等の事より、抗体の脳内 concentration の本態は、主として脳侵襲に依る blood-brain-barrier の透過性亢進に基く血清抗体の脳組織滲透鉤着に在ると考えたい。尙、此の透過性亢進の本態に就ては今後尙一段と積極的な解明を試みたい。

終りに臨み所長荏寛先生と副所長上田守長先生との御鞭撻に感謝致します。

文 献

- 1) Hayashi, H. : Experimental study on the infection of guinea-pigs to Japanese B encephalitis. I. Reactions of the virus inoculated animals and the correlation between the fate of inoculated virus and the serological antibody response. Kitasato Arch. Exp. Med., 25, 115~131, 1952.
- 2) Hayashi, H. : Experimental study on the infection of guinea-pigs to Japanese B encephalitis. 2. The fate of the virus reinoculated to actively immunized animals and the correlation between it and immunity development. Kitasato Arch. Exp. Med., 25, 233~243, 1953.
- 3) Hayashi, H. : Experimental study on the infection of guinea-pigs to Japanese B encephalitis. 3. Histopathology of the experimentally infected animals. Kitasato Arch. Exp. Med., 26, 55~65, 1953.

- 4) 林博, 中村清, 杉本知次, 左奈田満里子 : モルモットの日本脳炎感染に関する実験的研究。第4報 脳の局処免疫に就て。「ウイルス」, 3, 263~268, 1953.
- 5) Walter, Fr. K. : Studien ueber die Permeabilitaet der Meningen. II. Mitteilung. Die Permeabilitaet derluetischen Erkrankungen. Zeitsch. ges. Neur. Psych., 97, 192~216, 1925.
- 6) Walter, Fr. K. : Studien ueber die Permeabilitat der Meningen. III. Mitteilung. Die Permeabilitaet bei den Psychosen des Rueckbildungsalters. Zeitsch. ges. Neur. Psych., 99, 548~576, 1925.
- 7) Walter, Fr. K. : Theorie und Praxis der Permeabilitaetspruefung mittels der Brommethode. Arch. Psych., 79, 363~374, 1927.
- 8) Kroll, M., Fedroff, H. : Ueber den klinischen Wert der Walterschen Brommethode. Zeitsch. ges. Neur. Psych., 122, 667~704, 1929.
- 9) Kant, F., Mann, F. : Experimentelle Untersuchungen ueber die Blut-Liquorschranke. Arch. Psych., 85, 394~403, 1928.
- 10) Rohden, V. F. : Ueber die diagnostische Bedeutung der Walter'schen Permeabilitaetsreaktion. Arch. Psych., 87, 797~844, 1929.
- 11) 岡崎忠夫 : 頭部外傷に於ける Sulfadiazine の髄液内移行。精神々経学雑誌, 54, 161~168, 1952.

細菌ウイルスの増殖と突然変異に就て

…ウイルスの増殖様式の遺伝学的解析…

田 波 洋 *

YOH TANAMI : VIRUS MULTIPLICATION AND MUTATION IN HOST BACTERIAL CELL

〔受稿 12月17日 1954〕

細菌ウイルスの増殖様式については、最近に至るまで、ファージ粒子は菌体内に侵入後いくつかの各々単独に増殖しうる小単位に分離し、これらが或程度増殖した後でその各々が潜伏期の後半において再結合し成熟ファージ粒子になる、という LURIA 等 (1947, 1^{1,5)} 949) の考え方がひろく一般に行われていた。

この考え方は1946年以降 HERSHEY を中心にして^{5,8,9)} 発展せしめられて来た細菌ウイルスの遺伝子のくみか

え現象 (genetic recombination) を説明するためにも誠に好都合であつたし、ファージ増殖様式の研究途上で重要な地歩を占める、LURIA, LATARJET, BENZER, JACOB 等による放射線照射による解析実験の結果や、DOERMANN等による早期溶菌実験——即ち、潜伏期の前半においては感染力のある粒子は見出されず後半期に及んでから成熟粒子が出現して直線的に増加するという事実などと、本質的な矛盾を示さ

なかつたので、LURIA の協同研究者であつた DULBECCO (1952)¹⁷⁾ によつて上述の LURIA の仮説が全く否定されるに至るまで、LURIA の考え方はウイルスの増殖様式の考え方に深い影響を与えて来たのである。

しかし乍ら、ここで、DULBECCO が LURIA の仮説に対してなした批判的実験及びその考察は、元来が紫外線光子に対して“single hit”で致死的な変化を受けるような感受性をもつところの、いくつかの単位群についてなされたものであつて、純粋に遺伝学的な意味をもつ“小単位”群について直接批判が向けられたのではないことは注意する必要がある。

即ち DULBECCO の批判は、LURIA の考え方の根柢をなしている重複感染による紫外線不活性化ファージの活性化の現象 multiplicity reactivation を説明するために提案されたメカニズムが、そのまゝ遺伝子のくみかえ現象 genetic recombination を説明するためにもまた適当であろうというひとつの“思いがけい”に対してなされたものと理解すべきであろう。従つて遺伝子の増殖機構を考察する場合、上述の LURIA の考え方は現在でも尙一つの可能性をもつていと私は考える。

しかし乍ら一方では VISCONTI 及び DELBRÜCK (1953)¹³⁾ 或はその他によつて、ファージ増殖様式として新しい考え方が登場して来たのである。

彼らはウイルスの増殖と遺伝的性質の交換というふたつの事実を和解させるために、感染ファージは潜伏期の前半において、感染力をもたない形で増殖し且つ交配を行つて遺伝因子の交換を行うと考えた。この仮説的なウイルスは vegetative virus (増殖型ウイルス) と呼ばれる。

以上、最近における細菌ウイルスの増殖様式の考え方の変遷について簡単にのべてみたが、ここでは感染菌内におけるファージの増殖が対数的に行われると思われることに就てのべ、このことと上述の考え方との関連において、ファージ増殖様式について二、三の考察を試みてみたいと思う。

材料及び方法

1951年の Cold Spring Harbor Symposium に於て LURIA は T2L ファージと B 菌との関係で、ブラー

ク型に関する変異ファージの出現頻度の解析からウイルス遺伝子の指数函数的増殖の仮説を導いたが、ここでは彼とは別種のファージ系を用い、別種の遺伝形質即ち Host range mutation (ファージ抵抗菌を侵すようなファージの変異) に関して同系統の実験が行われた。

用いた材料は大腸菌 E6 株とそれを侵すファージ P6¹¹⁾¹⁹⁾ であるが、このファージ系では宿主範囲変異種の出現頻度が高い (約 10^{-6}) のでこの種の変異の解析に適している。

実験は P6 ファージに対する抵抗菌のひとつ、E3 株を侵すようなファージ変異種の出現率を求めるために計画された。実験方法は single burst experiment (ADAMS, (1950)¹⁶⁾) に少し修飾を加えたものであるが、その実際上の手続きについては後で記載される。

理 論

実験結果を述べる前に、予めウイルス遺伝子の複製化に関する LURIA の仮説を——幾分修正した形に於て——略述した方が都合がよいように思われる。

感染菌内に於いてファージのある増殖単位 (LURIA はこれを遺伝子であると考えた) が次ぎ次ぎに自己の複製を産出してゆくときに、新につくられた複製者がもとの親増殖単位と同じように次代の複製を産出しつづけてゆくとすれば、増殖単位の増殖は結局指数函数的になるであろう。ここで今考えられている増殖単位¹⁵⁾が、古典的な LURIA の仮説における遺伝子であつても、VISCONTI 等のいう vegetative particle¹³⁾であつても、現象的な解釈には本質的な差はないと考えられる。

ここで各遺伝子の変異が、その増殖過程において一定の、互いに等しい確率でおこるとすれば——これは同時に突然変異の条件である——各感染菌内に産出される変異ウイルス粒子は指数函数的に、しかも分枝群的に分布し、且つ各変異分枝群の出現頻度は各変異分枝群の大きさに逆比例することになるであろう。従つて、ある分枝群中の変異ウイルス粒子数 X と、そのような分枝群の出現頻度 Y_x との間には次のような関係が成立することになる。

$$Y_x = \frac{mN}{X}, \dots\dots\dots (1)$$

註 1) 本ファージ系は千葉大学医学部衛生学教室より分与されたものである。

こゝで m は各遺伝子の変異の確率を、 N は増殖単位
の最終値——即ち burst size の平均値をあらわす (我
々のファージ系では約60)。

然し乍ら、実際に得られた実験値から上の仮説を検
定するためには(1)式の代りに次式を用う。

$$Y_x = \frac{2mN}{X}, \text{ (但し } N \gg X) \dots\dots\dots(2)$$

こゝで Y_x は clone size が X 又は X 以上の変異分枝
群の出現頻度をあらわす。

もし事実が予期した如くであるならば、 $\log X$ に対
して $\log Y_x$ を目盛るとき、各点は負の 45° の傾斜を
もつた直線上に乗る筈である。

実験結果

I. 用いた宿主範囲変異ファージの一般的性質

E6 菌のうち P6 に対する抵抗菌をいくつか拾つてゆ
くうちに2種のファージ抵抗株が得られた。こゝでこ
の2種の変異大腸菌と、これらを侵しうる変異ファ
ージとの間の関係について一瞥を加えておきたい。

ファージ抵抗株のひとつはそれを侵すような変異フ
ァージの出現率が約 10^{-9} (時にはそれ以下のことがあ
る) であり、他の一つはそれが約 10^{-6} であるという点
で前者から区別される。こゝでは前者を E1、後者を E3
と呼び、これらを侵す変異ファージを夫々 P1, P3 と
呼ぶことにする。原株を含めてこれら3種のファージ
と3種の宿主菌との間に成立する感染域模様をしらべ
てみると第1表の如くなる。

こゝで面白いことは P1 ファージ (E1 菌を侵しうる
ような変異種) は E1 に対するときと大体同じ効率で
原株の E6 を侵し得るにも拘らず、E3 株を侵すよう

TABLE 1 Host range pattern with P6,
P1 and P3

Indicator Phage	Plating efficiency		
	E6	E1	E3
P6	1.00	10^{-9}	10^{-6}
P1	1.00	0.75	0.15
P3	10^{-6}	10^{-9}	1.00

なファージ変異株 P3 は E6 株を殆んど侵し得ない—
即ち E3 上にプラークをつくり得るファージの約 10^{-6}
の部分が E6 上にプラークをつくりうるにすぎないこ
とである。このことは P6 ファージ液に含まれる P3 フ
ァージのうち、E6 菌に P3 が感染して出来た部分は
殆んどなく、P3 の大部分は P6 の感染した E6 菌から
由来したものであることを意味するであろう。このこ
とは後でのべるように我々の実験結果を吟味する際、
論議の節約に大きな役割を果たすのである。このこと
に加えて、P3 の出現率が約 10^{-6} であることが宿主範囲
の変異の解析に好都合であることについては既にのべ
た。これに反し P1 の出現率は極めて小さいからこの
種の実験材料としては不向きである。

II. 変異ファージの出現率 (変異率) の安定性

1953年12月から1954年2月の間に行われた P3 の変
異率を求めるための5回に亘る実験結果を第2表に示
すが、P3 ファージの出現率は略安定して $1 \sim 2 \times 10^{-6}$
の値を示していることが判る (実験方法としては別に
とり立てゝいう程のことではないから省略する)。

III. 変異ファージの分子群的出現

こゝで各感染菌内でファージ変異株が生ずる場合、

TABLE 2 Mutation rate of phage P3

Exp. No.	Plaque counts on strain E6 (A)	Plaque counts on strain E3 (B)	Mutation rate $\frac{(B)}{(A)}$
1	2.95×10^8	420	1.42×10^{-6}
2	2.82×10^9	7.1×10^3	2.51×10^{-6}
3	1.45×10^9	1.6×10^3	1.1×10^{-6}
4	1.70×10^8	410	2.4×10^{-6}
5	2.5×10^7	40	1.6×10^{-6}
Mean	—	—	1.81×10^{-6}

註2) この遺伝子の変異率 m は、結果として得られるウイルスの変異率とは等しくはない。前者は後者の約 $\frac{1}{2}$ である。

該当菌当り唯一個の変異ファージ粒子が産生されるのか、それとも複数であるのかを予め確かめておく必要がある。

そのためには未吸着の遊離ファージ粒子を除去した感染菌を夫々溶菌前及び溶菌後に E3 菌でもつて検定してその比を求めればよいであろう。実験結果の 2,3 を第 3 表に示すが、変異ファージ産生菌当り数個の変異ファージ粒子が産生されていることが判る。即ち、感染ファージは菌体の増殖過程に於いて変異した後でも尚増殖を続け、結局分枝群的な変異ファージの一群が各変異ファージ産生菌内に形成されることが、定性的に推定できることになる。

なお、ファージの変異が先にのべたような形式でなされたとするとき (N=64 として) 各変異ファージ産生菌あたりの変異ファージ粒子数を計算してみると 3.5 となり、実験値と甚だ近い値が得られる (第 3 表参照)。

IV. 変異ファージの出現数とその分布

ここでいよいよ P6 の感染した E6 菌から、P3 ファージがどのような頻度で分枝群的に出現するか調べることになる。

実験方法：

対数発育期にある E6 菌が約 $1 \sim 1.5 \times 10^8$ /ml の濃度に達したとき、これに約 2~3 倍の P6 を感染させ

TABLE 3 Clonally appearance of mutant phage P3

Exp. No.	Plaque counts of P6-infected E6 cells on E3 indicator		
	before lysis (A)	after lysis (B)	(B)/(A)
1	36	193	5.2
2	34	130	3.8
3*	105	480	4.6
Theoretical value when burst size is 64	$\sum_{K=0}^7 2^k = 127$	$64 \times 7 = 448$	3.5

* Obtained from Table 5.

る。37°C で感染させると 5 分間に添加ファージの 80~90% が吸着するから、未吸着の遊離ファージを遠心操作によつて取除き適当に稀釈してからその 0.25ml を約 120 本の小試験管に分注し、37°C の恒温槽中で 40 分間培養する。この培養時間中に各感染菌は殆んど burst を完了するから、各試験管の全内容は夫々 1 枚宛の寒天平板上に E3 菌を指示菌として検定される。

このようにして、1954 年の 1 月から 2 月にかけて行われた 5 回の実験結果を夫々第 4 表、第 5 表、及び第 1 図に示した。

これらの実験においては、575 枚の平板上に存在し

TABLE 4 Single burst experiment in order to detect the mutant clones

Exp. No.	Phage stock	Number of plates	Number of bursts	Average number of burst per plate	Number of plates with mutants
1	1	66	7.9×10^6	1.2×10^3	1
2	1	110	1.7×10^6	1.5×10^4	17
3	1	118	2.4×10^6	2.0×10^4	47
4	2	134	3.4×10^6	2.5×10^3	13
5	2	147	5.4×10^6	3.0×10^3	20
Total		575			98

TABLE 5 Distribution of mutant clones on each plate

Exp. No.	Clone size																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	44	
1	1																			
2	8	2	2		1	1			1			1	1							
3	15	8	1	6	2	2	2		1	1	1	2	1				2	2	1	
4	7	2				3					1									
5	5	2	3	2	2	1		1	1	1	1									
TOTAL	36	14	6	8	5	7	2	1	3	2	2	4	1		1		2	3	1	

た 3.5×10^8 個の P6 ファージ粒子の間に、480 個の変異ファージ P3 が 98 枚の平板に見出された。変異種の出現率の平均値は 1.34×10^{-6} で、平板あたりの平均値は 0.835 である。従つて、もし変異種がこれらの平板上に “at random” に分布していたとすれば、205 枚の平板は 1 個の変異種を、85 枚は 2 個を、24 枚は 3 個を 5 枚に 4 個を、そして 2 枚のみに 5 個又はそれ以上の変異種がみられる筈である。従つて、第 5 表の成績から、変異種の出現が分枝群のであつて at random でないことは明かである。

Fig. 1 The distribution of mutant clones

1) 先に述べた LURIA の仮定に基いて我々の得た実験結果を眺めてみると、我々の場合でも次のようなことが云えるように思う。

(a) まず、2 個の変異ファージ粒子を含む clone があるから、もしウイルス増殖単位の増殖が指数函数的であるならば二倍化 duplication が主要な増殖形式であると考えられる。

(b) 次に、変異ファージ粒子数が 1, 2, 4, 8, ……等の分枝群の他に 3, 5, 6, 7, ……等の分枝群があるから、もしウイルス増殖単位の指数函数的増殖が事実としても、それは非同時的増殖であると考えられよう。(このとき前述の(2)式はこの非同時的増殖の影響を殆ど受けない)。

(c) 又第 1 図にみられるように、各感染菌内における変異ファージの分枝群の分布が LURIA の理論に適合するかどうかしらべてみると、変異分枝群の大きさが 15 より小さいところでは、実験値は負の 45 度の傾斜をもつた直線上にかなりよい一致を示している。Clone size が burst size に近づくに従つて変異群の出現頻度が期待より下廻るのは上の理論より予期されたところである。

一方、この図において、変異ファージ粒子を 1 個又は 2 個含むような小さい変異分枝群の出現頻度が期待よりも小さいのは、このような分枝群が変異ファージ検定の際に見落され易いことによるのではないかと考えている。又本実験の際 1 本の分注試験管に 2 個又はそれ以上の変異分枝群が含まれることによる影響も考えねばならない。我々の実験では 98 本の試験管のうち 7 本はこのような複合 clone の値を示していることになる。が、どの試験管がこれに該当するものか見分けることはできない。しかし乍ら、このような変異分枝群の複合化は、出現頻度の高い、1 個のみ変異ファージ粒子を含むような mutant clone に多くおこることは当然考えてよいであろう。このことを考慮に入れば、小さい変異 clone の出現頻度はもつと理論直線に近づくことになる。

又後で考察するように、もし vegetative phage 粒子間に交配が行われるとき、この変異性質の交換もおこるとすれば、変異粒子の多い感染菌においては、より一層頻回に変異性質の交配が行われることになるであろう。実験値と理論値のくいちがいの一部はこのことに由来するのかも知れない。

もともと P6 ファージ液中に約 10^{-6} の割合で含まれる P3 粒子がこの実験に及ぼす影響については、その数が極めて少いために菌とファージの混合液を稀釈する際に殆ど見失われて了うこと (例えば第 4 表の実験について計算すれば平板当りの遊離 P3 ファージ数は——遠心操作で 9 割の遊離ファージが除去されたとすれば——僅に約 0.005 以下にすぎない) 及び P3 は E6 に感染しても、その大部分は何らかの原因によつて子孫をつくらない (即ち流産感染をおこすと考えられる) ことから、我々はこのものの影響を考えなくともよいと思う。

これらの理由から、我々の得た現象も感染菌内におけるウイルス増殖単位の増殖が指数函数的におこることを示していると考えられよう。

(d) 我々の現象に見られる本質的な問題は、ウイルスの増殖が遺伝子の単位で行われるにせよ或は vegetative phage の形で行われるにせよ、そのウイルス増殖単位の増殖が幾何級数的に行われるということである。このことは即ち侵入したウイルス粒子に由来する増殖単位の原型からつくられた複製物が、原型と同じ能力で次の複製をつぎつぎにつくりうるということの意味している。

従つて侵入ウイルス粒子は感染後間もなく（恐らく数分以内に）感染力を持たない増殖型ファージ粒子として倍数化による増殖を開始し、潜伏期の後半に至つて或程度増殖した個々の前駆体粒子についてウイルスの成熟化が行われると云つたウイルス増殖様式の大略の理解がこゝで得られよう。このことを模式的に第2図に示してみた。

Fig. 2 Scheme of multiplication of vegetative phage particles

このようにウイルスの増殖は所謂増殖型粒子の形において倍数化によつて行われると考えられるから（成熟粒子はもはや増殖しないと考えられている）、我々が見掛け上1代と考える潜伏期に於いて増殖型ウイルス粒子の複製化は少くとも数回に亘つて繰返し行はれていることになる。例えば我々のファージ系では burst size が約60であるから、1個のファージがそこまで増殖するためには約6,7代の生活環が必要である事になる（ $2^7=64$ ）。このことは VISCONTI 等のいう増殖型ウイルス粒子が少くとも数代に亘る生活環を必要とするという¹²⁾彼等の実験的要求や DOERMANN 及び HILL 等の実験結果と一致する。即ち我々の得

た結果と、増殖型粒子の増殖説との間には本質的な矛盾は見られないことになろう。

総括

P6 ファージの感染した大腸菌 E6 株から、ファージ抵抗菌（E3 株）を侵すような変異ファージ（P3）の出現する頻度を解析することによつて、ウイルスの増殖単位の増殖が幾何級数的におこると考えられることについて述べ、侵入ウイルス粒子は非感染性の状態¹³⁾で6,7代に亘る2倍化過程を繰返して増殖し、しかる後にこれらの前駆体粒子の成熟化が行われて完成粒子になると考えられることについて述べた。

終りに臨み本研究について御指導及び御校閲を賜りました川喜田教授に深謝致します。

（尙本研究は昭和29年6月12日東京都島津製作所東京支店講堂で行われた“ウイルス増殖に関するシンポジウム”に於て発表した）。

文獻

- 1) LURIA, S. E. and DULBECCO, R., *Genetics*, **34**, 93-125, 1949.
- 2) HERSHEY, A. D. and ROTMAN, R., *Genetics*, **34**, 44-71, 1949.
- 3) HERSHEY, A. D., *Cold Spring Harb. Symposium Quant. Biol.*, **11**, 67-77, 1946.
- 4) HERSHEY, A. D. and CHASE, M., *ibid.*, **16**, 471-479, 1951.
- 5) LURIA, S. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **33**, 253-264, 1947.
- 6) LATARJET, R., *J. Gen. Physiol.*, **31**, 529-546, 1948.
- 7) BENZER, S., *J. Bact.*, **63**, 59-72, 1952.
- 8) BENZER, S. and JACOB, F., *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 186-204, 1953.
- 9) LURIA, S. E. and LATARJET, R., *J. Bact.*, **53**, 149-163, 1947.
- 10) DOERMANN, A. H., *J. Gen. Physiol.*, **35**, 645-656, 1952.
- 11) ANDERSON, T. F. and DOERMANN, A. H., *ibid.*, **35**, 657-667, 1952.
- 12) DOERMANN, A. H. and HILL, U. B., *Genetics*, **38**, 79-90, 1953.
- 13) VISCONTI, N., and DELBRÜCK, M., *ibid.*, **38**, 5-33, 1953.
- 14) HERSHEY, A. D., *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 99-112, 1953.
- 15) LURIA, S. E., *Cold Spring Harb. Symposium Quant. Biol.*, **16**, 463-470, 1951.
- 16) ADAMS, M. H., *Method in Medical Research*, **2**, 1-73, 1950.
- 17) DULBECCO, R., *J. Bact.*, **63**, 199-209, 1952.