち9株は同時にファージ7と119Xに対する感受性を失っており，う

Table 7. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain 7

Strain	No. of colony	Sensitive pattern		
7		+-----+	-----+	-----+
/7	10	-	-	+ -
/M4	8	-	-	-
	1	-	-	+ -
/119X	1	-	-	±
	2	+	+	-

The arrangement of typing phages is the same as Tables 5 and 6. +: highly positive, ±: positive by high titer suspension. Remarks are also effective to Tables 8-13.

ち1株は7/7の場合と同様ファージC188に対する感受性が発現していた。残る1株は弱いながらファージ119Xに対する感受性のみを保持していた。7/119Xは2株分離できたのみであったが，ともにファージ7とM4に対する感受性に変化はなく，7/7，7/M4とは異なった傾向を示した。

菌株352由来抵抗性変異株:表8に示したように親株が強度感受性を示す8種の型別用ファージのうちC188の場合は完全溶菌平板中に集落発生がなく抵抗性変異株は分離できなかった。352/7のみが9株同じ態度を示し，ファージC188への感受性のみを残し該当ファージのほか6種のファージにも抵抗性となっていた。352/352は8株中5株がファージ1214とC188を除く5種のファージへも抵抗性となり，残る3株はそれぞれ4種，2種，1種のファージへも抵抗性であった。352/44では8株のうち4株がファージ1214，F8，E79へも抵抗性，他の2株はさらにC188へも抵抗性となり，残る2株では6種，4種のファージにも抵抗性を示した。352/

Table 8. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain 352

Strain	No. of colony	Sensitive pattern		
352		++++++-	-----	-----
/7	9	-----	-	±
/352	5	---+---	-	+
	1	+-----	+	+
	1	--+±±+	-	+
	1	+-----	-	+
/44	1	+-----	-	-
	1	++-+---	-	-
	2	++-----	+	-
	4	++-----	+	±
/1214	1	+-----	-	-
	1	±-----	+	+
	6	++-----	+	+
/F8	1	±-----	+	+
	1	+±-----	+	+
	8	++-+---	+	+
/E79	2	++-----	-	-
	5	+±-----	+	+
	1	++-+---	+	+
/C11	2	+-----	-	-
	5	++-----	-	-
	1	++±-----	-	-
	2	++-+---	-	-

1214では8株中6株は352/44の4株と同じで、残る2株では1株はファージ352へも、いま1株はさらにファージC11とC188へも抵抗性となっていた。352/F8は10株中8株が同時にファージ44とE79へも抵抗性となり、1株は1214へも、他の1株はさらに352へも抵抗性を示した。352/E79の8株中5株は352/44と352/1214で大勢を占めたパターンと同一で、2株はファージ44、1214、F8、C11、C188へも抵抗性、1株は44とF8へも抵抗性となっていた。352/C11では該当ファージを除き、10株中5株がファージ7と352を除く5ファージへも抵抗性、2株は7を除く6ファージへも抵抗性、別の2株がファージ7、352、1214を除く、残る1株はファージ7、352、44を除く、いずれも4ファージへも抵抗性となっていた。

Table 9. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain 44, 1214 and F8

Strain	No. of colony	Sensitive pattern
44		---++-----+-+--
/44	1	-- -- --
	1	-- -- --
	2	--+ -- --
/1214	6	--+ -- --
	1	-- -- --
/119X	7	-- -- --
	1	+ - - - -
/119X	9	+ + - - -
	9	+ + - - -
1214		----+--+-+----
/1214	3	- - -
	7	- - -
/E79	10	- - -
F8		--+++++---+-
/44	5	++++-----+-
/1214	2	----- --
	1	-----+± +-
/1214	2	++++-----+-
	2	++++-----+-
/F8	10	++++---±± +-
/E79	10	----- --
/M4	10	----- --
/C11	10	----- --
/119X	10	+++++++ --

菌株44由来抵抗性変異株: 表9上段のように親株はファージ44、1214、21、119Xの4種に強度感受性であったが、44/21の分離は不成功に終わった。44/44は他の3ファージに感受性を残すものが10株中6株と主流を占め、2株はファージ119Xにも、1株はさらにファージ1214にも、残る1株は全ファージに抵抗性であった。44/1214では8株中7株がファージ44と119Xにも抵抗性となり、1株は完全抵抗性となっていた。44/119Xは10株中9株がファージ21にも、1株はさらにファージ1214にも抵抗性を示した。

菌株1214由来抵抗性変異株: 表9中段にあるようにこの場合もファージ21では完全溶菌平板上に集落を認めないか、認めた場合もすべて溶原化菌で目的株の分離には成功しなかった。1214/E79は10株揃って完全抵抗性となり、1214/1214でも3株にその傾向があったが、7株は該当ファージとともにE79にも抵抗性となり、ファージ21感受性を残していた。

菌株F8由来抵抗性変異株: 表9下段に示したように親株が強度に感受性を示す7種のファージに抵抗性の株が各組合せで分離できた。試験したそれぞれ10株が揃って完全抵抗性となっていたのは、F8/E79、F8/M4、F8/C11であって、F8/1214中の4株も同じ傾向を示したが、うち2株はファージ7、352、C188への抵抗性を失っていた。F8/119Xは揃って該当ファージのみに抵抗性となった。5株分離でき揃って同一傾向を示したF8/44は、ファージ1214、F8、E79、119Xにも抵抗性となる一方、ファージ7、352、C188への抵抗性を失っていた。F8/1214の残る1株ではファージ44、F8、E79、119Xにも抵抗性となる一方、C188への抵抗性が消失していた。10株均一のF8/F8はファージ44、1214、119Xへも抵抗性となる一方、ファージ7、352、C188への抵抗性を失っていた。

菌株M88由来抵抗性変異株: 表10にあるように7種のファージに感受性を示した親株から、溶原化株が多く目的株の分離ができなかったM88/21を除く、6種のファージに対する抵抗性変異株を得た。M88/7は3株すべてがファージ44とF8へも抵抗性であった。10株試験できたM88/44では3株がファージ7、F8、E79へも、他は表の順に2株ずつがファージ7、F8、E79、21、ファージ7、F8、21、ファージF8、E79へも、1株がファージ7、

Table 10. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain M88

Strain	No. of colony	Sensitive pattern
M88		+ - + + + + - - + - + -
/7	3	- - + - ± + ±
	2	- - + - - - - + +
	2	- - + - ± - - + +
/44	3	- - + - - - - + + +
	2	± - + - - - - + + +
	1	- - + - ± - - + + +
/1214	1	+ + - - - - - - - -
	2	+ + - - - - - - - +
/F8	2	- - - - - - - + ± -
	1	+ + - - - - - + ± ±
	1	± - + - ± - - + + +
/E79	1	+ + - - - - - ± - -
	5	+ + - - - - - - - +
	4	+ + - - - - - ± ± ±
/119X	10	+ ± + + + + - - - -

F 8 へも抵抗性を示すと多岐にわたり、全株がファージ C188 に対する抵抗性を失っていた。M88/1214 は 3 株中 2 株がファージ 44, F 8, E79, 21 へも、1 株はさらにファージ 119X へも抵抗性で、3 株ともファージ 352 への抵抗性が消失していた。M88/F 8 の場合、4 株中 2 株はファージ 7, 44, 1214, E79, 119X へも抵抗性となる一方、ファージ C188 への抵抗性を失い、1 株はファージ 44, 1214, E79 へも抵抗性となる反面、ファージ 352 への抵抗性を消失、残る 1 株ではファージ 44 へも抵抗性となって、ファージ C188 への抵抗性を失っていた。M88/E79 は 10 株中 5 株がファージ 44, 1214, F 8, 21 へも、4 株は前者のうちファージ 21 を除く 3 種へも、1 株はファージ 44, 1214, F 8, 119X へも抵抗性となる一方、すべてファージ 352 への抵抗性を消失していた。残る M88/119X では 10 株揃ってファージ 21 へも抵抗性となった反面、ファージ 352 への抵抗性が減弱していた。

菌株 M4 由来抵抗性変異株: 表 11 に示したように親株は 8 種のファージに感受性を示したが、溶原化株の検出が多くてファージ 7 抵抗株は分離できなかった。M4/44 と M4/1214 の全株、M4/F8 の 2 株、M4/E79 の 9 株、M4/M4 の全株、M4/C11 の 8 株は完全抵抗性となり、M4/119X は該当ファージに

Table 11. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain M4

Strain	No. of colony	Sensitive pattern
M4		+ - + + + + + - - ± -
/44	10	- - - - - - - - - -
/1214	4	- - - - - - - - - -
	2	- - - - - - - - - -
	3	- - - - - + - - - -
/F8	1	+ - - - - + - - - -
	1	+ - - - - + ± - - -
	2	+ - - - - + ± ± - ±
	1	+ + - - - + ± - - -
/E79	9	- - - - - - - - - -
	1	± - - - - - - - - -
/M4	10	- - - - - - - - - -
/C11	8	- - - - - - - - - -
	1	+ - - - - - - - - -
	1	- + + + + + - - - -
/119X	10	+ + + + + + - - - -

のみ抵抗性となっていた。残る株について感受性を残したファージとして記載すると、多様性を示した M4/F8 は 3 株がファージ M4, 1 株がファージ 7 と M4, 1 株がファージ 7, M4, C11, 2 株はファージ 7, M4, C11, 119X, 1 株がファージ 7, 44, M4, C11, M4/E79 と M4/C11 の 1 株はファージ 7, M4/C11 の残る 1 株はファージ 44, 1214, F 8, E79, M4 であった。

菌株 C11 由来抵抗性変異株: 表 12 上段のように親株が強度に感受性を示す 6 種のファージに抵抗性の株が各組合せで分離できた。C11/44 の 8 株、C11/1214 と C11/F8 の全株、C11/E79 の 8 株、C11/C11 の 7 株は全ファージに抵抗性となり、C11/119X のみは揃って目的ファージのみに抵抗性となっていた。残る株では C11/44 の 1 株がファージ C11 と 119X にも、同 1 株は目的ファージのみに、C11/E79 の 1 株はファージ 44, 1214, F 8, C11 にも、C11/C11 の 1 株がファージ 44, F 8, E79, 119X にも、同 1 株はファージ F 8, 119X にも抵抗性となっていた。

菌株 21 由来抵抗性変異株: 表 12 下段のように高頻度の溶原化菌に混じて分離できた 21/21 は 3 株ともファージ 119X にも抵抗性であり、21/119X はすべてファージ 21 への感受性は保っていた。

Table 12. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain C11 and 21

Strain	No. of colony	Sensitive pattern
C11		--++++-+--+-
/44	8	---- - -
	1	-+±± - -
	1	-+±+ ± +
/1214	10	----- - -
/F8	10	----- - -
/E79	8	----- - -
	1	----- - ±
/C11	7	----- - -
	1	-±-- - -
	1	±+-+ - -
/119X	10	++++ + -
21		-----+--+
/21	3	- -
/119X	10	+ -

菌株 C188 由来抵抗性変異株: 表13上段に示すように C188/21 も溶原化株が多く分離率は低かったが3株すべて該当ファージのみに抵抗性であり, C188/C188 では該当ファージのみに抵抗性となったのが7株, 完全抵抗性を示したのが3株であった。

菌株 119X 由来抵抗性変異株: 表13下段のように親株が感受性を示した5種のファージのうちファージM4 抵抗性株の分離は不成功に終わった。119X/7 では9株中8株がファージE79, M4, C11にも, 1株ではさらにファージ119Xにも抵抗性となった一方, ファージ21への抵抗性を失っていた。119X/E79は5株中3株が前記8株群と同じ傾向を示し, 1株は全ファージに抵抗性, 残る1株はファージ21への感受性を除き3株群と同様であった。119X/C11はいずれもファージ7, E79, M4へも抵抗性となり, 7株のうち3株ではファージ21への抵抗性を失っていた。119X/119X では10株中7株がファージE79にも, 2株は該当ファージのみに, 1株はファージ7とE79にも抵抗性を示していた。

菌株 GN3405由来抵抗性変異株: 本菌株については表5, 6をみるとファージ44, 1214, ϕ S-5に感受性を示したが, ファージ44と1214では高濃度で

Table 13. Sensitivity of phage resistant mutant isolated from Strain C188 and 119X

Strain	No. of colony	Sensitive pattern
C188		-----+±--
/21	3	-±
/C188	3	--
	3	±-
	4	+ -
119X		+-----++-+-
/7	1	- - - - + -
	1	- - - - + ±
	7	- - - - ± ±
/E79	1	- - - - -
	1	- - - - ±
	3	- - - - ± +
/C11	4	- - - - ±
	3	- - - - ± ±
/119X	1	- + + -
	7	± + + -
	2	± + + -

も不鮮明な溶菌斑を示し, ファージ ϕ S-5では溶原化株のみが検出されて, 目的とした抵抗性変異株は分離できなかった。

考 察

増殖用菌株間にみられた溶原性

培養濾液を直接滴下した表2の成績では, 144組合せについて4回の成績を示しているが, その現象発現は一定とはいえず, 65組合せでは少なくとも1回は滴下部に一致した菌発育阻止またはブラック形成を認めた。このうち毎回, 3回, 2回陽性であったのはそれぞれ4組, 9組, 21組の計34組で, 残る31組は1回のみ陽性であった。これとは異なってしかも毎回新たに作製した濾液についてブラック数算定を行った表3の成績をみると, 20組が示されており, うち4組ではそれぞれ1回ブラックが検出されなかった。滴下法で毎回陽性の4組はそれぞれ表3のC, D, E, Nにあたり, 3回陽性の9組ではうち6組が表3のF, G, H, L, O, Vに相当していたが, 残る3組はブラック発現がなく, また表3のP, S, T, Uの4組とA, B, K, M, Q, Rの6組はそれぞれ滴下法で2回, 1回となってい

た。このような滴下法とブラック法との間にみられた差異は、ブラック法各組3回の値にみられる差でも明らかのように、溶原ファージ放出そのものの不安定性も一因ではあるが、培養濾液原液を用いた滴下法ではピオシン活性の発現も考えられる。この点に関しては今回は特に確認は行っていない。

本研究では、溶原ファージが作用した増殖用菌株の該当型別用ファージ抵抗性変異株を利用するなどの方法により、型別用ファージ原液中に含まれる溶原ファージの確認を行うには至らなかった。そこで表3に示した培養濾液中の最高ファージ数 ($10^{7.7}$ P F U/ml) を適用してみると、型別用ファージの力価が 10^{10-11} P F U/ml に達していれば、型別に用いる $1-3 \times 10^6$ P F U/ml に相当するファージ液中の溶原ファージは型別結果に影響しないと考えられる。しかし常法で非感受性であった菌株への使用が提案されている $1-3 \times 10^6$ P F U/ml 液の場合にはその影響は考慮に入れておくべきである。この際特にファージ44と ϕ S-5 に混在し得る溶原ファージは今回の成績からみて作用域が広いものであった。

溶原ファージをそれぞれに感受性を示した個々の菌株で増殖させたファージ液の作用域を示した表4の成績は、型別用ファージに混在する溶原ファージを考えるうえには利用できない。本実験は高力価の溶原ファージを用いてその作用域を参考までに知る目的で行ったのであるが、予期に反して培養濾液と対比させての作用域拡大は少なく、それがあつたとみられたのはB、Dの2ファージのみであった。溶原株が同等に複数ファージを放出しているか否かの試験は行っていないが、異なった菌株で分離・増殖を行った同一培養濾液由来のファージの間では、同じ宿主域は全く認められなかった。この所見は緑膿菌溶原ファージは宿主依存性変異を起し易いことを示したものとみられ、溶原ファージに関する研究に配慮を要する点である。

型別用ファージの増殖用菌株への作用域

表5の高力価液滴下の場合とブラック法との間には、前者のみ陽性が12組、後者でのみ陽性が3組あつて、溶原ファージが関与し得るのは前記12組のうちファージC188対菌株M88の部分のみであつて、残る14組については本研究の範囲では説明不能であ

つた。各試験法で得た成績によって各ファージの作用域を比較すると、高力価液滴下とブラック法で44と1214が同じパターンを示したのみで、これを除く10ファージはそれぞれ異なっていた。Sakamoto *et al.* (1977) 提唱の方法は7と352, 44と1214, F8とE79はそれぞれ対として利用されているので、44と1214が同一パターンを示したのは当然といえ、これを含め11種のパターンがみられたことは使用ファージ個々の独立性を示したものと見える。

同じ成績を増殖用菌株の感受性域としてみると、高力価液滴下時の菌株7とM4が感受性度まで含めると差はあるものの同一パターンを示したほかは、各菌株の感受性域に差があつた。表6で増殖用菌株が感受性を示したファージ数はC188の2, GN3405の3, 1214の5を除けば7以上となっているので、表3において溶原性を認めなかった352, F8, M88, 119Xの4株で増殖させた各ファージの作用域を検討し、うち2株を増殖用菌株として残すのは今後の課題と考えられる。

ファージ抵抗性変異株のファージ感受性

表7-13の対照欄に示したようにGN3405株を除く11株が感受性を示したファージ数は延べ55であつたが、352/C188, 44/21, 1214/21, M88/21, M4/7, 119X/M4を除く49種のファージ抵抗性変異株が分離できた。多数の株が分離できた場合は任意の10株、10株までは全株を供試し計410株の成績が得られた。菌株7, F8, M88, 119Xよりの13種81株にみられた感受性の出現または増強を含めて、同一種全株が均一の感受性を示したのが22種179株、2様のパターンを示したのが7種、3様:14種、4様:4種、5様と6様それぞれ1種と複雑な場合が多かつた。同一種全株が型別用ファージのすべてに抵抗性となつたのは1214/E79, F8/E79, F8/M4, F8/C11, M4/44, M4/1214 (全4株), M4/M4, C11/1214, C11/F8, 21/21 (全3株)の10種87株で、大多数の株が完全抵抗性を示したのは7/M4 (10株中8株), M4/E79 (9:10), M4/C11 (8:10), C11/44 (8:10), C11/E79 (8:9), C11/C11 (7:9)の6種48株、一部の株が全く非感受性となつたのは44/44 (1:10), 44/1214 (1:8), 1214/1214 (3:10), F8/1214 (2:5), M4/F8 (2:10), C188/C188 (3:

10), 119X/E79 (1:5) の7種13株であった。完全抵抗性化株は計148株で被験株の36.1%を占め、各ファージ抵抗性変異株の傾向としてみると、49種のうち16種 (32.6%) ではあるファージへの抵抗性化は完全非感受性化をもたらしたといえる。一方目的としたファージへの抵抗のみを獲得したのは7/119X (全2株), 44/44 (6:10), F8/119X, M4/119X, C11/44 (1:10), C11/119X, 21/119X, C188/21 (全3株), C188/C188(7:10), 119X/119X (2:10) の10種61株であった。これらのうちファージ119X抵抗株はすべてファージ21に感受性を示さなかった親株由来であり、上記のほかに試験した44/119XとM88/119Xの10株ずつではそれぞれ9株と10株で同時にファージ21に対する抵抗性を獲得していた。そこでファージ119Xは他のファージとは異なっており、ファージ21とは関連性があると考えられる。

表7-13の成績から同一親株由来の各ファージ抵抗性変異株の2種について、抵抗性化の目的とした2ファージに対する成績を多数株の示した態度で判定しつつ、その間に交差抵抗性が認められたファージの組合せとして列記すると、表7ではファージ7とM4, 表8で7と352, 44と1214, F8, E79の各組合せ, 1214とE79, F8とE79, 表9中段の場合1214とE79, 同表下段では44と1214, F8, E79の

3組, 1214とF8, E79, M4, C11の4組, E79とM4, C11の2組, M4とC11, 表10で7と44, 44とF8, E79の2組, 1214とF8, E79の2組, F8とE79, 表11の場合44と1214, F8, E79, M4, C11の5組, 1214とF8, E79, M4, C11の4組, F8とE79, C11の2組, E79とM4, C11の2組, M4とC11となり, 表12の44, 1214, F8, E79, C11と表13の7, E79, C11ではそれぞれ完全な交差抵抗性を示していた。これらの組合せのうちには親株を異にして同じ組合せのファージに対する交差抵抗性があるので、2種のファージ間の交差抵抗性の有無に分けてまとめたのが表14である。これによるとファージ7と352, 7とM4, 44とF8, 44とE79, 1214とE79, 1214とM4, E79とM4, M4とC11の8組では常に交差抵抗性が成立しており、互いに近縁ではないかとみられた。一方7と1214, 7とF8, 352と44, 1214, F8, E79, C11の5ファージ, F8とM4, 21とC188, 119Xと8種のファージの17組では全く交差抵抗性を認めず、互いに相関性のうすいファージとみられた。残る11組のうち44と1214, 1214とF8, 1214とC11, F8とE79, E79とC11の5組では交差抵抗性を認めた場合が多く、さらに残る7と44, 7とC11, 44とM4, 44とC11, F8とC11の5組では何れとも決め得なかった。

Table 14. Number of the combination showing cross-resistance between two kinds of phage resistant mutants

Phage	Phage										
	352	44	1214	F8	E79	M4	C11	21	C188	119X	ϕ S-5
7	1:0	1:1	0:2	0:2	1:2	1:0	1:1			0:3	
352		0:1	0:1	0:1	0:1		0:1				
44			4:2	5:0	5:0	1:1	2:2			0:5	
1214				4:1	6:0	2:0	3:1			0:5	
F8					4:1	0:2	2:2			0:4	
E79						2:0	4:1			0:5	
M4							2:0			0:3	
C11										0:4	
21									0:1	0:1	

Figures indicate the number of positive : negative cross-resistance from the results shown in Tables 7-13.

Judgement to positive or negative in a kind of mutant was made by a majority of the results.

Table 15. Similarity index between phages

Phage	Phage										
	352	44	1214	F8	E79	M4	C11	21	C188	119X	φS-5
7	67	15	20	15	23	31	48	5	31	11	0
352		9	14	9	16	12	33	4	33	10	0
44			54	74	57	24	27	0	1	0	0
1214				47	50	16	27	12	17	16	0
F8					69	26	30	0	2	1	0
E79						37	38	4	12	7	0
M4							51	0	12	2	0
C11								0	26	2	0
21									6	37	0
C188										8	0
119X											0

Similarity index (%) (Bergan, 1972a, b) are obtained by the results shown in Tables 7-13.

同じく表7-13の成績を延べ410株の型別結果として Bergan (1972 a, b) または Sakamoto *et al.* (1975) と同様にして similarity index を求めたのが表15である。これはファージ抵抗性変異株のみを用いているので他の成績との比較はできない。しかし Sakamoto *et al.* (1977) が Group I の a, b, c として用いているファージ7と352, 44と1214, F8とE79ではそれぞれ67%, 54%, 69%と高値で、氏らの方針を支持する結果であった。このほか44とF8では最高値74%, 44とE79は前記44と1214より高い57%を示し、1214とE79, M4とC11の間にもかなりの相関があった。

結 語

緑膿菌型別用ファージ12種とそれぞれの増殖用菌株を用いて、菌株の溶原性と型別用ファージに対する感受性を試験し、後者の成績に基づきファージ抵抗性変異株を分離、それらの型別用のファージに対する感受性を試験して以下の結果を得た。

1) 培養濾液のブラック算定法により、増殖用菌株12株のうち352, F8, M88, 119Xを除く8株に溶原性を認めた。濾液としてみたファージの作用域は6株と5株へが各1, 2株へ3, 1株のみへが3であった。しかしその力価から、ファージ型別の実際面ではまず影響がないものと推定した。

2) 溶原ファージを異なった菌株で分離・増殖し

た場合、それぞれの宿主域に差を認め、これらの溶原ファージは宿主依存性変異を起し易いものと考えた。

3) 型別用ファージは大多数のものが広い宿主域を示した。そこで上記溶原性を認めなかった4株のうち2株で型別用ファージを増殖する可能性に言及した。

4) 49種、410株のファージ抵抗性変異株の型別用ファージに対する感受性域は、極めて複雑であったが以下の知見を得た。

5) 菌株7, F8, M88, 119Xよりの13種81株には親株が非感受性であったファージの一部への感受性化がみられた。

6) 22種179株では各種のうちでは均一な感受性域を示し、うち10種87株では全ファージ抵抗性であった。各種のうち大多数の株が完全抵抗性となったのは6種58株中48株であった。

7) 目的としたファージのみへの抵抗性を獲得したのは10種85株中61株であった。このうち6種52株中44株はファージ21非感受性の親株由来のファージ119X抵抗株であり、同ファージへの抵抗株がファージ21へも抵抗性となった2種20株中19株と合せて、ファージ119Xは21を除く他のファージには異種のものと考えられた。

8) 各種の対象2ファージに対する成績を多数株の示した態度で判定、2ファージ間の交差抵抗性出

現度を比較し、常に交差抵抗性を示したファージ7
と352, 7とM4, 44とF8, 44とE79, 1214とM
4, E79とM4, M4とC11は近縁と考えた。

9) similarity index を求めた結果, 7と352, 44

と1214, F8とE79に高値を認め, Sakamoto *et al.*
(1977) の型別法を支持できた。このほか44とF8,
44とE79, 1214とE79, M4とC11にも相関を認め
た。

謝 辞

稿を終わるに当たり、終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました当部門内藤達郎教授に深い謝意を表します。また実験に際してご協力いただいた教室員各位に謝意を表します。

文 献

- 1) Bergan, T. (1972 a): Comparison of numerical procedures for grouping pseudomonas bacteriophages according to lytic spectra. Acta Pathol. Microbiol. Scandinav., 80, 55-70.
- 2) Bergan, T. (1972 b): A transformed Yule correlation coefficient employed in numerical grouping procedures on bacteriophage typing lytic spectra. Acta Pathol. Microbiol. Scandinav., 80, 89-100.
- 3) Homma, J. Y., Kim, K. S., Yamada, H. & Ito, M. (1970): Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa* and its cross-infection. Japan. J. Exp. Med., 40, 347-359.
- 4) 本間 遜 (1975): 血清型別法. 緑膿菌とその感染症. 297-311, 文光堂, 東京.
- 5) 内藤達郎 (1975): ファージ型別法・ピオン型別法. 緑膿菌とその感染症. 312-325, 文光堂, 東京.
- 6) 仲宗根恵俊 (1980): Gillies-Govan 法と Darrell-Wahba 法によるピオン型別の完全比較と改良型別法の提唱. 熱帯医学, 22, 189-207.
- 7) Sakamoto, Y., Iijima, T., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. (1975): Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by phage resistance and lysogeny. Res. Comm. Inst. Ferment. Osaka, 7, 24-36.
- 8) Sakamoto, Y., Yamamoto, K. S., Iijima, T. & Iyobe, S. (1977): A phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Plasmids: Medical and theoretical aspects. 441-447, Avicenna/Springer Verlag, Prague/Berlin Heidelberg New York.
- 9) 塩野谷博, 本間 遜 (1968): 緑膿菌集落の解離. 日細菌誌., 23, 332-342.
- 10) Sjöberg, L. & Lindberg, A. A. (1968): Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Pathol. Microbiol. Scandinav., 74, 61-68.
- 11) 武部 啓 (1972): 突然変異の誘導. 蛋白質・核酸・酵素 別冊 細菌ファージ遺伝実験法. 12-24, 共立出版, 東京.
- 12) Yamamoto, N. & Naito, T. (1965): Inactivation by nitrogen mustard of single- and double-stranded DNA and RNA bacteriophages. Science, 150, 1603-1604.