10) Puck, T. T., Garen, A. and Cline, J. : The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction. *J. Exp. Med.*, **93**, 65-88, 1951. 11) 新井正男 : 日本脳炎ウイルス中和抗体の吸収試験に関する知見補遺。ウイルス, **2**, 12-19, 1952. 12) Delbrück, M. : The

growth of bacteriophage and lysis of the host. *J. Gen. Physiol.*, **23**, 643-660, 1940. 13) Barry, G. T. and Goebel, W.F. : The effect of chemical and physical agents on the phage receptor of phase II *Shigella sonnei*. *J. Exp. Med.*, **94**, 387-400, 1951.

バクテリオファージと溶菌残渣との可逆的結合 (II)

塩類の影響, 並びにファージ-加熱死菌結合との比較

内 田 清 二 郎 *

SEIJIRO UCHIDA : REVERSIBLE ATTACHMENT BETWEEN BACTERIOPHAGE AND BACTERIAL DEBRIS (II)

[受稿 3月23日 1955]

まえがき

前報¹⁾ではファージが溶菌残渣と結合して不活化すること、この結合は加温によつてはなれ、ファージは再び活性となることを述べた。本報ではこの結合に2,3の塩類が影響することを報告したい。又、ファージと残渣が結合するのは、菌のファージレセプターが残渣に残っているためではないかと考えられるが、もしそうならファージの菌への吸着は、ファージの残渣への結合と似た性質をもっているであろう。その点をしらべるために行つたファージ-加熱死菌結合の解離の実験についても報告したい。

材料と方法

菌, ファージ及びファージ保存液

前報でくわしく述べた通りである。宿主菌は *Sh. dysenteriae*, type II, 府中株, ファージは P7. ファージ保存液は、ブイヨン培養菌にファージを加えて溶菌させた液を63°C, 10分加温した後, 10,000 R. P. M. 20分遠心した上清である。前報で述べたように、このようにしてつくられた保存液には、始めは残渣と結合しているファージは存在していないが、保存1週間頃から段々に残渣との結合によるファージ力価の下降が目立つてくる。ファージ力価の測定は寒天重層法によつた。

試薬と使用器具の清洗

試薬は市販の最純品をそのまま用い、再結晶はしていない。蒸留水は全部ガラスからなる装置で再蒸溜したものをつかつた。試験管、ピペットはクロム硫酸につけた後、水でよく洗い、最後に再蒸留水で再三洗つた。

実験結果

1. 予備実験-塩類溶液中でのファージの安定性-

ファージ-残渣結合に及ぼす温度の影響の研究中にたまたま生理食塩水を稀釈液に用いて力価の測定を行つたところ、ブイオンを稀釈液として測つた価より高い価が出ること、その価は加温によつて不活化ファージを活性化した時の価と大体一致することに気づいた。このことは、生理食塩水の中ではファージと残渣の結合が維持されないで離れてしまうことを意味している。そこでNaClと並べてCa塩、Mg塩の結合に及ぼす影響をしらべたいと考えたが、その前に、之等の溶液中でのファージの安定性を知る必要がある。第1表に示すように、つくりたてのファージ保存液をブイオンを稀釈液として力価の測定を行う。同時に、稀釈した液を50°C 5分加温してから平板にまく、 10^6 倍稀釈液1ml中の溶菌斑数は、夫々850, 800であるから、この保存液のファージ力価は 8.5×10^8 /mlであり、また予定通り、この保存液中には残渣と加温によつて離

* 千葉大学医学部細菌学教室

第1表 ファージ-溶菌残渣結合に及ぼす温度並びに鹽類の影響の1実験例

稀 釈 液 溶菌斑数 (1ml当り)	プ イ ヨ ン		蒸 溜 水		0.1 Mol NaCl		0.01 Mol CaCl ₂		0.01 Mol Mg SO ₄	
	測り方 稀釈した ものをそ のまゝ平 板にまく	稀釈した液 を50°C 5 分加温して からまく	そのまゝ	加温	そのまゝ	加温	そのまゝ	加温	そのまゝ	加温
つくりたてのフ ァージ保存液	850	800	930	0	860	0	820	570	840	630
同上液を2ヶ月 間保存したもの	94	700	790	0	650	0	100	120	480	560

ファージ保存液を冷してある上記各稀釈液で 10^6 倍にうすめ、稀釈した液そのまゝ、及び稀釈した液を50°C、5分加温したものを平板にまいて、溶菌斑数を求める。表中の数字は稀釈液1ml中の溶菌斑数を示しているが、実際の測定は予備的な測定からの見当によつて平板2枚合せて300~150位の溶菌斑を数えるようにした。

第2表 P7ファージの鹽類溶液中での安定性

溶液斑数	稀 釈 液	蒸 溜 水			0.1 Mol NaCl			0.01 Mol CaCl ₂			0.01 Mol MgSO ₄		
* 稀釈直後	各 実 験 値	110,	51,	93	100,	100,	95	97,	108,	89	***	90,	99, 112
	平 均	85			98			98			100		
** 50°C 5分 加温後	各 実 験 値	0,	0,	21	0,	0,	0	70,	66,	82	***	69,	75, 100
	平 均	7			0			73			81		

* プイオンで稀釈した時の溶菌斑数を100とした時の数になおしてある。

** 加温前の溶菌斑数を100とした時の数になおしてある。

*** 0.01 Mol Mg Cl₂を稀釈液に用いた例。

れるような可逆的結合をしているファージは存在していない事が確かめられた。この保存液を冷されている蒸溜水、0.1 Mol Na Cl, 0.01 Mol Ca Cl₂, 0.01 Mol Mg SO₄の各溶液で 10^6 倍に稀釈した時には、その1ml当りの溶菌斑数は夫々、930, 860, 820, 840で、プイオンでの価と誤差範囲で一致している。従つてこれらの液では、低温で稀釈している間にファージが不活化されるようなことはないことがわかつた。次にこれらの溶液で稀釈したファージ液を50°C 5分加温してから測つた時は、蒸溜水、0.1 Mol Na Cl溶液では溶菌斑は出現せず、0.01 Mol Ca Cl₂, 0.01 Mol Mg SO₄溶液では、加温しなかつた時の数の夫々、70パーセント、75パーセントに減少している。同様な実験をくりかえした結果は第2表にまとめたが、いずれも大体一致した結果を示している。たゞ蒸溜水の場合、稀釈しただけで半減している例、及び50°C 5分加温しても21パーセントのファージが残つた例がある。これらは、蒸溜水では微量の夾雑物によつてもたやすく安定性が影響されることを示しているものであろう。またMg塩として、はじめのうちはMg Cl₂を用いたが、潮解性で使用しにくいので、あとにはMg SO₄を用いた。安定

性に関しては差があるようには見えない。

2. ファージ-残渣結合に及ぼす塩類の影響

前項で行つた通りの実験を古いファージ保存液で行つた。第1表の例について述べると、2ヶ月間保存されたのちの力価は 9.4×10^7 /mlで、もとの力価 8.5×10^8 /mlの11パーセントに減少しているが、加温によつて始めの価に近いところ迄回復している(1ml中の溶菌斑数が94から700に増加している)。再々述べるように、これは残渣と結合することによつて不活化したファージが加温によつて離れて活性化したためである。次に蒸溜水、0.1 Mol NaCl, 0.01 Mol MgSO₄溶液を稀釈液に用いて測ると、プイオンで稀釈した時よりも明かに多数の溶菌斑が生じた。このことは残渣と結合しているファージが、これらの溶液中で解離したことを示している。只、0.01 Mol Ca Cl₂溶液を稀釈液に用いた時には、プイオンの場合と略同数の溶菌斑が生じた。しかしCa Cl₂溶液の場合にはプイオンの時と異り、稀釈した液を加温しても溶菌斑数が増していない。前項の実験から、Ca Cl₂溶液中での50°C 5分の加温による不活化は30パーセント位であるから、それを考慮に入れても残渣からの解離は殆どおこつていな

いといえる (0.01 Mol Ca Cl₂で稀釈した液を加温した時の溶菌斑数 120は加温によつて70パーセントに減少した価であるから、もし不活化がおきなかつたら $120 \times \frac{100}{73} = 164$ 個の溶菌斑が生じた筈である。ブイオンではそれが700になつてゐる。勿論、残渣と結合してゐるファージの安定性は遊離のファージのそれとは異なる可能性があるし、また残渣から解離する迄の時間の問題もあるから、こういう計算はごく概略のものである)。Mg SO₄ 溶液で稀釈した液を加温した場合は、不活化を考慮に入ると $560 \times \frac{100}{81} = 691$ 個の溶菌斑が生じてゐることになり、略完全に解離がおこつたように思われる。

こゝでつくりたての力価 8.5×10^8 /ml を保存液中の全ファージ量とすると、残渣と結合してゐるファージ量は、全ファージ量の89パーセント $\left(\frac{850-94}{850} \times 100 \right)$ となる。また、ブイオン稀釈液を加温することによつて、結合ファージの80パーセント $\left(\frac{700-94}{850-94} \times 100 \right)$ が解離したことになる。同様の方法によつて、各溶液を稀釈液とした時の解離量を計算した結果は第3表の実験4として記した。この表の他の3例は、別々につくられた3つのファージ保存液で、今と同じ方法で行つた実験の結果をまとめたものである。これらを通じて蒸留水、0.1 Mol Na Cl、0.01 Mol Mg SO₄ で稀釈した時には、いずれも解離がおこつており、0.01 Mol Ca Cl₂ で稀釈した時、及びその稀釈液を加温した時には解離がおこつていない (10パーセント前後は誤差範囲)。たゞ、実験1、及び2の蒸留水の解離量が少いのは、既に述べたように蒸留水では時々ファージが稀釈操作だけでもかなり不活化されることがあるので、その影響ではないかと考えられる。尙実験1では Mg SO₄ の代りに Mg Cl₂ が使用されている。この場合に

は、ブイオンのように稀釈では解離がおきず、加温によつて解離がおこつた。従つて Mg Cl₂ と Mg SO₄ とはかなり作用が異つてゐるようであるが、この点は試薬の純度の問題もあるので、あらためて検討したいと考える。

3. 加熱死菌に吸着したファージの温度並びに塩類の影響による解離

溶菌した菌体の残渣を60℃ 20分加熱したものと、ファージが低温で結合をおこし、加温並びに塩類の影響でそれが離れるのであるから、60℃ 20分加熱した死菌もファージを低温で吸着し、且同じ条件で解離しないであらうか、この点を次のようにしてしらべてみた。対数増殖期の菌を60℃ 20分加熱して殺した後遠心し、新しいブイオンに再浮遊した後ファージ液を加え、40℃前後の電気冷蔵庫に1夜おいた後、第4表に示すような種々の方法でファージ量を測定した。同表の例について述べると、混合液中のファージ量は始めの半分にへつてゐる。しかるに稀釈液を加温した時は、溶菌斑数が略もとの量に迄回復してゐる。消失した50パーセントのファージは死菌に吸着して溶菌斑をつくれなくなつたためであり、加温によつて溶菌斑数がふえるのは吸着ファージが温度の影響で遊離するためであることは、対照の死菌を含まないファージ液では力価の減少がみられないこと、混合液を遠心して菌を除いた上清を加温した時には溶菌斑数の増加のみみられないことから明らかであらう。

加温によつて離れたファージ量は吸着ファージ量の90パーセントにあたる $\left(\frac{81-42}{85-42} \times 100 \right)$ 。混合液を0.1 Mol Na Cl 溶液で稀釈した時は、稀釈しただけでやはり吸着ファージの90パーセント迄が離れてしまう。0.01 Mol Ca Cl₂ 溶液で稀釈した時はブイオンで稀釈した価と同じだから、吸着ファージは全然離れないわけ

第3表 ファージ-溶菌残渣結合の温度及び塩類の影響による解離

実験番号	結合ファージ量 (パーセント)	解離ファージ量 (結合ファージ量に対するパーセント)							
		ブイオンで稀釈	ブイオンで稀釈した液を50℃ 5分加温	蒸留水で稀釈	0.1 Mol Na Cl で稀釈	0.01 Mol CaCl ₂ で稀釈	0.01 Mol CaCl ₂ で稀釈した液を加温*	0.01 Mol MgSO ₄ で稀釈	0.01 Mol MgSO ₄ で稀釈した液を加温*
1	77	0	100	22	100	6.5	0**	0	83**
2	62	0	84	39	89	13	1.6		
3	44	0	66	114	55	0	0	100	84
4	89	0	80	92	74	0.8	3.4	51	62

* 不活化は考慮に入れてない。

** 0.01 Mol MgCl₂ を MgSO₄ の代りに用いてゐる。

第4表 ファージ加熱死菌結合に及ぼす温度並びに鹽類の影響の1実験例

測定	の時期	始め	4°C 20 時 間 後							
測定のための 稀 釋 液	ブイオン	ブ イ ョ ン					0.1 Mol NaCl	0.01 Mol CaCl ₂		0.01 Mol Mg SO ₄
測り方	稀釈した液をそのまゝ平板にまく	稀釈した液をそのまゝ平板にまく	稀釈した液を50°C 5分加温してまく	稀釈した液を4,000 R.P.M. 15分遠心した上清からまく	同上清を50°C 5分加温してまく	そのまゝ	そのまゝ	加 温		そのまゝ 加 温
溶菌斑数 (0.1ml当り)										
ファージ・死菌 混 合 液	85	42	81	40	40	81	40	24		68
対照 (ファージ のみの液)	85	83								68

20時間ブイオン培養菌液0.5mlをブイオン9.5mlに加え、37°C 2.5時間培養して対数増殖期にある菌液をつくる。このものの菌数を測定した後、60°C 20分加熱して殺し、4,000 R.P.M. 15分遠心して沈澱した死菌を新しいブイオンに再浮遊する。これに一定量のファージを加えてファージ・加熱死菌混合液をつくり（ファージ量 8.5×10^7 /ml, 死菌 6.3×10^7 /ml）冷蔵庫（4°C 前後）に20時間おいた後、混合液中のファージ量を測る。対照としてファージのみの液をおいた（ファージ量 8.5×10^7 /ml）。表中の数字は 10^6 倍に稀釈した液（稀釈液はすべてひやしてある）0.1mlを平板にまいた時生ずる溶菌斑数（平板2枚の平均）である。

第5表 ファージ加熱死菌結合の温度及び鹽類の影響による解離

実験番号	結 合 ファージ量 (パーセント)	解離ファージ量（結合ファージ量に対するパーセント）						
		ブイオン で 稀 釈	ブイオンで 稀釈した液を 50°C 5分 加温	0.1 Mol Na Cl で 稀釈	0.01 Mol CaCl ₂ で 稀釈	0.01 Mol CaCl ₂ で稀 釈した液を 加温*	0.01 Mol MgSO ₄ で 稀 釈	0.01 Mol Mg SO ₄ で 稀釈した液 を加温*
1	52	0	70	80	0	0		
2	50	0	90	90	0	0	60	60
3	77	0	58	65	0	0	58	58

実験方法及び実験條件は第4表の実験例に示したとおり菌量及びファージ量は3実験とも $5 \sim 10 \times 10^7$ /mlの間にある。
* 不活化を考慮に入れないで計算した。

である。また加温してもブイオンの時とは異つてファージは解離しない。0.01 Mol Mg SO₄ 溶液で懸濁した時には吸着 ファージ量の60パーセントが離れた（ $\frac{68-42}{85-42} \times 100$ ）。この場合、加温してもそれ以上離れるようには見えないが、加温による不活化を考慮に入れると略全量離れたのではないかと想像される（ $68 \times \frac{100}{81} = 85$ ）。このような実験を3回行つた結果は次の第5表にまとめたようにみな同様な結果を示している（このうち実験2は今述べた例である）そして低温における死菌—ファージ結合の性質が残渣—ファージ結合の性質と全く一致していることも之等の結果から明かであろう。

考 察

Weidel はT系ファージの夫々によつて溶かされたB菌の溶菌残渣に、溶かしたファージ以外のT系ファ

ージを混合すると、加えられたファージのかかなりの部分が不活化するという実験を行つた。加熱した溶菌液を用いても不活化がおきること、部分的抵抗菌で作つた溶菌残渣（例えばB/2をT3で溶かした時できる溶菌残渣）は、この菌が抵抗するところのファージ（上の例ならT2）を決して不活化しないことから、この不活化は溶解菌から出る酵素等による非特異的なものではなくて吸着によるものであると述べている。同論文にある、各ファージの不活化に心要なイオン環境がPuckのしらべた吸着のそれと一致していることもまた、この不活化が残渣に残されたファージレセプターによる吸着によることの根拠とならう。

前報でのべたようにF-P7系ではファージ保存液中のファージが溶菌残渣へ結合することによつて段々と減少してゆく。本報では、この残渣—ファージ結合は非特異的な結合ではなくて、残渣上に残されたファージレセプターとファージの特異的な結合であることを、

この結合の解離の条件を死菌—ファージ吸着のそれと比較することによつて証明した。即ち、ブイオンの中で残渣に結合したファージは蒸溜水、0.1 Mol NaCl, 0.01 Mol MgSO₄ 溶液の中では離れ、0.01 Mol MgCl₂, 0.01 Mol CaCl₂ 溶液の中では離れない。またブイオン及び MgCl₂ 溶液の中では加温によつて結合が離れるが、CaCl₂ 溶液の中では加温しても離れない。これらの極めて特徴のある条件がそつくり同じ形で、死菌と結合したファージの解離の条件となつている。

Puck はファージと菌の吸着は専らメジウムの陽イオンによつて左右されること、陽イオンの種類及び濃度の及ぼす影響はファージによつて夫々異なることを見出した。更に、吸着はこれらの陽イオンによつて陽性に荷電したファージと、陰性に荷電している菌との静電的結合である、可逆的な、温度に支配されない“primary fixation”と、それにひきつゞいておこる温度に支配される不可逆的な酵素反応である“second step”からなり、低温で吸着を行うことによつて“second step”から“primary fixation”を分離することに成功した。吸着が“primary fixation”にとどまつているような状態にある時は、メジウムを吸着のおこりえないようなイオン環境に変えることによつて解離させることができる。

以上のようなT系ファージを用いてつくられたPuckの吸着像によつて、上述のF-P7系の現象もよく説明される。即ち、残渣或は死菌とファージの結合が可逆的であることは、酵素反応である“second step”が加熱された残渣とか死菌ではおきえないであろうことからむしろ当然といえよう。またその解離も専ら陽イオンの種類によつて支配されている。たゞ、MgCl₂とMgSO₄が解離に関して全く異つた影響を与えることは興味がある。陰イオンが吸着、解離に影響するはつきりしたデータはこれまでないが、ファージ及び菌の複雑な吸着部位に陰イオンが介入して影響を与える余地は十分にあるのではなからうか。

CaCl₂ 溶液の中ではブイオンやMgCl₂ 溶液の中とは異つて、加温しても結合ファージは活性化してこない。このことはCaCl₂ の中での結合は加温しても解離しないこと、即ち他のメジウムにおけるよりもより強固な状態になつていることを示すものかもしれない。他方、T2は死菌、残渣、さてはイオン交換樹脂⁵⁾脂⁶⁾についた時でさえ、適当なイオン環境にさえあれば、ファージDNAの放出が行われ、ファージは不可逆的

に不活化される。従つてP7ファージの上の現象を考える時に、このような可能性も考慮してみる必要があるのであろう。

これらの問題と並んで、吸着の条件は解離の条件をそのままうらがえしにすればよいのかどうか。即ち蒸溜水や0.1 Mol NaCl, 0.01 Mol MgSO₄ の中では吸着はおきず、0.01 Mol MgCl₂, 0.01 Mol CaCl₂ の中では吸着するかどうか（予備的な実験はその通りになつている。即ちこのファージは吸着に有機化合物のCo-factorを必要としない）。また、イオン濃度を色々にかえた時の影響はどうか。各イオン相互の間に拮抗作用はないかといった問題が残つている。これらは今後の研究においてしらべてみたいと考えている。

ま と め

ファージP7は、それが溶かした菌の残渣と可逆的な結合をする。この結合は、加温により、またメジウムを蒸溜水、0.1 Mol NaCl, 0.01 Mol MgSO₄ にかえることによつて解離される。0.01 Mol MgCl₂, 0.01 Mol CaCl₂ の中では解離しないが、MgCl₂ の場合にはブイオンの時と同様、加温によつて解離される。加熱死菌とファージの結合の解離の性質は、以上の残渣—ファージ結合の解離の性質と完全に一致するから、残渣—ファージ結合は残渣上に残された菌のファージレセプターとファージの間の特異的な結合であらう。

終りにのぞみ、川喜田愛郎教授の御指導、教室員諸兄の御援助に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 内田清二郎：バクテリオファージと溶菌残渣との可逆的結合。1. 温度の影響。Virus, **5**, 50-57, 1955.
- 2) Weidel, W.: Further studies on the membrane of E. coli B. Ann. Inst. Pasteur, **84**, 60-65, 1953.
- 3) Puck, T. T., Garen, A. and Cline, J.: The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction. J. Exp. Med., **93**, 65-88, 1951.
- 4) Garen, A. and Puck, T. T.: The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses II. J. Exp. Med., **94**, 177-189, 1951.
- 5) Hershey, A. D. and Chase, M.: Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol., **36**, 39-56, 1952.
- 6) Puck, T. T. and Sagik, B.: Virus and cell interaction with ion exchangers. J. Exp. Med., **97**, 807-820, 1953.