ぶどう球菌の lysogenesis とそのファージの態度について

城 谷 勝 光 松 永 文 江

長崎大学医学部細菌学教室 (主任 青木義勇教授)

[受付: 年 12 月 21 日 1953]

通常のファージ及びそれと宿主菌間の関係については大いに研究が進み動物植物ウィルスに関する種々な面の解明に相当の貢献をなしつつある。一方ファージの大きな一面を占める lysogenesis なる現象は稍々等閑視されているように見受けられ、そこには多くの疑問が残されている。

本現象を初めて記載したのは Lisbonne and Carrère (1922) でありついで Burnet 及びその門下 (Burnet and Mckie, 1929, Burnet, 1932 and 1934; Burnet and Lush, 1936) によつて詳細な研究がなされたが、その意義特に本態についてはほとんど不明のままであった。最近に至り Lwoff and Gutmann (1950) の見事な研究によつて多くの点が明らかにされ、再び新しい観点から検討されつつある。

前記 Lwoff 等の lysogenic *B. megatherium* を用いた研究によると本菌々体内の probacteriophage は何等かの環境変化によつて infective の mature phage となり溶菌を起して媒液中に放出されこのものが抵抗菌に吸着すれば再び probacteriophage となり lysogenic strain を作り、感受性菌に吸着すれば lysis を起して増殖するという。現今この考えを支持する者が多いが、Boyd (1950, 1951) の考えはこれと稍々異なる。即ち lysis によつて放出されるファージの中には lytic phage と一諸に symbiotic phage が存在し前者が吸着した場合は lysis が起りその結果 lytic phage と symbiotic phage が放出され後者の吸着侵入によつて lysogenesis が成立するに至るといふ。

我々は lysogenic のぶどう球菌とその産生するファージに感受性の同種菌 2 株を用いてこの方面の研究を行いつつあるがこれには先ず、供試ファージとこれらの感受性菌との間の関係について述べたいと思う。

実験材料と方法

ファージと宿主菌: lysogenic のぶどう球菌 L 株 (伝研第 4 研究部保存) の 18~20 時間ブイオン培養液を L₃

で濾過したものをファージ液 (Lp) とした。宿主菌は同じくぶどう球菌である C 及び I の 2 株であり特記しない限り indicator strain としては I 菌を用いた。

培地: ブイオン及びファージ定量用平板の上層部軟寒天 (0.8%前後) には 0.2% にぶどう糖を加えたものを使用した。

ファージの定量: Hershey 等 (1943) の Agar layer method に準拠した。

実験成績と考察

供試菌の lysogenicity について: L 菌をブイオンに 37°C 18~20 時間培養し、中等度の混濁を呈した培養液の遠心上清又はこの L₃ 濾液を C 又は I 菌のブイオン培養と平板にまけば両菌に対してほぼ同数の plaque が出来る。即ち L 菌は C 及び I 菌に作用するファージを放出する lysogenic strain である。C 又は I 菌を夫々単独にブイオンに培養した場合、他の 2 菌に作用するファージは認められない。しかし C 菌は一旦 Lp に感染すると長くこのファージを carry した状態になる。即ち L, C 及び I 菌を夫々別にブイオンに接種し、C 及び I 菌を接種したブイオンには同時に Lp ファージ微量を添加して 37°C 18~20 時間培養する。この培養液を遠心し、沈澱菌体をブイオンで 3 回洗滌した後、これを平板に分離し、任意の集落を寒天斜面に培養して 2 日間隔で同一培地に継代し各代の菌のファージを次の様に定量した。即ちこれらの培養菌ブイオン培養をブイオンで 3 回洗滌し、そのブイオン再浮游液のファージを I 菌を indicator として定量し、同時にその生菌数を測定した。

結果は第 1 表の通り Lp に一旦感染した C 菌は 5 代継代しても L 菌とほぼ同程度にファージを放出し、生菌数

JOYA Katsumitsu, MATSUNAGA Fumie: Lysogenesis of Staphylococci and Bacteriophages. Produced by Them. Department of Bacteriology, Nagasaki University School of Medicine. — Jap. J. of Bact., 9(2), 135-138, 1954

対遊離ファージ数の比にも継代による減少が殆んど見られずL菌の場合とほぼ同様 $10^3:5\sim6$ であつた。又このような感染したC菌はそのファージに対する感受性を喪失した。I菌+Lpの場合は感染直後、継代前に於てファージ保有率は約 $10^4:1$ であり、第1代で約 $10^6:1.3$ と激減し、第5代になると全然ファージが認められなくなつた。しかしてこの様なI菌は第1代に於てもLpに感受性を有していた。即ちC菌は一旦Lpに感染すればL菌と同様な lysogenic strain となり、I菌の場合はその中のファージ抵抗菌が接触したファージを一時吸着しているにすぎず lysogenic strain とはいえない。

第1表 供試菌の lysogenicity

培養 継代数	L 菌	C 菌 + Lp	I 菌 + Lp
0	3.1×10^6 (5.3×10^8)	3.7×10^6 (5.1×10^8)	3.4×10^4 (3.6×10) ^s
1	2.9×10^6 (5.1×10^8)	3.2×10^6 (5.3×10^8)	6.1×10^2 (4.6×10^8)
3	3.3×10^6 (5.3×10^8)	2.7×10^6 (5.2×10^8)	3.5 (4.4×10^8)
5	2.7×10^6 (4.9×10^8)	3.2×10^6 (5.5×10^8)	0 (4.7×10^8)

備考 (1) () 内は菌数

(2) Indicator strain はI菌

ファージの性状：L菌をブイオンに 37°C 18時間培養すると相当に増殖し中等度の混濁を呈する。この遠心上清をC又はI菌と平板にまくと $10^6/\text{ml}$ 程度の plaque が発生する。しかし通常の方法、即ちこの遠心上清を 60° 30分加熱するとファージは全く不活化されC菌に対してもI菌に対しても1コ の plaque をも作らなくなる。そこで遠心上清のファージ活性が遠心によつて除かれ得なかつた菌体に結合したファージに基づくのかどうかを確かめるためにこの培養液の遠心上清を L_3 で濾過して得た濾液と、同一培養液の遠心沈渣をブイオンで3回洗滌してブイオンに再浮游した洗滌菌体浮游液のファージを定量してみた。同時にCとLp及びIとLpのブイオン培養液についても同様の操作を加えて濾液と洗滌菌体のファージを定量した。結果は第2表の通りL菌の培養濾液も洗滌菌体も夫々CとI菌にはほぼ同数の小さい plaque を作つたがファージは洗滌菌体にはるかに多く、菌数 5.3×10^8 に対しファージ数 2.5×10^6 で濾液中の活性ファージはその $1/200$ 以下であつた。このこと即ちL菌培養濾液をI菌と平板にまいた場合が plaque はるかに多く出るのは後者の場合、洗滌菌体が平板上で増殖しつつ次々に活性ファージを放出するためであると考えられ

る。

第2表 ファージの性状

培 養 種 類	Indicator strain		
	L	C	I
L L_3 濾液	0	1.1×10^4	1.4×10^4
洗滌菌体 (5.3×10^8)	0	2.5×10^6	3.1×10^6
C+Lp L_3 濾液	0	2.7×10^3	3.6×10^3
洗滌菌体 (2.7×10^8)	0	3.8×10^6	5.2×10^6
I+Lp L_3 濾液	0	0	0
洗滌菌体 (6.2×10^8)	0	0	3.5×10^4

洗滌菌のファージ数からみてL菌は約200中1個の菌がファージを放出すると考えられる。Lysogenesis は遺伝的な性質であるので集落によつてファージを放出したり、しなかつたりすることはないと考えられる。試みにL菌の集落20個を任意にとりこのブイオン培養について濾液と洗滌菌体の活性ファージを定量したところ集落による明らかな差異は認められなかつた。

次にC+Lp, I+Lpのブイオン培養でLpが増殖するかどうかをみるために前項同様、濾液と洗滌菌体のファージを定量した。(第2表参照)C, I何れの感受性菌との培養によつてもその濾液には活性ファージの増加は認められず、特にI菌との培養では皆無である。ところがそれらの洗滌菌体にはC菌の場合はL菌の場合とほぼ同率に活性ファージが証明された。感受性菌のブイオン培養によつて何故ファージが増加しないのであろうか。これにはいろいろの原因が考えられるが、先づ第一に考えられることは添加されたLpがC菌中の抵抗性菌体に吸着されこの吸着率がC菌中の感受性菌体によるLp再生率を上回るということである。I菌々に吸着したファージはC菌の場合よりはるかに少く、しかも活性に変化が起つていて、I菌のみに作用しC菌に対する活性を失つている。このことから本菌の抵抗性菌体に吸着して活性の一部を喪失し、逐次不活化されるのではなからうか。しかしてI菌とLpを寒天平板にまくと plaque が出来るのにブイオン培養ではファージ増殖がみられないのは後者の場合が前者の場合に比し吸着率はるかに大であるためと思われる。そこで我々は以上の疑問に答えるために次の様な実験を行つた。

Lpファージ増殖の時間的追及；I及びC菌を夫々別に 37°C 18時間ブイオンに培養し、その0.1mlを予め 37°C に温めた新しいブイオン9.9mlに加え、 37°C 4時間培養して生菌数を測定する。その何れかに 37°C のブイオンを加えて同一菌濃度とし、その4.5mlにLp原液0.5mlを添加して 37°C の温湯中に立て30分、1、

2, 4 及び 6 時間目に夫々の生菌数と遠心上清のファージ数を測定した。その結果は第 1 図に示される。即ち対照 (ファージを添加しない場合) の増殖曲線は C 菌が I 菌より稍々高いが、両菌共ほぼ同様な率で指数的に増殖している。ファージを加えた場合は両菌は異なる増殖曲線を描き、C 菌の増殖は添加ファージによつて約 90 分間抑えられその後は対照とほぼ同様な率で増殖している。この場合ファージ数の消長は添加約 2 時間まで極めてわずかに増加、その後は逆に極くわずかに減少した。ファージによつて菌増殖が著明に阻止されず又数時間後ファージ数が次第に減少するのは吸着速度 (37°C 10 分で 44 % の吸着がみられた) に比して新生ファージの放出がゆるやかなためと考えられる。

第 1 図 ファージ添加の菌増殖に及ぼす影響

I 菌にファージを加えた場合の菌数の消長は C 菌のそれと異なり、30 分まで急激に減少、その後は対照と同様な率で増殖し、添加されたファージは 30 分後にはすでに全く消失した。そこでこのファージ消失の原因を知るために次の 2 つの実験を行った。

I 菌培養濾液のファージ不活化作用: Lp ファージ液

$1.9 \times 10^5/\text{ml}$ を第 3 表のブイヨン、I 菌培養濾液 (L₃濾過) I 菌加熱菌液 (I 菌ブイヨン培養を遠心して沈澱菌体をブイヨンで 3 回沈澱し、そのブイヨン再浮遊液を 100°C 30 分加熱したもの) に $1/10$ 量加え、0°C と 37°C に置き、18 時間後、夫々のファージ数を定量してブイヨン 0°C 放置後のファージ数を 1 として減少率を計算した。その結果 0°C では何れの medium でも著明な減少はなく、37°C ではブイヨンによつても 60 % 以上が不活化され実験に用いたブイヨンそのものが好適でなかつたことを示している。感受性の加熱菌体に吸着すればファージは不活化されることは既知の事実であるが、I 菌の培養濾液によつて 90 % 以上が不活化されるものは前項の現象と関連して興味がある。しかしながらこのことのみが I + Lp ブイヨン培養に於ける Lp の速かな消失の原因とは考えられない。

第 3 表 加熱菌体及び培養濾液のファージ不活化作用

Medium	温度	0°C	37°C
ブイヨン		1.4×10^4 (0)	4.7×10^3 (66.5%)
I 菌濾液		1.1×10^4 (20.7%)	1.09×10^3 (92.2%)
I 菌加熱菌液		1.2×10^4 (12.9%)	0 (100%)

() % は減少率

電子顕微鏡による観察: 37°C 18~20 時間 L 菌を培養した寒天平板に蒸溜水数滴を滴下し、これを再びピペットで吸引して標本を作り鏡検したところ第 2 図の如く完全な形態を保つた L 菌と中等大の球状で尾のないファージ無数がみられた。同様な L 菌塗抹平板に I 菌を重ねて塗抹培養し、翌日発生した溶菌帯の辺縁部に蒸溜水を滴下し、上記と同様に標本を作つて鏡検したところ、第 3 図の如く I 菌と思われる ghost 化した像が少数みられたが、ファージは殆んど見出されなかつた。以上のことから Lp は I 菌の感受性菌体に吸着して溶菌するが殆んど増殖せず一方次々に抵抗性菌体に吸着して不活化され漸次 medium 中から消失して行くものと思われる。しかし寒天平板上で plaque が発生するのは第 2 表にみられる様な抵抗性菌体に吸着しまだ I 菌に対する活性をもっている粒子が感受性菌体を溶菌するためであろう。

総 括

我々が用いたぶどう球菌産生ファージ Lp は易熱性のかなり不安定なファージで形態一様な中等大の尾のない球状のものであつた。本ファージは C 及び I の 2 つの感受性菌に対してほぼ同一の plate efficiency を示したが

第2図 L菌単独培養 (× 35000)

第3図 L菌とI菌の混合培養 (× 35000)

本ファージに対する両菌の態度には大きな差異がみられた。即ち感染したC菌はその初期に軽度のファージ増殖を許すが lysogenic になり対照と殆んど同様に分裂増殖しI菌は感染初期には相当な溶菌作用を受け菌数の減少を来し、同様に添加ファージは速かに不活化されるがその後は対照と同様な率で増殖し lysogenic にならなかった。

C菌中の Lp 抵抗菌は200個の中1個位であろうと思われる。この程度の菌出現では寒天平板上で不透明な plaque が出る筈である。しかし C菌と Lp のブイヨ

ン同時培養に於て Lp は一時ごくわずかに増殖するが間もなく逐次減少して行き、その結果遊離ファージの増加は認められなかった。増殖を伴わない溶菌現象が認められているが、この場合は活性ファージの放出は極めて緩慢に起り抵抗菌による吸着率が増殖率を凌駕したものである。

I菌と Lp の培養でもC菌の場合と同様活性ファージの増殖が起らず抵抗菌によつて速やかに吸着されて行くと思われる。しかしこの場合はC菌の場合に比してファージとの接触直後、菌の死滅が著明であるので、これが溶菌に基くものとすれば必然的にファージの増殖もより大である筈であるが事實は逆で遊離ファージは極めて速やかに不活化され抵抗菌に吸着されたファージもC菌に対する活性を失つていた。このI菌のファージ不活化作用を培地成分やI菌の代謝物質等のみに帰すことは無理であると思われる。電顕所見によると単に不活化されているのではなくてI菌の共存に於ては溶菌したI菌の ghost 像をみると、ファージ粒子は皆無ではないが殆んど見当らないのである。このことは感受性菌を溶菌し burst すると共に、より速やかな速度で抵抗菌に吸着されることを示していると思われる。

Lysogenic strain は同一菌集団の感受性部分には infective の即ち普通の成熟した phage 粒子そのものが適応し得るそのファージに抵抗性部分の菌体内に侵入することによつて発生するのではなからうか。言いかえれば lysogenesis の成立は phage の性状によるのではなく、菌体側の条件如何にかかっていると思われる。この点については更に実験中である。

稿を終るに臨み終始御激励を賜り御校閲の労をとられた恩師青木教授に対し又心よく菌株を分與された傳研第四研究部新井浩氏並びに電子顕微鏡検査に際し全面的な援助を戴いた是眞会病院高原誠君に対して深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Burnet, F. M. and Mckie, Margot : Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 6, 277, 1929.
- 2) Burnet, F. M.: Nature, 35, 851, 1932.
- 3) Burnet, F. M.: Biol. Rev., 9, 322, 1934.
- 4) Burnet, F. M. and Lush, Dora : Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 14, 27, 1936.
- 5) Boyd, J. S. K.: J. Path. Bact., 62, 501, 1950
- 6) Boyd, J. S. K.: J. Path. Bact., 63, 445, 1951
- 7) Hershey, A. D., Kalmanson, G. and Bronfenbrenner, J.: J. Imm., 46, 267, 1943.
- 8) Lisbonne, M. and Carrère, L.: C. R. Soc. Biol., 68, 569, 1922.
- 9) Lwoff, A. and Gutmann, Antoinette : Ann. Inst. pasture, 78, 711, 1950.