バクテリオファージの増殖におよぼす鉄の影響

I. 牛肉トリプシン消化培地についての実験

松 本 稔 岩 佐 三 郎

東京大学傳染病研究所第四研究部 (部長 長野泰一教授)

水 野 傳 一

国立予防衛生研究所

[受付: 1 月 22 日, 1951 年]

バクテリオファージの増殖に直接間接に影響する化合物はいろいろ知られているが¹⁻⁴⁾、無機物質についてあまり研究されていない。ファージの増殖にイオンの存在の必要な事は古くから知られている。Spizizen は glycine anhydrate のみを含む菌増殖のない特別な phage growth system⁵⁾を用いて、重金属イオンの影響をしらべ、 Fe^{++} 、 Fe^{+++} 、 Mn^{++} 、 Mg^{++} がファージの増殖に与える結果をもたらすことをみている⁶⁾。Scribner & Krueger⁷⁾は 0.25 M NaCl を含む肉汁中でファージによるブドウ球菌の溶菌に要する時間が延長することを報告し、ファージの増量をみとめている (lytic threshold の増加)。また Krueger & Strietman は $1/8$ M Na_2SO_4 の存在において同様のことを報告している⁸⁾。 Ca^{++} がいくつかのファージの増殖⁹⁾²⁰⁾、およびその安定性¹⁰⁾¹¹⁾に重要な役割をはたしていることはよく知られている。Gest はファージによる溶菌斑形成に及ぼす 1 價、2 價の陽イオンの影響をしらべている¹²⁾。いずれにしてもファージ増殖と重金属との関係については研究が少い。

チフス菌ファージを牛肉トリプシン消化培地に培養中、たまたま培地の除鉄操作がファージの増殖に影響することに気がつき、この問題を検討し、このファージの増殖と、培地中の鉄との間に密接な関係のあることをたしかめた。

材料と実験法

菌 チフス菌 S₅₇ 株。使用にあたり普通寒天斜面培養菌を除鉄トリプシン消化培地に移植し、18 時間 37°C に培養した。

ファージ 当研究室でニワトリの糞から分離した Ty 1 株。平板培養の溶菌斑からの分離培養を 5 代くりかえした後実験に用いた。このファージを菌とともに普通ブイヨンで 37°C 18 時間培養後、ベルケフェルド濾過器 (W) で濾過、その濾液をファージ液としてつかつた。これは

4°C の冷蔵庫におけば、少くとも数カ月はさしてファージ量の減少をきたさなかつた。

トリプシン消化培地 Pope & Smith¹³⁾ の法に準じ、牛肉からつくつた。たゞし糖は加えてない。pH は 7.0~8.0。除鉄は磷酸カルシウムを用いておこなつた。除鉄後の培地は 20 ml あたり 4~5 r 程度の鉄を含んでいた。

鉄定量法 Mueller & Miller¹⁴⁾ および Shinohara¹⁵⁾ の法に準じておこなつた。

ファージ定量法 Agar layer method によつて行つた¹⁶⁾。

鉄 再結晶を 2~3 回行つた 硫酸第一鉄アンモン、または硫酸第一鉄を用いた。原液として 100 r F⁺⁺/ml の液を調製した。

実験にあたり全器具、全操作はすべて外部からの鉄の混入をできるだけ防いだ。

実 験

(1) 培地の除鉄とファージの増殖

コルベン (20 ml) に除鉄した、および無処置のトリプシン消化培地を 5 ml ずつ分注、これに除鉄トリプシン消化培地に 18 時間培養した菌液 0.03 ml、ファージ液 0.02 ml 加え、37°C に培養、時間的にファージの定量を行つた。いくつかの実験において同様成績がえられたが、その中の一例を表 1 にしめた。表にみるように、除鉄培地は無処置培地よりファージの増殖がよい。実験

MATUMOTO, Minoru, IWASA, Saburo, & MIZUNO, Denichi: Effect of iron on multiplication of bacteriophage. I. Experiments with trypsin digested beef media. Japan. J. Bact., (From Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo, Tokyo, and National Institute of Health, Tokyo, Japan)

第1表 牛肉トリプシン消化培地における除鉄操作とファージの増殖との関係、とニコチン酸アミド添加の影響

培養時間	培地		除鉄	
	無処置	無処置 + ニコチン酸アミド**	除鉄	除鉄 + ニコチン酸アミド**
0	1.71×10^7 *	2.12×10^7	1.74×10^7	1.52×10^7
	2.11×10^7	2.17 "	1.95 "	1.90 "
	1.92×10^7	1.81 "	1.96 "	1.96 "
6	3.1×10^8	5.0×10^8	2.54×10^9	3.50×10^9
	2.7 "	4.7 "	2.87 "	4.54 "
	3.1 "	6.2 "	2.49 "	4.06 "
10	2.8×10^9	3.6×10^9	3.66×10^{10}	3.68×10^{10}
	2.7 "	4.0 "	3.22 "	3.74 "
	3.1 "	3.8 "	3.50 "	3.77 "
23	4.5×10^{10}	4.7×10^{10}	1.15×10^{11}	1.16×10^{11}
	3.7 "	5.2 "	1.23 "	0.89 "
	5.1 "	5.7 "	1.16 "	1.16 "
52	1.20×10^{11}	—	2.06×10^{11}	—
	1.23 "	—	1.94 "	—
	1.39 "	—	1.95 "	—

チフス菌 S₅₇ 株, ファージ Ty₁ 株

培地の鉄含量: 除鉄培地 4~5 r/20 ml

無処置培地 8 r/ml

培地の pH 8.0

* 培地 1 ml 中のファージ数 (Agarlayer method)

** 10^{-3} M/ml に加えた。

によつて多少の動揺はまぬかれませんが, およそ両者の間に10倍の差があつた。この差はファージ測定の際のピペット操作による誤差その他の実験誤差以上のものであることがたしかめられた。

(2) 培地の除鉄と菌の増殖

上の実験で明らかにされたファージ収量の差の原因がこれら培地における菌の増殖の差に求められるかもしれない。そこで上記の培養条件でファージを加えずに菌だけを培養してみた。平板法によつて生菌数を時間的におつてみると, 両培地間の菌の増殖の差がみとめられなかつた。したがつて上記の事実は菌の増殖の差からは説明できない。

(3) 除鉄培地に鉄を加えた場合

以上の実験によつて培地中の鉄の含量がファージの増殖に影響しているように思える。これをさらにたしかめるため, 除鉄培地に鉄を 10 r/ml の割合に加えて, ファージの増殖をみた (表2)。予期したように, 鉄を加えた培地では加えない培地に比べファージの増殖が悪かつた。したがつて培地中の鉄の含量がファージの増殖に影響を與えていることが確実となつた。なおこの場合にお

第2表 除鉄牛肉トリプシン消化培地に鉄を加えたときのファージの増殖

培養時間	培地	
	除鉄	含鉄
0	4.11×10^7	4.21×10^7
	4.00 "	3.91 "
3	3.53×10^8	8.7×10^7
	3.16 "	8.6 "
6	2.62×10^{10}	5×10^8
	—	—
24	6.2×10^{10}	6.8×10^{10}
	6.2 "	9.4 "

培地の鉄含量: 除鉄培地 4~5 r/20 ml

含鉄培地 Fe⁺⁺ 10 r/ml に加えた

いても菌だけの培養には鉄の添加は影響がなかつた。

(4) ファージの増殖に対する鉄の作用とニコチン酸アミド

Racker & Krimsky¹⁶⁾ はマウス脳乳剤の Glucose phosphorylation に対する Fe⁺⁺ の抑制作用が Cozymase によつて恢復するが, ニコチン酸アミドではその代用はできないことをみている。そこでこの鉄によるファージ増殖の抑制がニコチン酸アミドによつて恢復されるかどうかしらべてみた。

培養条件は実験(1)と同じであるが, 除鉄および無処置培地のほかに, この両者にニコチン酸アミドを 10^{-3} M/ml に加えたものをおいた (表1)。除鉄および無処置培地ともニコチン酸アミドの添加によつてファージの増殖にほとんど影響なく, 鉄によるファージ増殖の抑制はニコチン酸アミドによつて恢復しなかつた。

また表にはしめさなかつたが, 以上4者の培地の菌増殖には差がみとめられなかつた。

(5) 培地の除鉄とファージの安定性

この現象が培地中におけるファージの安定性の差によつては説明しえないことが明らかになつた。即ち除鉄培地とこれに鉄を 10 r/ml の割合に加えたものにファージを加え, 37°C に24時間にわたつて活性ファージ量を測定した結果, 両培地の間にファージの不活化に差がみとめられなかつた。

(6) One-step growth による実験

Delbrück & Luria¹⁷⁾ によつて行われたファージの One-step growth 法によつて, 培地中の鉄のファージ増殖曲線におよぼす影響をしらべた。

18時間菌培養液 0.1 ml を除鉄培地または普通肉エキス・ブイヨン 9.9 ml に加え, 振盪培養2時間半おこない

第3表 *S. enteritidis* と Ty₁ ファージ株の場合

培養時間	培地	除 鉄	含 鉄
0		1.88×10^7	1.36×10^7
		1.40 "	1.29 "
19		2×10^8	4.2×10^9
		0 "	4.8 "
		0 "	4.0 "

培地(牛肉トリプシン消化培地)の鉄の含量:

除鉄培地 4r/20ml

含鉄培地 Fe⁺⁺ 8r/ml に加えた。

(およそ菌数 10^7 /ml), この 0.9 ml にファージ液(およそファージ数 10^8 /ml) 0.1 ml を加えてまぜ, 5分後除鉄培地で 1:10,000 にうすめる。その 1 ml を除鉄および含鉄培地 9 ml にまぜ, 振盪培養を行い, 時間的にファージ量を測定した。いくつかの実験から, このファージのトリプシン消化培地での One-step growth 曲線は, ファージ液調製のその日に行わなければ, きれいに画くことができないことがわかった。しかしファージ液を agar layer method で定量すると, その力價は貯藏中すこぶる安定で, 上記の現象はファージ力價の低下に原因するものではない。

成績の一例を図1に示した。図にみるように両培地の間に差がみとめられない。しかしこのような典型的な曲線はこの培地ではえにくいもので, 非常に不規則な曲線をえがくこともあつた。しかしいづれにしても両培地の間にはつきりした差は認められなかつた。しかし上記によつてこの培地がこのファージ菌系にたいしては One-step growth に不適当な培地であることは明らかで, 検討の余地があるものと思われる。

(7) ファージ Ty₁ 株と *Sal. enteritidis* 1891 株の場合
以上明らかにされたファージ Ty₁ とチフス菌 S₅₇ 株との組合せにおけるファージ増殖と鉄との関係を Ty₁ ファージに感受性のある *Sal. enteritidis* 1891 株の場合についてしらべた。

実験は(3)にのべたと同様に行つた。たゞしこのさいは 40 ml のコルベンを用い, 鉄は 8 r/ml に加えた。表3に結果をしめす。この場合はチフス菌 S₅₇ 株と逆で, 鉄を加えた培地の方がファージの増殖により結果を興えている。この *S. enteritidis* の除鉄, 含鉄培地における増殖をもしらべたが, やはり両培地の間に差がなかつた。

同様実験條件で *Esch. coli* とそのファージを用いてファージの増殖をしらべたが, 鉄の添加はファージの増殖に何ら影響しなかつた。

第1図 牛肉トリプシン消化培地における One-step growth curve におよぼす鉄の影響

〔註〕 使用した培地製品は表2と同じもの

考 案

チフス菌 S₅₇ 株のファージ Ty₁ 株感染において牛肉トリプシン培地に除鉄操作を行うと, ファージの増殖がよくなり, またこの除鉄培地に Fe⁺⁺ を加えると, ファージの増殖が抑制される。これらの事実はファージの増殖に培地中の鉄が影響していることをしめしている。この現象は菌の増殖率, あるいはファージの安定性の差からは説明がつかないことが実験的にしめされた。

次報⁽⁸⁾に示すが, この現象は同じファージ・菌についての肉エキス・ブイヨン, 合成培地における成績と対称的である。即ち肉エキス・ブイヨンと合成培地の場合は鉄の存在はファージの増殖を促進する。このこと, あるいは上記の *Sal. enteritidis*, *Esch. coli* などの実験成績の差は各培地におけるファージ増殖に関与する代謝系の差異によるものと思われる。このことは次の実験成績からもうなずかれる。前にも記したように, トリプシン消化培地において Ty₁ ファージの One-step growth 曲線は, ファージ液調製のその日に用いなければ, きれいにえがけないにもかかわらず, 肉エキス・ブイヨンにおいてはこのようなことはない。しかも消化液の製品によつてはファージ調製の日といえども不規則な曲線をえがくことがある。また同じ菌量, ファージ量で出発してファージを増殖せしめた場合, 肉エキス・ブイヨンの方がトリプシン消化培地より最初すみやかに増殖するが, 終末價はトリプシン消化培地の方がかえつて大である(約10~50倍)。これらのこみいつた関係の解明はすこぶる困難で今のところ何もわかつていない。こゝにのべた実験ではたゞ培地中の鉄とファージの増殖との間に関係のあるという事実が明らかにされただけで, その機序については今後明らかにされねばならない。

結 論

1. 牛肉トリプシン消化培地でのチフス菌 S₅₇ 株に対

應するファージ Ty₁ 株の増殖は、鉄の存在によつて阻害される。

2. この鉄の影響は菌の増殖、ファージの安定性から説明できない。

3. この鉄の影響はニコチン酸アミドによつておさえられない。

4. One-step growth 法によつてはこの鉄の影響はみとめられなかつた。

5. ファージ Ty₁ 株と *Sal. enteritidis* 1891 株の系においては鉄の存在がファージの増殖に好影響をあたえた。Esch. coli とそのファージでは鉄の影響はみとめられなかつた。

終りに御鞭撻を賜りました長野教授に感謝し、培地その他について御助力をいたしました同僚小島氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cohen, S. S.: Growth requirements of bacterial viruses. *Bact. Rev.*, **13**: 1~24, 1949.
- 2) 新井浩: バクテリオファージの栄養に関する最近の研究. *日本細菌学雑誌*, **5**: 87~95, 1950.
- 3) Price, W. H.: The effect of nutritional factors on the relationship between the bacterial virus and its host. *Bact. Rev.*, **13**: 118~122, 1949.
- 4) Anderson, T. F.: The reactions of bacterial viruses with their host cells. *Botanical Rev.*, **15**: 464~505, 1949.
- 5) Spizizen, J.: Biochemical studies on the phenomenon of virus reproduction. I. Amino acids and the multiplication of bacteriophage. *J. Inf. Dis.*, **73**: 212~221, 1943.
- 6) Spizizen, J.: II. Studies on the influence of compounds of metabolic significance on the multiplication of bacteriophage. *J. Inf. Dis.*, **73**: 222~228, 1943.
- 7) Scribner, E. J. & Krueger, A. P.: The effect of NaCl on the phage-bacterium reaction. *J. Gen. Physiol.*, **21**: 1~16, 1938.

- 8) Krueger, A. P. & Strietman, W. L.: Effect of sodium sulfate on the phage-bacterium reaction. *J. Gen. Physiol.*, **22**: 131~138, 1939.
- 9) Adams, M. H.: The calcium requirement of coliphage T₅. *J. Immunol.*, **62**: 505~516, 1949.
- 10) Puck, T. T.: A reversible transformation of T₁ bacteriophage. *J. Bact.*, **57**: 647~655, 1949.
- 11) Gest, H.: The effects of inorganic salts on the multiplication of bacterial viruses. *J. Inf. Dis.*, **73**: 158~166, 1943.
- 12) Pope, C. G., & Smith, M. L.: The routine preparation of diphtheria toxin of high value. *J. Path. Bact.*, **35**: 573~588, 1932.
- 13) Mueller, J. H., & Miller, P. A.: Production of diphtheric toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J. Immunol.*, **40**: 21~38, 1941.
- 14) Shinohara, K.: Micro-determination of iron by means of Pulfrich's photometer. *J. Biochem.*, **29**: 57~59, 1939.
- 15) Racker, E., & Krimsky, I.: Inhibition of phosphorylation of glucose in mouse brains by viruses and its prevention by preparations of diphospho-pyridine nucleotide. *J. Exp. Med.*, **84**: 191~203, 1946.
- 16) Delbrück, M., & Luria, S. E.: Interference between bacterial viruses. I. Interference between two bacterial viruses acting upon the same host, and the mechanism of virus growth. *Arch. Biochem.*, **1**: 111~141, 1942.
- 17) 松本稔, 岩佐三郎, 水野傳一: バクテリオファージの増殖に及ぼす鉄の影響. II. 肉エキス・ブイヨンおよび合成培地についての実験. *日本細菌学雑誌*発表予定.
- 18) Hershey, A. D., Kalmanson, G., & Bronfenbrenner, J.: Quantitative methods in the study of the phage-antiphage reaction. *J. Immunol.*, **46**: 267~279, 1943.
- 19) Delbrück, M.: Biochemical mutants of bacterial viruses. *J. Bact.*, **56**: 1~16, 1948.