phage ϵ^{34} の変異株の比較研究

中 川 昭 久 内 田 孝 宏
牧 野 利 一 萩 原 新

札幌医科大学微生物学教室 (主任 植竹教授)

[受付: 3月10日, 1959年]

前報¹⁾で ϵ^{34} にいくつかの突然変異株が分離され、それらが抗原変換誘導能力や吸着性を異にすることが明らかとなった。これに関連して、それらの変異株の別の性状についても更に比較したので、その成績について報告する。

実験材料と方法

菌株: サルモネラ菌株はすべて国際標準株で日本腸内細菌委員会より分与を受けたもの。S. newington C₂, S. selandia 7482, S. newbrunswick 5411, S. cambridge 178, S. kinshasa 309, S. thomasville 341, S. illinois 133, S. canoga 276 は夫々 84, 85, 86, II-1, II-2, 341, II-4, II-3 と略記する。

phage 株, 溶原化された菌株の記号, phage 吸着の検査法, 溶菌斑数計算法等は中川の報告²⁻³⁾と同じ。

抗 phage 血清の作り方: Adams の方法⁴⁾に従い, 中和速度恒数 k は $k = 2.3 \frac{D}{t} \log \frac{P_0}{P_t}$ より算出した。ここに D = 血清希釈, t = 反応時間, $P_0 = t_0$ 時の phage 数, $P_t = t$ 分後の非中和遊離 phage 数。

潜伏期及放出量の検査: 一段増殖実験法によつた。菌細胞 2×10^8 /ml と phage 5×10^7 /ml とを等量に混じ, 37°C 10分後, 抗 phage 血清で10倍に希釈して遊離 phage を中和した後, 適当にブイオンで希釈して 37°C に保ち, 時を逐つて感染中心及び phage の定量を行った。

実験成績

1 宿主域

a) Efficiency of plating

84 で増殖させた K, Tu, k, tu を 84, 85, 86, II-1, II-2 を指示菌として plate してみると, Table 1 の様になる。即ち 85, II-2 では全然溶菌斑が出来ず, 又 86 では k と tu の溶菌斑が出来ない。phage 増殖に用いた 84 で efficiency of plating が高く, 他の菌で低いのは, 宿主

依存性変異によるものと推定される。

Table 1. Efficiency of Plating

phage bact. cell	K	Tu	k	tu
84	2×10^8 /ml	1.6×10^8 /ml	1.2×10^8 /ml	1×10^8 /ml
85	0	0	0	0
86	5×10^8 /ml	3×10^8 /ml	0	0
II-2	4.5×10^8 /ml	3×10^8 /ml	1×10^8 /ml	1.5×10^8 /ml
II-2	0	0	0	0

Phages employed were those propagated on S. newington (=84.)

b) Killing

ブイオン一夜培養約 2×10^7 /ml の菌細胞と 10^8 /ml の phage とを 1 : 1 に混じ, 37°C に 30 分おいてから希釈 plate して菌細胞が殺されるかどうかをしらべた。Table 2 に示す様に 85 と II-2 は何れの phage によつても殺されない。又 86 は K と Tu では殺されるが, k , tu では殺されない。他は一般に殺されることが知られる。又 ϵ^{34} で殺される菌株では, 生残り集落の中に 34 抗原をもつもの (ϵ^{34} で溶原化されたもの) が多数見出されるが, ϵ^{34} で殺されない菌株では抗原 34 をもつ集落も見出されない。交叉塗抹法で溶菌をしらべても全く同様の成績が得られた。

この所見は一方では 85, II-2 と 86 の菌細胞が 84 や II-1 と異なる性質をもつこと, 体方では k , tu と K, Tu が異なる性質をもつことを示すものであろう。

2, 吸着

NAKAGAWA Akihisa, UCHIDA Takahiro, MAKINO Toshikazu and HAGIWARA Shin: Comparative Studies of Mutants of Phage ϵ^{34} Department of Microbiology, Sapporo Medical College—Jap. J. of Bact., 14 (10), 845-847, 1959.

Table 2. Killing of cells by mutants of $\mathcal{E}^{34}$

bact. cell	phage	Cells killed by infection with phage			
		K	Tu	k	tu
		%	%	%	%
84		95.6 (8/ 8)	93.6 (0/ 8)	25.0 (7/ 8)	28.3 (5/ 8)
85		0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)
86		45.4 (3/12)	49.8 (3/20)	0 (0/20)	0 (0/20)
II-1		96.0 (7/ 8)	94.3 (6/ 8)	86.0 (3/ 8)	69.4 (5/8)
II-2		0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)

Phages employed were those propagated on *S. newington* (=84).

Overnight broth cultures were diluted to 2×10^7 /ml, in broth, mixed with equal amount of phage suspension (1×10^8 /ml), and kept at room temperature for 30 min. before plating.

Figures in parentheses indicate number of antigenic variants per number of colonies tested.

Table 3. Adsorption of $\mathcal{E}^{34}$ mutants onto E_2 cells

bact. cell	phage	Adsorption rate constant ($\times 10^{-6} \text{min}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$)			
		K	Tu	k	tu
84		1.31	3.54	2.66	5.64
85		1.58	1.12	0.78	0.90
86		3.26	5.54	2.20	5.01
II-1		2.72	5.34	3.06	6.54
II-2		0.69	0.63	0.89	0.61

Table 4. Serological comparison

anti-phage serum	Specific neutralization rate constant			
	k _K	k _{Tu}	k _k	k _{tu}
anti-Tu	121	164	78.3	144
anti-k	54.6	51.9	43.8	46.3
anti-tu	117	131	71.4	119
anti-K ₂	286	262	137	262

Mixture of phage and anti-phage serum was kept at 37°C, and samples were removed and assayed for free phage at 3, 6, and 10 minutes after mixing. Figures indicate average k.

上の実験で殺されないのは phage を吸着しない為か、それとも別の理由によるものであろうか？ 吸着をしらべてみると Table 3 に示す様に「殺されない組合せ」でも phage の吸着はおこることが知られる。かゝる組合せでは吸着の余りよくない場合もあるが（例えば II-2 の場

合や 85 と k, tu との組合せ), 吸着の相当よい場合もある (86 と k, tu の組合せ 85 と K, Tu との組合せ)。

3. 血清学的比較

交叉中和試験で比較すると Table 4 に示す様に, k phage だけが他の 3 者と異なる性質を示すことが知られる。即ち k phage は抗 K, 抗 Tu や抗 tu の血清による中和の度合が他の 3 者に比べ約 $1/2$ である。然し抗 k 血清は 4 者とほぼ同程度に中和する。この事は k phage は他の phage と抗原的に異なることを示すものである。

4. 潜伏期と放出量

Table 5 に示す様に K, Tu, k の潜伏期はほぼ同じであるが, tu は少し長い, 又 *S. newington* を用いたときと *S. anatum do*⁵⁾ を用いた時では少し違っている。尚 K の系統に属する phage で *S. anatum do* で潜伏期 30~35 分, 放出量約 100 と云う株も分離されている。

放出量はかなりのひらきがあり, 約 40 から約 120 である。

Table 5. Latent periods and burst sizes

		K	Tu	k	tu
<i>S. newington</i>	latent period (min.)	40—45	40—45	40—45	45—50
	burst size	43	126	38	75
<i>S. anatum do</i>	latent period (min.)	35—40	35—40		
	burst size	34	127		

総括考按

S. thomasville から分離された $\mathcal{E}^{34}$ phage で溶菌班形態を異にする K と Tu, *S. illinois* から分離された $\mathcal{E}^{34}$ phage で溶菌班形態を異にする k と tu の 4 者を比較した結果, 溶菌班形態, 抗原変換誘導能力, 吸着性以外の種々の性状にも差のあることが明かになった。

即ち *S. newbrunswick* (=86) を用いてしらべると k, tu は K, Tu とはつきり異り 86 で溶菌班作らず, 又 86 を殺しもしない (Table 1 及び 2)。尤も少数 (1~10% 以下) の菌細胞が殺されたのならこの方法では発見出来ないから, その可能性は否定出来ないが。

又中和試験でみると k は抗 k-血清を用いた時は他の phage と同じ程度に中和されるが, 抗 K, 抗 Tu, 抗 tu を用いると K, Tu, tu より中和され方がのろい。この事は k phage が他の phage のもつ抗原の一部を欠く為かも知れない。ともあれ k が他の phage と少し異なること

Table 6. Summarized properties of various phage strains

	phages			
	K	Tu	k	tu
Killing of <i>S. newbrunswick</i>	+	+	—	—
Adsorption onto <i>S. newbrunswick</i>	good	good	good	good
Plaque formation on <i>S. newbrunswick</i>	+	+	—	—
Neutralization			different	
Burst size	40	120	40	75
Plaque type* on <i>S. newington</i>	I	II	I	II

* see Nakagawa (1957)^{2) 3)}

を示すものである。

又 k は放出量においても tu と異なる。

一方 K, Tu は溶菌班以外の諸性状は割によく似ているが、放出量の上でははつきり異り、K は Tu より低い。

尚特に注目されるのは85及II-2とこれら4 phage との関係、及86と k, tu の関係である。溶菌班も形成され

ないし菌細胞が殺されもしないのであるが、吸着は起るのである。就中 k, tu の86への吸着は全く普通の程度であり、K, Tu の85への吸着も少し低い程度でそれ程悪くはない。これらの場合吸着された phage はどうなるのであろうか。その後の研究によると phage 核酸は菌細胞に注入されるにも拘らず、菌細胞が殺されないことが明かになっているが、これについては別報でのべる。

結 論

S. thomasville 及 *S. illinois* から夫々分離した ϕ^{34} の4株の性状を比較し、溶菌班の形、抗原変換誘導能力、吸着性の外宿主域、中和試験、放出量、*S. newbrunswick* に対する態度等の上で種々性状を異にし互に区別されることを明かにした。

文 献

- 1) 中川(昭)：投稿中。
- 2) 中川(昭)：日本細菌学雑誌, **12**, 47 (1957)
- 3) 中川(昭)：日本細菌学雑誌, **12**, 107 (1957).
- 4) Adams, M.: *Methods in Medical Research* **2**, 1 (1950).
- 5) Uetake, H.: *Virology in Press*.