ファージ產生大腸菌株の檢出成績

内田 清二郎 寺島 東洋三

千葉大学医学部細菌学教室 (主任 川喜田愛郎教授)

[受付: 7 月 5 日, 1952 年]

大腸菌, 赤痢菌, サルモネラのファージ產生菌株の檢出成績については, Burnet,¹⁾ 内藤,²⁾ 大橋,³⁾ Boyd,⁴⁾ 等の仕事がある。我々も 1950~1951 年の間に 2 回にわたつて, 大腸菌のファージ產生菌株の檢出を行つたので, その結果を報告する。

檢出方法

被檢菌の 37°C 20 時間ブイヨン培養液を 60°C 30 分間加熱した液 0.5 cc に, 指示菌のブイヨン培養液 2 滴を加え, 之を寒天重層法で平板面上に固めて培養, 翌日, 溶菌斑の有無をしらべる。溶菌斑の出た被檢菌は, 分離培養して集落をひろい, これについて同様の檢査を行ひ, ファージ產生菌株であることを確める。

檢出成績

第一回檢査

1950 年 5~9 月の間に健康人糞便より採取した大腸菌を 13 株の赤痢菌 (志賀菌花房株, 駒込 A 菌原株, 駒込 BI 菌原株, 駒込 BIII 菌原株, 箕田菌九大 X 株, 居石菌九大 Y 株, 中村菌傳研株, 大原菌渡枝株, 川瀬菌園口株, 大野菌府中株, 西貢菌 18 号株, 昭和菌 15 号株, アルカンスセンス菌 1628 号株) 12 株のサルモネラ (*S. paratyphi* A 1015, *S. paratyphi* B 8006 *S. typhi*-*murium* 1406, *S. abortus-equi* beta 202, *S. paratyphi* C “Hirschfeld”, *S. cholerae-suis* 1348, *S. narashino*, *S. typhi* H 901 W, *S. enteritidis* 1891, *S. sendai* 571, *S. gallinarum* 416, *S. pullorum* 971) 43 株の大腸菌 (被檢菌と同一のもの) を指示菌としてしらべた結果, 4 つのファージ產生菌株がみつかった。(第 1 表の「第 1 回檢査 確定なもの」の項) しかしこれらの大腸菌株は同一株の重複がかなりあると考えられる理由があるので, 此の成績からは檢出率は求められない。

第 2 回檢査

1951 年 10~12 月の間に 41 人の健康人の糞便から, 各人 1 株づつ 41 株の大腸菌を採り, これを 13 株の赤痢菌 (第 1 回と同様のもの), 13 株の大腸菌 (被檢菌より任意

にえらんだもの) を指示菌としてしらべた結果, 7 株のファージ產生菌株を得た。(第 1 表の「第 2 回確定なもの」の項) 檢出率は 41 株中 7 株即ち 17 パーセントで, その全部が赤痢菌を指示菌とするものであつた。

產生ファージ量

ブイヨン培養 37°C 20 時間の液中のファージ量は第 1 表の如く $10^2 \sim 10^6$ /cc で $10^3 \sim 10^4$ /cc が最も多い。培養液中でのファージ量の消長を K 7, K 16, W 8. の 3 株についてしらべた結果, 菌増殖の停止期迄はファージ量は菌の増殖に比例して増加する (第 1 回)。しかしそれ以

第 1 圖 菌の生長の停止期迄のファージ量の消長 (K 7 株)

後 (菌の生長曲線の減数期) は, W 8 株では減少の一路

UCHIDA Seijiro and TELAJIMA Toyozo: Occurrence of lysogenic strains among strains of *Escherichia coli*, Department of Bacteriology, School of Medicine, Chiba University. — Jap. J. of Bact., 7(6): 591-594, 1952.

第1表 フェージ産生菌株の検出成績

	ファージ 産生菌株	指示菌	ファージ量/cc (37°C 20時 間ブイヨン 培養液)	溶菌斑の性状				そ の 他
				形	大きさ mm	輪 廓	溶 菌	
第1 回検査「 確実なもの」	K 7	駒込 BI 菌	10 ⁴	圓形	0.2~0.8	かなり鮮明	かなり完全	
		昭和菌	8×10 ³	"	0.2~1.5	"	"	
		中村菌	2×10 ³	"	0.2~0.8	不鮮明	不完全	
		居石菌	5×10 ²	"	0.2~0.8	"	"	
	K 16	昭和菌	5×10 ³	圓形	0.2~1.2	かなり鮮明	かなり完全	
	W 8	K 5 (大腸菌)	2×10 ³	圓形	0.2~1.2	鮮明	完全	中心に菌の小集落あり。大きな halo をもつ 2-5mm
	W 4	バラチフス A 菌	1.5×10 ²	圓形	3~5	かなり鮮明	かなり完全	2 回目(全溶) 3 回目 (一)
第1「不 確実なもの」 回検査		バラチフス C 菌	3×10 ³	"	0.2~1.0	鮮明	"	" (2000) " (一)
		センダイ菌	2×10 ²	不正形	3~5	不鮮明	不完全	" (一) " (数コ)
		ガリナルム菌	4×10	"	2~4	かなり鮮明	かなり完全	" (一) " (200)
	K 9	バラチフス A 菌	10 ²	點狀	0.1~0.5	かなり鮮明	かなり完全	一度だけで以後出ない
	Sy 20	チフス菌	4×10 ²	點狀	0.2~0.4	かなり鮮明	かなり完全	同一斜面からの二度目の検査で 200/cc 出たが以後出ない
	Sy 5	チフス菌	8×10	圓形	0.2	かなり鮮明	かなり完全	一度だけで以後出ない
	Sy 4	チフス菌	10 ³	圓形	0.2~2.0	かなり鮮明	かなり完全	一度だけで以後出ない
第2 回検査「 確実なもの」	A 7	大野菌	10 ³	圓形	0.5~1.5	鮮明	かなり完全	
	A 18	大野菌	10 ³	圓形	0.6~1.0	かなり鮮明	不完全	
	A 29	大原菌	2×10 ⁴	點狀	0.1~0.6	かなり鮮明	かなり完全	
	A 30	駒込 A 菌	a) 2×10 ⁴	圓形	0.7~1.0	不鮮明	不完全	中心に菌の小集落あり
			b) 数コ	"	0.8	"	かなり完全	
		駒込 BI 菌	a) 10 ³	點狀	0.1~0.6	"	不完全	非常にみにくい溶菌斑
			b) 数コ	圓形	0.4~0.6	"	かなり完全	
	A 34	駒込 A 菌	a) 10 ⁶	點狀	0.1~0.5	かなり鮮明	かなり完全	halo をもつ、径 1.5~3mm.
			b) 数コ	斑狀	4~5	不鮮明	不完全	
		駒込 BIII 菌	3×10 ²	點狀	0.1~0.5	"	かなり完全	
第2「不 確実なもの」 回検査	A 38	志賀菌	3×10 ³	點狀	0.1~0.3	不鮮明	不完全	非常にみにくい溶菌斑
	A 41	駒込 A 菌	1.5×10 ³	圓形	0.5~1.5	不鮮明	不完全	大きいものはうすい halo をもつ、数えにくい
		駒込 BI 菌	a) 2×10 ³	"	0.5	"	"	
			b) 数コ	"	1~1.5	"	"	見にくい
第2「不 確実なもの」 回検査	A 12	中村菌	10 ²	圓形	0.8~1.2	鮮明	非常に完全	一度だけで以後出ない
		A 34 (大腸菌)	10 ³	點狀	0.1~0.2	不鮮明	不完全	"

をたどつて、十日前後で完全に消失する。K 7 株では 6 ~ 10 日で停止期迄に達したファージ量の更に 100 倍に増加し、その後は徐々に減少していくが、全部なくなるのには 1~2 カ月を要する。K 16 株では K 7 株程顯著ではないが、やはり菌の減数期にファージ量の増加がみられる(第 2 図)。3 株とも数回くりかえしたが、略々同様の消長を示した。ファージ量のこの様に様々な動きが、ファージの培養液中での安定性と、減数期における菌の新生量の二つ因子から説明しきれぬものであるかどうかは、まだわからない。

第 2 圖 菌の減数期におけるファージ量の消長

1 株の菌から出るファージの種類

K 7, W 4, A 30, A 41 の各株は 2 株以上の指示菌をもっているが、之は 1 種類のファージの作用か、或いは 2 種類以上のファージの作用であるのか。又 A 30, A 34, A 41 株は 1 つの指示菌に 2 種類の溶菌斑があるように見えるが、之も 1 種類のファージが作ったものか、或いは実際に 2 種類のファージが存在するのか。K 7 株の場合、各指示菌ではかつたファージ量はいつも平行している。即ち、駒込 BI 菌、昭和菌、中村菌、居石菌ではかつたファージ量は 20 対 16 対 4 対 1 の比を大体保っている。又各指示菌の溶菌斑を single plaque isolation で純化してえたファージ液で交叉感染試験を行うと、どの菌でふやしたファージ液も 4 種の菌に感染し、生じた溶菌斑の性状は溶かされる菌によつて共通している。従つてこれは 4 種の赤痢菌を宿主とする 1 つのファージであろう。しかし A 34 株では少くも 2 種類のファージが産生されている。(之については後に寺島が報告する)

ファージの不定な出現とファージコンタミネーション
W 4 株は第 1 表に示したように確かにファージ産生菌

株ではあるが、その検出成績は非常に不定である。(第 1 表 W 4 株の「その他」の項)、一方、第 1 回の検査の時に、13 株の大腸菌を被検菌と指示菌の両方に用いて同時に行つた 1 組の検査に於て、1 指示菌に対し全部の被検菌が、同様の溶菌斑を略々同数に生じた。之によると、異つた 13 株の被検菌が、全部この指示菌に作用する同一のファージを産生していることになる。又この指示菌自身が、自菌に作用するファージを出していることにもなる。しかし之は 1 回きりの成績で、その後の検査では全部陰性であつた。従つて、この場合には 1 本の指示菌液中に外部からファージが混入したものと考えられる。

第 1 回、第 2 回の検査を通じて、初めだけ溶菌斑が出て再試してももう出ないものが、第 1 回 4 例、第 2 回 2 例計 6 例めつた。(第 1 表「不確実なもの」の項)之等は W 4 株型の不定な検出成績を示すファージ産生菌株なのか、それともファージコンタミネーションなのか、判断出来ない。

考 察

検出率について。

始めに記した先人の報告中、大腸菌の検出成績をぬいてみると、内藤²⁾は 60 株の指示菌を用いて、14 株中 3 株 (22 パーセント) 大橋³⁾は 3 株の指示菌を用いて 25 株の大腸菌をしらべたが 1 つも見出されていない。前者の規模 (14 × 60 = 840 組) は我々 (41 × 26 = 1066 組) と略々同じであり、検出率も略々同程度である。後者の規模は非常に小さい (25 × 3 = 75 組) から検出出来なかつたのであろう。

検出方法として加熱法を用いたが、もし、濾過法を併用すれば加熱に弱いファージを出している菌も見出せる筈である。更に被検液を稀釈することによつて、かえつて検出出来るファージもあるから、そういう操作によつても検出率はますだろう。又指示菌株をふやすに従い検出率が高まることは当然予想される。

Topley⁵⁾ も指摘しているように、ある菌株をこれはファージ産生菌ではないと断言することは不可能に近い。

指示菌について。

ファージ産生大腸菌をさがすのに指示菌として大腸菌より赤痢菌を用いた方がよいという結果がでた。対称の密度が違うけれども、Burnet²⁾ はサルモネラで、ある 1 指示菌株を用いると高率にファージ産生菌が見出せることを報じているし、同様のことは、*Shigella* 菌⁴⁾ *ジフテリア* 菌⁶⁾ でも報告されている。

ブイヨン 20 時間培養液中のファージ量は $10^2 \sim 10^6/\text{cc}$ で $10^3/\text{cc}$ が多い。

つとに Gildemeister & Herzzog⁷⁾ が報告しているようにファージ量は菌の増殖に比例して増加していくが、減数期以後は菌株によつてそれぞれ固有なファージ量の消長を示した。このように産生ファージ量は同一条件では略々一定であるが、W 4 株の如く不定な成績が認められるものもある。

ファージのコンタミネーション

外部からファージが混入したと考えられる 1 例があつた。空中ファージの混入のあることは、Burnet¹⁾ も注意しているし内藤⁸⁾ は空中からファージをとつている。

要 約

1) 41 株の大腸菌を被検菌として赤痢 13 株、大腸菌 13 株を指示菌として、その 7 株 17 パーセントにファージ産生菌株をえた。すべて赤痢菌を指示菌にするものばかりであつた。

2) 産生ファージ量は $10^2 \sim 10^6/\text{cc}$ で $10^3/\text{cc}$ が多い。ファージは一般に菌の増殖に比例して増量するが、菌の減数期に於けるファージ量の消長は色々である。

3) 1 個の菌株から出るファージの種類について考察した。

4) 不定な検出成績を示す菌株がある。一方空中からのファージ混入の例もあり、そのいずれであるか決められないものもあつた。

終りに川喜田愛郎教授の御教示と御校閲を深く感謝します。又赤痢、サルモネラの各株を分與して下さいつた予研中谷林太郎氏に感謝します。

文 献

- 1) Burnet, F. M.: Lysogenicity as a normal function of certain *Salmonella* strains, *J. Path. & Bact.*, 35, 851~863, 1932.
- 2) 内藤良一: 大腸菌及び腸管病原菌ファージの自然界における分布並に其の由来. I) 細菌のバクテリオファージ携帯, 日本微生物学雑誌, 30, 2036~2064, 1936.
- 3) 大橋椿吉: 赤痢菌, 大腸菌, チフス菌, パラチフス菌からの Lysogenic strain の検出, 医学と生物学, 12, 104~106, 1948.
- 4) Boyd, J. S. K.: The symbiotic types of *Salmonella typhi-murium*, *J. Path. & Bact.*, 62, 501~517, 1950.
- 5) Wilson, G. S. & Miles, A. A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 3 ed., 346, 1946.
- 6) Smith, G. H. & Jordan, E. F.: *Bacillus diphtheriae* in its relationship to bacteriophage, *J. Bact.*, 21, 75~88, 1931.
- 7) Gildemeister, E. & Herzzog, K.: Zur Theorie der Bakteriophagen 6. Mitteilung über das d' Herellesche phänomenon, *Zbl. Bakt. (I. Orig.)*, 93, 402~420, 1924.
- 8) 内藤良一: 地表水, 井水, 下水及土壤等におけるバクテリオファージ, 日本微生物学雑誌, 30, 2065~2097, 1936.