バクテリオファージに関する研究

3. ファージ感受性菌と抵抗性菌について

緒 方 正 一

國立龜川病院

〔受付: 6月16日, 1950年〕

細菌がバクテリオファージ(以下「フ」と略する)と共に存在すると一部抵抗性に変異するものとせられ、細菌に「フ」を作用させて抵抗性菌を分離しその性状については詳細研究せられているが¹⁾²⁾、抵抗性菌の発生については明確でなく、Gratiaは大腸菌の同一株より「フ」抵抗性菌と感受性菌とを分離し³⁾、私も同様な例を経験したので、さらに「フ」と菌間の反応の種々の例を詳細に観察した結果、不完全溶菌する数例の「フ」菌株間において、その菌株中に「フ」感受性菌と抵抗性菌とが存在し、発育増殖の経過中感受性は一部抵抗性菌へ、抵抗性菌は一部感受性菌へ移行することを認めた。この相互の移行は不完全溶菌例において著明であつて、完全溶菌例ではその傾向は少い。従てその感受性菌或は抵抗性菌は前者では不安定、後者の場合は安定しているが、後者の場合もその抵抗性菌は感受性菌へ移行する傾向を有することを知りえた。細菌のかような性状により、「フ」の増強検出の場合同一菌株でも集落の選択により容易に「フ」を増強証明しうる場合と、「フ」は増強されてもそれを証明しえない場合とがあることを観察したので、それらの実験結果を報告する。

實驗と結果

1. 純粋培養菌株中の感受性菌と抵抗性菌

上に述べたような不完全溶菌する「フ」と菌株の例、即ち第1表に示すようにパラチフスB菌相沢株とS-1「フ」パラチフスA菌1015株とS-2「フ」、大腸菌No. 15株とS-3「フ」の間において実験した。大腸菌No. 15株は健康者糞便より分離したImvic 反應+ + - -のE. coliであつて、本実験と以下各実験に使用した「フ」は前報⁴⁾⁵⁾にその由来と性状を記載してある。

以上の菌株をブイオン24~48時間培養後寒天平板に分離し、個々の集落それぞれ数十個ずつを別々に寒天平板に塗抹して対応する「フ」を作用させ、各集落の溶菌作用の程度を調べた結果第1表の如く、各菌株とも個々の集落はそれぞれ「フ」に対する感受性の程度を異にし、その中に全く「フ」に作用されない抵抗性菌集落の存在を認めた。

第1表 純粋培養菌株中に於ける
感受性菌と抵抗性菌

菌 株	對應「フ」	感受性及抵抗性集落數					計
		卅	卅	+	±	-	
パラチフスB菌 相 澤	S-1	0	4	13	0	3	20
パラチフスA菌 1015	S-2	2	4	9	15	2	32
大腸菌 No. 15	S-3	0	15	10	4	11	40

註) 卅は全面完全溶菌、卅・+・±は溶菌作用の程度、-は陰性、以下各表に於ても同様。

次に、各例において最も感受性の強い集落と完全な抵抗性集落の各々2個ずつをブイオン通過後平板に分離し、各菌株につき集落20個ずつをとり、前と同様にして対応する「フ」を作用させた結果、第2表の如く、感受性集落よりは一部感受性菌と生じ、かつ前の実験と同様に個々の集落はそれぞれ対応する「フ」に対する感受性の程度を異にした。

第2表 感受性菌抵抗性菌相互の移行

菌 株	感受性(Se) 及抵抗性 (Rt)菌No.	對應 「フ」	感受性及抵抗性 集落數				計
			卅	+	±	-	
バラチフ スB菌 相澤	Se { No. 1 " 2 Rt { No. 7 " 8	S-1	4 9 4 0	11 8 3 6	4 1 2 1	1 2 11 13	20
バラチフ スA菌 1015	Se { No. 25 " 30 Rt { No. 3 " 11	S-2	0 8 0 2	3 3 11 3	5 4 4 5	12 5 5 10	20
大腸菌 No. 15	Se { No. 31 " 32 Rt { No. 1 " 2	S-3	0 6 0 0	5 7 2 3	5 3 7 7	10 4 11 10	20

OGATA, Masakazu: Study on bacteriophage(III) Phage-sensitive and resistant cells in bacteria. Japan. J. Bact. 5(6): 375-379, 1950.

本論文の概要は第23回日本細菌學會總會に報告した

第3表 「フ」の作用に依つて分離した抵抗性菌と各「フ」との作用關係

菌 株	パラチフスB菌 相澤						パラチフスB菌 8006					
	感受性菌	S-1「フ」抵抗性菌 No.				S-3「フ」抵抗性菌 No.	感受性菌	S-1「フ」抵抗性菌 No.		S-3「フ」抵抗性菌 No.		
		1	3	5	8	1		10	14	10	11	12
S群「フ」	{ S-1, S-2	++	—	—	—	+	+	+	++	—	—	++ ++ ++
	{ S-3... 6	++	—	++	++ ++	—	—	—	++ ++	—	—	—
R群「フ」	R-1... 4	—	—	—	—	—	—	—	++ ++	++ ++ ++		

2. 「フ」の作用によつて分離した抵抗性菌とその性状
 パラチフスB菌相沢株は S-1「フ」に対しては強い抵抗性を示すが、S-3「フ」に対しては滴下面はほとんど完全に溶菌せられ、パラチフスB菌 8006株は S-1と S-3「フ」に対して同様に完全に溶菌せられて明瞭な空孔を作る。かような完全溶菌する例では、前と同様に集落の選択により容易に抵抗性菌を分離することはできないが、S-1と S-3「フ」を寒天平板に濃厚に塗抹して乾燥し、その上に各菌株のやゝ濃厚な菌液を塗抹して24時間培養すると、数個の集落を生じ、その中より抵抗性菌を分離しうる。この際、感受性菌は「フ」の作用によつて溶菌されるものとすれば、ここに分離された抵抗性菌は本来「フ」に対して抵抗性を有する菌であると考えられる。

相沢株の S-1「フ」抵抗性菌は「フ」を使用することなく容易に分離しうるが、対照の意味において S-1「フ」を塗抹した平板に相沢株の稀薄な菌液を塗抹して一夜培養し、生じた集落中より抵抗性菌数個を分離して前と同様の方法で感受性菌への移行の有無を調べた結果、自然に分離した抵抗性菌と同様に培養中一部感受性菌へ移行することを認めた。なお、この実験において分離した抵抗性菌集落4個中1個は完全な S-3「フ」抵抗性菌、他の3個は S-3「フ」感受性菌であつて、S-3「フ」との間においてはこの方法では感受性菌抵抗性菌相互の移行を証明しえなかつた。

次に、S-1と S-3「フ」を使用して分離した相沢株と8006株の抵抗性菌それぞれ数個ずつを平板に塗抹して数株の「フ」を作用させた結果第3表の如く、相沢株の S-1「フ」抵抗性菌1株は S-1と S-2「フ」のみならず S-3...6「フ」に対しても完全な抵抗性を示したが、他の例では S-1と S-2「フ」に対する抵抗性菌は他の数株の「フ」に対しては原株と同様に作用せられ、またこの関係は S-3...6「フ」抵抗性菌においても同様であつた。即ち、同一菌株中の抵抗性菌は「フ」の異なるに従いそれぞれ

別個のものである。

3. 抵抗性菌による「フ」の増強と空孔形成の阻止

1で実験した不完全溶菌する「フ」菌株間における抵抗性菌のように、抵抗性菌としての状態が不安定であつて感受性菌へ移行する傾向の強い例(第2表参照)においては、抵抗性菌で「フ」を増強しても培養増強中生じた感受性菌によつて「フ」は増強されうるのであるが、その程度には難易があり、また抵抗性菌の多い菌株によつて検査された場合は「フ」は増強されてもどの程度までそれを平板に証明しうるか問題となる。よつて、以上の中2例の「フ」と菌株との間において、抵抗性菌による「フ」の増強と空孔証明の程度との関係を調べた。即ち、1の実験において分離した抵抗性菌を寒天斜面に純培養し、同一斜面の菌苔をとつて対応する「フ」を稀釈的に増強累代し、「フ」の増強の程度を観察するとともに、同じ斜面の菌苔をとつて寒天平板に塗抹し対応する「フ」を作用させて対照の感受性菌に対する作用と比較し、空孔形成阻止の程度を観察した。

S-1「フ」を相沢株の抵抗性菌で増強累代した結果は第

第4表 相澤株抵抗性菌に依る「フ」の増強と溶菌作用の阻止

使用「フ」	増強菌相澤株(抵抗性)菌	I		II		III		IV			
		8006	相澤株	8006	相澤株	8006	相澤株	8006	相澤株	Rt No. 7	Rt No. 8
S-1「フ」 (10 ⁻²)	No. 7	++	++	++	++	++	++	++	++	± ±	± ±
	No. 8	++	++	++	++	++	++	++	++	± ±	± ±
	対 照	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

4表の如く、「フ」は明かに増強せられて8006株と相沢株の感受性菌に対してははかなり明瞭な空孔を作るが、増強に使用した抵抗性菌に対しては明瞭に空孔を認めえな

い。なお、こゝに使用した抵抗性菌2株は元の集落中の菌をとつて平板に塗抹し S-1「フ」を作用させても全く空孔を認め得ないが、1回斜面培養を通過したものをもつてすると溶菌作用が微弱に認められる。即ち、かような感受性抵抗性の不安定な菌株では、1回培地を通過することにより一定度の感受性菌を生じたものと考えられる。

次に、大腸菌 No. 15 株の抵抗性株で S-3 と S-4「フ」を増強累代した結果は第5表の如く、2「フ」ともに抵抗

第5表 大腸菌 No. 15 株抵抗性菌に依る「フ」の増強と溶菌作用阻止

使用「フ」	増強菌 (大腸菌 No. 15 Rt.)	I		II		III				IV			
		8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006
S-3「フ」 (10 ⁻²)	No. 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	No. 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	対 照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S-4「フ」 (10 ⁻²)	No. 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	No. 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	対 照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

註) 孤立した空孔を作るものを + 或は ± として不完全溶菌と區別した。後の表に於ても同様。

性菌によつて増強せられるが、感受性菌に対しては全面溶菌する程度の「フ」も、増強に使用した抵抗性菌に対しては極めて微弱に作用するか、または全く溶菌作用を認めず、感受性菌に対して全面溶菌しない程度のものは抵抗性菌によつては全くその作用を証明しえない。

上の2例は不完全溶菌の例であつて、その菌株の抵抗性感受性は不安定で相互に移行する傾向が強い。これに反し、2の実験中 S-3「フ」と 8006 株と相沢株との間では殆んど完全に溶菌せられ、その感受性抵抗性は極めて安定し、集落の選択によつて相互の移行を証明しえない。かような完全溶菌例における抵抗性菌により「フ」の増強如何を検した。即ち、2の実験において分離した 8006 株と相沢株の S-3「フ」抵抗性菌各々2株ずつを使つて S-3「フ」を増強累代した結果、「フ」は全く増強されなかつた。よつて、各抵抗性菌を数回または数日間ブイオン培養してその1白金耳ずつを移植し S-3「フ」を増強した結果、ブイオン10日間培養菌をもつてした場合第

第6表 ブイオン10日培養抵抗性菌に依る對照「フ」の増強

使用「フ」	増強菌 (S-3「フ」 抵抗性菌)	I		II		III		IV	
		8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006
S-3 「フ」 (10 ⁻²)	8006 { 3-11	+	+	+	+	+	+	+	+
	3-12	+	+	+	+	+	+	+	+
	相沢 { 3-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	3-2	+	+	+	+	+	+	+	+
対 照		+	+	+	+	+	+	+	+

6表の如く、相沢3-2株においてや「フ」の増強を認めた。これはさらに実験を重ねた結果必ずしも同様の成績はえられなかつたが、3-1株は「フ」を増強せず、3-2株は「フ」を増強する傾向を示した。なお、これは次の実験によつても確認せられた(第8表参照)。

以上により、「フ」は抵抗性菌によつて増強されるものではなく、培養増強中に抵抗性菌より一定量の感受性菌を生じた場合それによつて増強されるものと考えられる。従て抵抗性菌株でも感受性菌へ移行する傾向の強い菌株によつては「フ」はよく増強せられるが、抵抗性が安定し感受性菌へ移行する傾向の弱い菌株によつては増強が困難なわけである。即ち、「フ」を増強しうる抵抗性菌株は感受性菌へ移行する傾向が一定度以上の菌株でなければならぬが、これはまた増強累代の際の培地の量と「フ」の移植量によつても異なり、一定の培地量においては移植する「フ」の量が少なければ増強程度の弱い場合はそれを認め難く累代も困難なわけであつてその程度は明かにしえないが、本研究を通じて行つた増強累代の方法(前報に記載)で証明しうる程度に「フ」を増強しうる抵抗性菌と感受性菌との量的関係を知ること、以上の実験を批判する上にも又実際の「フ」の検索にも必要と認められたので、相沢3-1と3-2株を使用して次の実験を行つた。

4. 「フ」の増強と空孔証明の程度と抵抗性菌と感受性菌の量的関係

S-3「フ」に対する相沢株の抵抗性菌と感受性菌とを種々の割合にして、「フ」の増強と空孔証明の程度を観察した。

使用した抵抗性菌は相沢3-1と3-2の2株であつて前の実験において、前者はほとんど感受性菌へ移行せず、後者はブイオン培養の日数を重ねることにより感受性菌へ移行する傾向を有することを認めた。感受性菌は

相沢株を平板に分離し、感受性集落1個を拾つて純粹培養し、次のように実験した。

イ) 抵抗性菌の一定量に感受性菌を 1:1, $1/10$, $1/50$ の割合に加えて寒天平板に塗抹し、S-3「フ」の原液と 10^{-1} ... 10^{-5} 移液液を作用させた結果第7表の如く、原液と各稀釈液とも同様に、抵抗性菌と感受性菌との比 1:1 において既に空孔の証明は困難で $1:1/10$ においては全く証明しえない。この成績は 3-1 と 3-2 株とも同様であつた。

ロ) 抵抗性菌の一定量に感受性菌を種々の量に加えて

第7表 感受性菌低抵抗性菌の量的関係と空孔証明の程度

抵抗性菌：感受性菌	S-3「フ」					
	原液	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
(対照) 0:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
相澤 Rt 3-1	1:1	±	±	±	±	±
	$1:10^{-1}$	—	—	—	—	—
	$1:10^{-2} \times 2$	—	—	—	—	—
相澤 Rt 3-2	1:1	±	±	±	±	±
	$1:10^{-1}$	—	—	—	—	—
	$1:10^{-2} \times 2$	—	—	—	—	—

第8表 感受性菌低抵抗性菌の量的関係と「フ」増強の程度

使用「フ」	増強菌株 抵抗性菌：感受性菌	I				II				III				IV			
		8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006	8006
S-3	1:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	$1:10^{-1}$	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	相澤 Rt 3-1 $1:10^{-2} \times 2$	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	$1:10^{-2}$	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	$1:10^{-3}$	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	$1:10^{-4}$	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(10 ⁻²)「フ」	1:0	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	$1:10^{-1}$	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	相澤 Rt 3-2 $1:10^{-2} \times 2$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	$1:10^{-2}$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	$1:10^{-3}$	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
対照	$1:10^{-4}$	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1:0	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1:1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	対照	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

S-3「フ」を増強累代した結果第8表の如く、相沢 3-1 株においては $1:1/10$ においては明かに累代できる程度に「フ」が増強せられたが、 $1:10^{-2}$ 以下においては全く増強の傾向を示さず、これに反し、3-2 株においては $1:10^{-2}$ まで著明に増強せられ、 $1:10^{-3}$ においても増強の傾向を認めた。この抵抗性菌 2 株が発育の程度が同等であつて、加えられた感受性菌を同じ程度に発育せしめうるものとすれば、本実験においても 3-2 株は培養中一定度感受性菌へ移行するものと考えられ、抵抗性菌の存在において「フ」を増強しうするための抵抗性菌と感受性菌との量的関係の限界は $1:1/10 > 1/50$ となるが、イ) の実験より見るとこの程度の割合においては寒天平板法で全くその「フ」を証明しえない。

考 按

「フ」細菌間の反應の際、完全溶菌する場合と不完全溶菌する場合とがあるが、私は不完全溶菌の著明な例において、その菌株中に「フ」感受性菌と抵抗性菌とが存在し、この両者は培養経過中一定度相互に移行することを認めた。かような例ではその菌株中に抵抗性菌が比較的多く、集落の選択より容易にそれを分離しうが、その抵抗性は不安定であつて、培養経過中感受性菌へ移行する傾向が強く、数回培地を通過すると感受性菌と抵抗性菌との量的割合は一定して元の菌株とほぼ同様になる。この感受性菌抵抗性菌相互の移行によつて、菌株としてはその「フ」に対する感受性または抵抗性を一定に保つ。また、不完全溶菌の例も種々の程度のものがありうるわけで、それによつてその相互の移行傾向も異なるわけであるが、集落の分離後一定期間はその性状を保持し、従て前の実験におけるように、同一菌株でも集落の選択により「フ」の増強証明の際異つた成績を示すことになる。これに反し、完全溶菌する例においては、その菌株中の殆んどすべてが感受性菌であつて抵抗性菌の数は極めて少く、集落の選択により抵抗性菌を分離することは困難である。かような例においてはその感受性菌と抵抗性菌は極めて安定し、継代しても永くその性状を変化しない。また、この場合は前と同様に集落の選択により相互の移行を証明しえないが、抵抗性菌による「フ」の増強の程度を調べることににより、それが一定度感受性菌へ移行する傾向を有することを知りえた。しかしその証明は困難であつて、前に実験した例のように感受性菌への移行を証明しえた菌株でも、通常行ふ方法では全く「フ」の増強を証明しえない。従つて、かような完全溶菌例における安定した感受性菌または抵抗性菌は同一菌株に由来するものであつても「フ」の作用より見ると全く異つた菌株と見

なされる。

結 論

1. 純粹培養菌株中には一つの「フ」に対する感受性菌と抵抗性菌とが存在し、發育増殖の経過中感受性菌は一部抵抗性菌へ、抵抗性菌は一部感受性菌へ移行する。

2. 一菌株中の感受性菌と抵抗性菌とその量的關係並に相互の移行の程度は對應する「フ」の異なるに従つて相違する。

3. 抵抗性菌は「フ」を増強せず、培養増強中抵抗性菌より生じた感受性菌によつて「フ」が増強せられる。

4. 抵抗性菌の多い菌株と「フ」との間においては寒天平板法でその作用を認め難く、孤立した空孔を作ることが困難であるか、または全く空孔を証明しえない。

終りに臨み小林六造博士、恩師福留勇博士の御校閲を

衷心より感謝する。

文 獻

- 1) 八木重喜：サルモネラ菌屬バクテリオファージのタイロファージに就て。細菌學雜誌, 537-560, 昭3 (1928).
- 2) 赤堀四郎, 田宮博：酵素化學の進歩, 342, 昭24 (1949).
- 3) 姜肇郁：グラム陰性腸内細菌のS型R型とバクテリオファージとの關係に就て。細菌學雜誌, 646-655, 昭9 (1934).
- 4) 緒方正一：バクテリオファージに関する研究(1) 汚水より分離したバクテリオファージとその Te-
ilphage に就て。日本細菌學雜誌, 5 (6), 367, 1950.
- 5) 緒方正一：バクテリオファージに関する研究(2) 細菌の S-R 型變異とバクテリオファージの作用との關係。日本細菌學雜誌, 5 (6), 371, 1950.