E 群サルモネラにおける O 抗原因子 34 の溶原化変換 第2報

中 川 昭 久

札幌医科大学微生物学教室 (主任: 植竹教授)

[受付: 11 月 10 日 1956]

著者は第1報で E₂ 群の *S. illinois* 及 *S. thomasville* が E₂ 群の菌に感染を起してこれを溶原化すると共に 3, 15→3, 15, 34のO抗原変換をおこさせる phage として $\mathcal{E}^{34}$ を産生すること, 又このO抗原変換が lysogenic conversion 溶原化変換と考えられることを報告したが, その後上記の研究の間に *S. newington* を指示菌とした場合2種の溶菌斑が区別され, 然もともに 3, 15→3, 15, 34のO抗原変換をおこすことを見出した。本実験ではこれらの点を含めて $\mathcal{E}^{34}$ phage の熱抵抗性, pH域, burst size, $\mathcal{E}^{15}$ phage (3, 10→3, 15の抗原変換に關与する phage) との比較等について記載する。

実験材料並びに方法

1. 使用菌株, 免疫血清 phage のとり方, 溶算, lysogenicity の検査等はすべて第1報に同じ。

2. pHによる影響: *S. thomasville* から得た phage を小試験管に分注し(約 10^8 lytic particles 1 mlを1.5cc) 緩衝液を用いてpHを夫々 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0とし氷室に一夜静置し翌日pHを7.2に修正して, その溶菌力及び抗原変換誘導能力を *S. newbrunswick* を指示菌株としてしらべた。

3. 熱による影響: *S. thomasville* から得た phage を同じ様に小試験管に分注し65°C, 70°C, 75°C, 80°Cの各温度に保ち一定時間後直ちに冷水に入れて冷却し, その溶菌力と抗原変換誘導能力を *S. newbrunswick* を指示菌株としてしらべた。

4. burst size: 通常の方法³⁰⁾に従ってしらべた。

5. 中和試験: 約3000 lytic particles/ml の phage 浮遊液に2倍階段稀釈の抗phage血清を等量加えて37°Cに2時間保った後溶算を行った。

実験成績

1. 溶菌斑の形態

Fig. 1 Photograph of $\mathcal{E}^{34}$ on *S. newington*
[Type II]

C Plaque of $\mathcal{E}_{341}^{34}$

D Plaque of $\mathcal{E}_{I-4}^{34}$

$\mathcal{E}^{34}$ phage は *S. newington* を指示菌とすると第1報第1図A, Bに示した様な溶菌斑を作るものとして分離

NAKAGAWA Akihisa: Lysogenic Conversion of O Antigen 34 in Group E Salmonella (II). Department of microbiology, Sapporo University of Medicine.—Jap. J. of Bact., 12 (2), 107-110, 1957.

この研究には文部省科学研究費の補助を受けた(植竹)。

本論文の要旨は第9回日本細菌学会北海道支部会(1956年2月); 第29回日本細菌学会(1956年4月)に発表した。

Fig. 2 Photograph of $\mathcal{E}^{34}$ on *S. newbrunswick*

Plaue of $\mathcal{E}_{341}^{34}$ (Type I)

Plaue of $\mathcal{E}_{311}^{31}$ (Type II)

されたが、その後の実験経過中に本報第1図C、Dに示す様な別な形態の溶菌斑の混じってくるのに気が付いた。

(A、B型のものを1型、C、D型のものを2型と仮称する)この溶菌斑から単離した phage についてしらべてみると第1表に示す様に短時間の接触で *S. newington* の多数の細胞に抗原変換が起すことが知られる。

又第2表に示す様に1型の溶菌斑をつくる phage に対する抗血清により2型の溶菌斑を作る phage も中和される。

1型のものと2型のものは *S. newington* を指示菌と

Table 1. Survival and antigenic conversion of *S. newington* exposed to phage Type I and II

	Colonies	Survivors (%)	Antigenic variants
			Colonies tested
<i>S. newington</i> plus Type II	190	22.9	5/16
<i>S. newington</i> plus Type I	22	2.7	14/16
<i>S. newington</i> plus Broth	830		0/8

Table 2 Neutralization of phages Type I (A, B) and II (C, D) with Anti-phage A serum

Phages		N
Type I	A	8.95
	B	8.85
Type II	C	9.24
	D	9.36

Figures indicate N of $\log_2 2^N \times 10$ at which dilution 50% of phages were neutralized with antisera

すると異なる溶菌斑を示すが *S. newbrunswick* を指示菌とすると全く同一の溶菌斑を形成して区別がつけられない(第2図参照)。

2. $\mathcal{E}^{34}$ phage の熱抵抗性

第3表に示す如く75°C30分迄はそれ程著しい活性の低下を示さないが、80°Cになると活性は著明に低下する。

Table 3 Effect of Heat on phage $\mathcal{E}^{34}$

Heat treatment	Phage titer	Antigenic variants
		Colonies tested
不加熱 対 照	1.1×10^8	7/8
65°C 30分	1.0×10^8	7/8
70°C 15分	6.8×10^7	8/8
70°C 30分	3.5×10^7	7/8
75°C 15分	3.4×10^7	6/8
75°C 30分	3.1×10^7	13/16
80°C 15分	2.8×10^5	0/16
80°C 30分	1.9×10^4	0/16
80°C 45分	2.4×10^3	0/16
80°C 60分	1.3×10^2	0/16

あらわれる抗原変異集落の割合も phgae の不活化に平行し、80°C15分以上の加熱では比較的少数の集落をしらべたのでは変異株が証明されない(抗原変換は加熱した phage 液に *S. newbrunswick* のブイヨン培養 37°C24 時間を 適当に 薄め 非加熱対照 phage 液から 計算して phage と細胞の割合が凡そ 5 : 1 の割になる様に混合し室温に30分おいた後寒天平板に移植し生じた集落を因子血清でしらべた)しかしこの様な方法でしらべた場合には、活性 phage の数がある程度以下に低下すると抗原変異集落の検出は極めて困難になることは明かである。従つて上記の成績は不活化されずに残つた phage が抗原変換に無関係であると云うことを意味するものではない

い。

3. $\mathcal{E}^{34}$ の pH 域活性

第3図に示すように pH 3 から pH 12 迄の間は活性をよく保ち pH 2 以下或は pH 13 以上では著明に不活化される。この場合にも phage 活性が保たれている pH 域では抗原変換が明らかに認められるが、不活性化される様になると抗原変換が認め難くなった(抗原変換のしるべ方は前項に同じ、従つて前項に記載したと同様のことが云える)。

Fig. 3 Effect of pH on Phage $\mathcal{E}^{34}$

4. $\mathcal{E}^{34}$ phage と E_1 群細胞

$\mathcal{E}^{34}$ phage は E_2 群の菌を用いて増殖させるので、その phage 液の中には常に $\mathcal{E}^{15}$ phage が混在して来るのをさけられない。そこでこの phage 液に予め抗 $\mathcal{E}^{15}$ phage 血清を加えて $\mathcal{E}^{15}$ を中和した後、 E_1 群の $S.$

Fig. 4 One-step growth curve of the bacteriophage $\mathcal{E}^{34}$ on *S. newbrunswick*

anatum を用いて $\mathcal{E}^{34}$ の吸着をしるべたが吸着は全く認められなかった。無論抗原変換も認められなかった。

5. burst size

phage $\mathcal{E}^{34}$ の one-step growth curve を示したのが第4図である。即ち latent period は 40~50 分て burst size は約50であつた。

6. $\mathcal{E}^{34}$ phage と $\mathcal{E}^{15}$ phage の血清学的比較

第4表に示す様に $\mathcal{E}^{34}$ phage は抗 $\mathcal{E}^{15}$ phage 血清によつては中和されず又逆に $\mathcal{E}^{15}$ phage は $\mathcal{E}^{34}$ phage 血清によつて中和されない。

猶表から明らかなように *S. illinois* から分離された $\mathcal{E}^{34}$ phage も *S. thomasville* から分離された $\mathcal{E}^{34}$ に対する抗血清によつて同じ程度に中和される。

総括並びに考按

先づ第1に注目すべき点は *S. newington* を指示菌とした場合 $\mathcal{E}^{34}$ が2種の溶菌斑を形成することである。この両者から夫々分離した phage は *S. newbrunswick* を指示菌とすると全く同じ形態の溶菌斑をつくること、血清学的にも今迄のところ区別されないこと、同じ様に 3, 15→3, 15, 34の抗原変換を起すこと等から考えて同じ phage に由来する変異株と考えられるが、このことは更に 34 抗原因子の形成に関与する遺伝子が $\mathcal{E}^{34}$ phage のもつ遺伝子のすべてではなくて一部であると云うことを示唆するものである。

次に熱抵抗性及び pH 域活性の検査にあたり phage 活性と抗原変換誘導能力とが平行すると云う所見は $\mathcal{E}^{34}$ phage が 3, 15→3, 15, 34のO抗原変換に関係していると云うことを示す証拠を更に加えたものと云える。尚これの値は原田の報告と全く一致しているから同一 phage を夫々扱っているものと思われる。

$\mathcal{E}^{34}$ phage と $\mathcal{E}^{15}$ phage とは次の様な所見においてはつきり性質を異にしている。

	$\mathcal{E}^{34}$	$\mathcal{E}^{15}$
1. E_1 群細胞	吸着されない	される
2. E_2 群細胞	吸着される	されない
3. 中和試験	特異的	特異的
4. 熱抵抗性	80°C15分以上で不活化著明	60°C30分以上で不活化著明
5. pH域活性	3~12	4~10
6. O抗原因子新成	34	15

結 論

- 1) *S. thomasville*, *S. illinois* が産生する $\mathcal{E}^{34}$ phage

Table 4 Neutralization of $\mathcal{E}^{34}$ and $\mathcal{E}^{15}$

Dilution of Anti-phage $\mathcal{E}_{341}^{34}$ serum		80	160	320	640	1280	2560	5120	Control
Phages									
	$\mathcal{E}_{341}^{34}$	0	0	0	3	79	251		409
	$\mathcal{E}_{II-4}^{34}$	0	0	0	1	5	27	52	98
	$\mathcal{E}_{II-3}^{15}$	51	53	52	50	55	54		56
	$\mathcal{E}_{341}^{15}$	70	70	73	72	75	74		72

Dilution of Anti-phage $\mathcal{E}_{86}^{15}$ serum		80	160	320	640	1280	2560	5120	Control
Phages									
	$\mathcal{E}_{86}^{15}$	0	0	0	7	21	37	58	97
	$\mathcal{E}_{341}^{34}$	121	120	119	123				
	$\mathcal{E}_{341}^{15}$	0	0	0	9	26	39	69	94

Dilution of Anti-phage $\mathcal{E}_{II-3}^{15}$ serum		80	160	320	640	1280	2560	5120	Control
Phages									
	$\mathcal{E}_{86}^{15}$	0	1	16	67	76	99		104
	$\mathcal{E}_{341}^{34}$	111	116	123	120				117
	$\mathcal{E}_{341}^{15}$	0	4	18	34	72	83		83

Note: Figures indicate numbers of plaque on *S. newington*

から *S. newington* を指示菌とした場合溶菌斑を異にする 2 種の phage が分離された。この所見は 34 抗原因子に関係する遺伝子は phage 遺伝子の一部であることを示す。

2) $\mathcal{E}^{34}$ phage は 75°C 15 分迄の加熱では活性はあまり低下しないが 80°C 15 分の加熱で著明に活性が低下する。

3) $\mathcal{E}^{34}$ phage は pH 3 乃至 12 の間では活性がよく保たれ pH 2 以下或は pH 13 以上になると活性が著しく低下する。

4) $\mathcal{E}^{34}$ phage と $\mathcal{E}^{15}$ phage との比較を記述した。引用文献は第 1 報に総括した。