あるテンプレートなファージ粒子の二相性 抗原構造について

田 波 洋*

YOH TANAMI: DIPHASIC NEUTRALIZATION PHENOMENON
OF A TEMPERATE PHAGE BY THE SPECIFIC ANTISERUM.

[受稿 11月15日 1955]

一種のファージが(繰りかえし単一ブランクを拾うことによつて純粋にされたものでも)数株の異なる宿主菌(但し相互に近縁のもの)を侵しうることは、現在ではごくありふれた現象であつて珍しい事柄ではない。

こゝで、これらの多価感染性のファージ粒子は、全く同一の局面によつて数種の宿主菌を侵しうるのか、それとも個々のファージ粒子が夫々の菌に対応するところの数種の感染局面をもっているのか、といった疑問が生ずるのである。

これらの問題は1942年 KALMANSON 及び BRONFENBRENNER¹⁾によつてなされた仕事以来、新しい発展がなされていないように思われる。

我々は溶原性大腸菌、A34株が産生するテンプレートな β ファージについて、抗血清による中和試験を行っている際に、このファージ粒子が、対応抗血清によつて、夫々異なる速度で中和される二相の抗原構造を有していることを見出したので、こゝに報告し、併せてこのファージ粒子の感染構造について二、三の考察を試みてみたいと思う。

材料及び方法

1. ファージ：溶原性大腸菌A34株から遊離される β [A34] ファージ、及びそれを赤痢菌駒込A菌 (*Shigella flexneri* type 5, 以下KA菌と呼ぶ) 及び駒込BI菌 (*Sh. flexneri* Variant Y, 以下BI菌と呼ぶ) を通過増強した β [KA] 及び β [BI] ファージが用いられた。(我々はX菌を通過した β ファージを β [X] という記号であらわし、ファージの産生された菌名をはつきり表示したいと思う。という訳は、ファージは屢

々別の宿主菌を通過することによつて現象型の変異を示すことがあるからである)。

尚、 β ファージ粒子の形態については、千葉大学医学部細菌学教室寺島東洋三氏によつて、電子顕微鏡的観察が進められているが、本ファージ粒子は略T2位の大きさであるが、尾が非常に短いということである。

2. 宿主菌：上述のKA及びBI菌が用いられた。指示菌として用いる場合は16~20時間静置培養したものを用いた。

3. 培地：普通のブイヨン(pH7.2)を用い、培養はすべて37°Cで行つた。

4. ファージ検定方法としては標準寒天重層法²⁾を用いた。

その他の実験方法の具体的な手続きは、夫々の項において記載される。

実験成績

1. β ファージの二相性中和現象について

β [KA] ファージをそれで家兎を免疫して得られた家兎血清で中和すると、後述するような法則に従つて、時間の経過につれて指数函数的に生残ファージ数が減少してゆくことがみられる。ところが、この中和反応の反応速度を夫々KA菌及びBI菌で測定したところ、其処に明らかに異なる二つの値が得られたのである。

同様の現象は又、 β [A34] 及び β [BI] ファージについても観察された。

実験方法：約 10^7 /mlの β ファージを、最終濃度が原血清の1/1,000であるようなブイヨン稀釈抗血清に混じ、37°Cの恒温槽中で種々の時間作用させたのち、更

* 信州大学医学部細菌学教室

に1,000 倍に稀釈して抗血清の作用を除去し、その一定量を、夫々 KA 菌又は BI 菌を指示菌として寒天重層法で検定する。抗血清によるフェージ中和反応の速度係数, k , は次式によつて計算される:

$$k = \frac{2.3 D}{t} \cdot \log \frac{P_0}{P},$$

こゝで, D は抗血清の最終稀釈倍数,

t はフェージと抗血清の接触時間(分), P_0 及び P は夫々時刻 0 及び t における単位体積あたりの活性フェージ数を表わす。

同一条件下に行つた数回の実験結果を夫々図 1 a, b 及び表 1 に示すが, 用いた 3 種のフェージ株について, KA 菌を指示菌として測定した場合は k の値として 50 ~100 の値が, BI 菌でもつて検定した場合は 220 ~400 の値がえられた。これら 2 種の反応速度係数は我々の実験精度からいつて明らかに別のものであると認められる。

2. フェージ検定に及ぼす抗フェージ血清の作用

中和試験に用いる免疫血清は, 使用前に血清中に含まれる抗菌体成分を該当菌で充分除去される。従つて抗フェージ血清が指示菌に直接作用することはまづ考えられないが, 念のため次のような実験を行つた。

実験方法: 標準寒天重層法で β フェージを検定する直前に, 指示菌に原血清を 10^{-5} に稀釈したものを 0.2 ml 加え, この血清が検定平板上のプラーク形成に及ぼす影響をしらべる。こゝに加えられる血清濃度は中和本実験の際, 各検定平板上に加えられる抗血清量よ

FIGURE 1. NEUTRALIZATION CURVES OF β PHAGE AGAINST THE SPECIFIC ANTISERUM.

Experimental results with β [A34] phage were shown in Fig. 1. (a) in which open and solid circles mean the results assayed by BI or KA indicators, respectively. Results with β [KA] and β [BI] phages were exhibited in Fig. 1 (b) in which results with β [KA] and β [BI] were symbolized with triangles and circles, respectively. In this figure, too, open symbols represent the results with BI indicator, and solid symbols indicate that with KA indicator strain.

TABLE 1. NEUTRALIZATION TEST WITH β PHAGE AGAINST ANTI- β RABBIT SERUM.

Procedures: Survival fractions of β phage after an exposure to the specific antiserum at 37 C for various periods of time was assayed by the standard agar layer technique. Final dilution of the anti phage serum used here was 1:1,000. Neutralization velocity constant, k , is calculated by the following formula:

$$k = \frac{2.3 D}{t} \cdot \log \frac{P_0}{P},$$

where, D is reciprocal of the dilution of the antiserum, t is exposure time in minutes, P_0 and P represent phage titers per unit volume at time zero and t , respectively.

Phage	Indicator	Survival fraction of β phage after an exposure to anti β serum at 37 C for				Neutralization velocity constant, k , min ⁻¹ .
		0 min.	5 min.	10 min.	20 min.	
β [KA]	BI	1.00	0.58	0.34	0.17	106
	KA	1.00	0.32	0.11	0.013	219
β [A34]	BI	1.00	0.73	0.58	0.28	60
	KA	1.00	0.16	0.035	0.0087	350

りも10倍多い量である。実験成績の一部を表2に示すが、こゝに見られるように、夫々BI菌及びKA菌上のβブランク形成に関して直接平板に加えられた血清は何らの影響も与えない。

TABLE 2. THE EFFECT OF ANTI-PHAGE SERUM ON THE PLAQUE FORMATION WHEN IT WAS ADDED AT PLATING.

Procedures : Anti-phage serum was added to phage-indicator mixture at the time of plating with a concentration as low as used in the neutralization test. As can be seen in the table, the anti-phage serum added at the time of plating does not inhibit the development of β plaques.

Indicator	Plaque counts per plate β [KA] phage		β [BI] phage	
	with serum	with 2x10 ⁻⁶ ml of serum	With serum	with 10 ⁻⁶ ml of serum
BI	490	520	406	412
KA	511	524	430	426

3. 混合指示菌による実験

先にのべたような二相性中和現象の可能性としては、(a) このファージ液が夫々KA菌のみを侵しうる部分と、BI菌のみを侵しうる部分の、別種の2ファージ群より構成されている場合、(b) 個々のファージ粒子が夫々KA菌又はBI菌に感染しうる別種の感染局面をもっている場合の二つの場合が考えられる。

こゝでは次のべるような方法によつて、はじめの可能性の当否が検討される。

実験方法：ファージの適当量（平板あたり300位のブランクが得られるような量）を、夫々KA菌、BI菌、及びこの両者の等量混合液よりなる混合指示菌上に検定する。

もし与えられたファージ液がKA菌又はBI菌のみを侵すような別々のファージ群によつて構成されているものならば、混合指示菌上のブランク数は夫々、KA菌上のブランク数とBI菌上のブランク数との和に等しく、且つ、混合指示菌上のブランクはすべて半透明（turbid）ブランクの筈である。

しかるに、表3に示された実験成績からわかるように、各指示菌上に見出されるブランク数は夫々略々等しく、且つ、混合指示菌上のブランクもすべて全く透明なものであつた。

これらの結果からβファージン液が上述のような二種の異質ファージ群から構成されるという可能性は否

定されねばならない。

TABLE 3. MIXED INDICATOR EXPERIMENT.

Procedures : Phages were assayed with either single indicator strain KA or BI and with mixed indicator composed of KA + BI.

If the phage lysate is composed of the different phage fractions such as that can invade only either KA or BI, plaque number counted on the mixed indicator will be the sum of the plaque numbers on KA and BI. Moreover, every plaque on the mixed indicator must be turbid.

The experimental results shown in the table, however, clearly indicate that the above assumption is not the case.

Phage	Plaque counts per plate with each indicator		
	KA	BI	Mixed indicator KA + BI
β [A34]	165	304	246
	150	345	250
β [KA]	359	338	354
	365	353	364

Note : Plaques observed on the mixed indicator were all clear.

4. 半ば中和されたファージ粒子に関する吸着実験

もし、ファージ粒子が夫々KA菌のみ、もしくはBI菌のみを侵しうるような別種の感染局面をもっているとするれば、図1に示される成績からわかるように、KA菌を侵す局面の方がBIに対する局面よりも数倍早く不活性化される。従つてごく短時間丈抗血清を作用させることによつて、其処にBI菌には吸着できるが、KA菌には吸着できないような、半ば中和されたファージの状態が存在することになる。このような状態の粒子の存在は次のような各宿主菌に対する吸着実験によつて証明された。

実験方法：βファージをブイオンで1,000倍に稀釈した抗血清で37°C、5分間処理すると、β [A34] ファージの場合では、KA菌を侵すファージ粒子の80%迄が既に中和されて了うのに、BI菌に対しては尚はじめのファージの70~80%はなお感染力をもっている。

このような、KA菌は侵し得ないが、BI菌はなお侵しうるような状態のファージを、夫々KA又はBI菌の濃厚菌液（約3×10⁸/ml）と混じ、37°C、10分間放置後、遠心上清中の未吸着ファージ量を検定して、夫々KA又はBI菌に対する吸着能をしらべる。

同様の条件下に行つた3回の実験結果はいずれも予期したような成績——即ち、BI菌を侵しうるファージ粒子は、BI菌にはかなり迅速に吸着する（吸着速度係数は約 23×10^{-11} min⁻¹ ml.）が、KA菌にはもはや殆んど吸着しないことが認められた。実験結果の一例を表4に示そう。血清で処理しないβファージは37℃のブイヨン中ではKA菌に対して極めて迅速に吸着し、その吸着速度は約 200×10^{-11} min⁻¹ ml. である（これはブラウン運動による菌とファージの衝突のうち約半分が有効な吸着になることを意味する）。

考 察

1. バクテリオファージの血清学的中和反応においては原則的に次の三法則が成立することが認められている⁴⁾ 即ち：

1. 過剰の抗体が存在する場合には、与えられ抗血清濃度において、与えられた時間内に不活性化されるファージのパーセントは、試験に用いたファージ量に無関係に一定であること（所謂パーセントの法則）。

2. 抗血清によるファージ粒子の不活性化は、生残ファージ部分の対数が、接触時間と血清濃度に比例するような具合に進行する。——従つて、ある与えられた血清濃度においては、生残ファージ部分は時間とともに exponential に減少してゆく¹⁰⁾。

3. ファージ中和現象は、ファージ粒子と抗体粒子との不可逆的結合によつて招来される。

ファージ粒子と抗体粒子の結合は稀釈によつては遊離しない。しかし乍ら、超音波或は抗体を消化する酵

素パバイン等で処理することによつて、これらの複合体から活性ファージ粒子を分離できることが知られている。従つて中和されたファージは抗体によつて破壊されず、たゞその活性表面が覆われたにすぎないことが理解できる。

以上の法則はすべて、過剰の抗体の存在下においては、ファージの中和をおこすようなファージ粒子と抗体粒子の結合が一次反応的に進行すると考えることによつて一義的に説明づけることができる。即ち、ファージ粒子の中和は一個（或は多くも二個）の抗体粒子がファージ粒子の活性部分と結合することによつておこることが、これらの現象から結論されよう。

この事柄は重要であつて、ウィルス一般の抗血清による中和現象の解釈に基礎的な手がかりを与えるであろうし、又、中和速度の定量的観察によつて個々のファージ粒子の抗原分析が可能になるのである。即ち、個々のファージ粒子が僅か一、二個の抗体粒子の附着によつて中和されるということは、ファージ粒子の表面のうち、ごく限局した狭い“急所”において中和反応がおこることを意味しよう。その場所は、同時に、そこでファージが菌に吸着し、そこを介して感染侵入が成立する場所であると考えて差つかえないように思われる。こゝではその場所を感染局面と呼ぶことにする。

T2ファージの感染現象に関する電子顕微鏡的観察⁹⁾や、血清学的分析等の実験結果から、T2（及びそれに類縁のファージ）ではこの感染局面は粒子の尾端に存在することが一般に認められている。

TABLE 4. ADSORPTION EXPERIMENT WITH HALF-NEUTRALIZED β PHAGE PARTICLES.

Procedures: The β phages neutralized by the specific antiserum for 5 minutes exposure in 37 C broth which contains 1,000 fold diluted anti-β rabbit serum was diluted 1 : 100 into broth culture of either KA or BI strain at the concentration of about 3×10^8 cells per ml.

After 10 minutes adsorption time the phage-cell mixture was centrifuged and the phage titer remained unadsorbed in the supernatant was assayed with either KA or BI indicator strain.

	Adsorbing cell	Phage titer after a treatment by specific antiserum per ml		Adsorption rate (%)
		Before Adsorption	After adsorption (Titers in supernatant)	
Active fraction of β against BI (Original titer was 1.73×10^6 /ml.)	KA	1.42×10^6	1.5×10^6	0
	BI	1.42×10^6	7.2×10^5	49
Active fraction of β against KA (Original titer was 4.2×10^5 /ml.)	KA	6.5×10^4	4.8×10^4	25
	BI	6.5×10^4	3.6×10^4	45

2. β ファージの二相性中和曲線の解析

既にのべたように β ファージを対応抗血清で処理する際にみられる中和反応を、異なる二種の指示菌 (KA 及び BI) で測定すると、其処に全く異なる二種の反応速度係数が得られる。

この現象が、指示菌に対する使用抗血清の作用によるものではないことは、検定平板に直接中和実験に用いられる量 (或はその10倍量) の抗血清を加えても、ブランク数には何等の影響がないことからたしかめられた (表2)。

又、この現象がおこる、別の可能性として考えられた仮定：即ち、このファージが夫々 KA 菌又は BI 菌のみを侵すような異質のファージ群から構成されるという場合は、まづ β を KA 菌で増強した場合でも、或いは BI 菌で増強したもので、何れも同様の二相性の中和現象を示すこと (図1) により、更に、表3に示したような混合指示菌を用いる実験によつて棄却された。

従つて、我々の二相性中和現象を説明するためには、個々のファージ粒子が夫々異なる感染局面を有するという仮定が残される。

こゝで、この可能性は更に次の二つの場合にわけられよう、即ち：

1. 各ファージ粒子は均質な感染局面構造 (例えば a という記号であらわすとして) をもっているのであるが、各菌に感染するために必要な量において差がある場合 (例えば我々の場合では BI 菌に対しては aaa という構造が対応し、KA 菌に対しては a という構造が対応するというような場合が考えられる)。

2. 各ファージ粒子は別種の感染局面構造、例えば KA 菌に对应する a という構造及び BI 菌に对应する b という抗原構造をもつていると考える場合。

これらの2つの仮定のいずれが事実であるかは、我々の実験結果から決定的に判断することはできない。しかし、図1にみられる中和曲線が——KALMANSON 等の場合と同様に——夫々 single-hit 曲線であることは、どちらかといえば上の2つの仮定のうち後者を支持するように思われる。これらの理由によつて、我々は次のような結論に導かれる：

β ファージは夫々 KA 菌及び BI 菌に対する2種の (恐らく異なる構造を有する) 感染局面を有し、各々の感染局面は夫々に対応する抗体粒子によつて夫々異なる反応速度で single-hit 的に不活化される。

β ファージと KA 菌及び BI 菌との間にみられる生物学的現象のうち、顕著な差を示すものに溶原化現象がある。即ち、菌あたり数個の β ファージの感染した KA 菌のうち約95%の部分は溶菌し、残りの約5% (以下) の部分が溶原菌になるのに反し、同様の条件で β の感染を受けた BI 菌はその90%以上が溶原化するのである。これらの現象については別に報告する予定であるが、これらの事実も β ファージ粒子が異質の感染局面構造をもっていることを裏書きするに思われる。

いうまでもなく、すべての polyvalent なファージがすべて我々の場合や KALMANSON 等の場合にみられたように、異質の感染局面を持つているということとはできないであろう。むしろ、多くの場合は事情は別であるかも知れない。——いづれにせよ、我々はこの種のデータがもつと豊富に提出されることをこゝに期待したい。

総括及び結論

溶原性ファージ β 株を、それに対応する免疫血清を用いて中和実験を行つたところ、二種の検定指示菌 KA 及び BI に夫々対応して、顕著な差をもつような二つの中和反応速度係数が得られた。

このことの理由を検討するために数種の実験を行つた結果、上記の現象は、個々の β ファージ粒子が夫々 KA 菌のみ又は BI 菌のみを侵しうような二種の感染局面を有しており、その各局面が夫々に対応する抗体粒子と夫々異なる反応速度で中和反応をおこすことによつて生ずるという結論が得られた。

尚、本研究は著者が千葉大学医学部細菌学教室に在籍中、川喜田愛郎教授の指導の下に行われたものである。終りに臨み川喜田教授並に寺島東洋三氏の御教示に深謝したい。

文 献

- 1) KALMANSON, G. M., and BRONFENBRENNER, J. Evidence of serological heterogeneity of polyvalent "pure line" bacteriophage. J. Immunol. 45: 13-19, 1942.
- 2) 寺島東洋三, 2種の異つたファージを産生する大腸菌の lysogenic strain に就いて. ウイルス, 5 (2): 108-111, 1955.
- 3) ADAMS, M. H., Method of study of bacteriophage. Methods in Medical Research. 2, 1-73, Year Book Publisher.
- 4) LURIA, S. E., General

Virology, p. 122-123, 1953. 5) ANDREWES, C. H., and ELFORD, W. J., Observations on antiphage sera. I. The "percentage law". Br. J. Exp. Path. **14** : 367-376, 1933. 6) DELBRÜCK, M., Effect of specific antisera on the growth of bacterial viruses. J. Bact. **50** : 137-150, 1945. 7) ANDERSON, T. F., and DOERMANN, A. H., Sonic reactivation of antiserum-neutralized bacteriophage T3. J. Bact. **63** : 291-292. 8) KALMANSON, G. M., and BRONFENBRENNER, J., Restoration of activity of neutralized biologic agents by removal of the antibody with papain. J. Immunol. **47** : 387-407, 1943. 9) ANDERSON,

T. F., The morphology and osmotic properties of bacteriophage systems. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **18** : 197-203, 1953. 10) LANNI, F., and LANNI, Y. T., Antigenic structure of bacteriophage. *ibid.*, 159-168, 1953. 11) DEMARTH, R. I., LURIA, S. E., FISHER, H., and LEVINTHAL, C., The production of incomplete bacteriophage particles by the action of proflavine, and the properties of the incomplete particles. Ann. Inst. Pasteur. **84** : 113-128, 1953. 12) 田波 洋, フェージ吸着現象に及ぼす温度の影響. ウイルス, **3** (1) : 16-23, 1953.

ムンプス 脳膜 脳炎

髄液からのムンプスウイルス分離に就いて

徳 田 正 夫 *

MASAO TOKUDA : MUMPS-MENINGOENCEPHALITIS :
ISOLATION OF VIRUS FROM THE SPINAL FLUID

〔受稿：11月17日，1955〕

I 緒言及び文献

ムンプス（以下「ム」と略す）は単独に或いは睾丸炎を伴つて耳下腺の発赤、腫脹を来す事は古くから知られ、又脳膜脳炎が耳下腺炎の合併症として発生する事も知られているが、之等の診断は普通には臨床的に容易である場合が多い。しかしながら耳下腺炎を伴はないで単独に睾丸炎、脳膜脳炎を来とし、或いは之等の合併症を起す事がある。N. K. Connollyは現在の概念では「ム」ウイルスは向神経性ウイルスであると述べ、又彼は Candel の言葉を引用して、中枢神経が「ム」ウイルスに感染した場合でも、髄液の細胞反応は高率に出るが、神経症状の出るのはその約10%にすぎないと述べている。之等耳下腺炎を伴はない「ム」脳膜脳炎の適確な診断を下す事は臨床的には非常に困難で、髄液の細胞数特に淋巴球数の増加をその主たる拠り所としているが、猶淋巴球性脈絡脳膜炎、小児麻痺

或いはその他のウイルスによる脳膜脳炎、良性漿液性脳膜脳炎等との鑑別が困難である。しかしながら髄液からのウイルス分離試験、血清或いは髄液の免疫学的諸反応等による場合には明確な診断を下す事が可能である。

「ム」脳膜脳炎患者の髄液からの「ム」ウイルス分離については C. Swan 及び J. Mawson (1943)⁴⁾ が猿を用いて初めてその成功例を報告した。K. Habel (1945)⁵⁾ W. I. B. Beveridge et al (1946)⁶⁾ 等が「ム」ウイルスの分離及びその継代に孵化鶏卵の優秀なる事を証明してより後は「ム」ウイルスの分離には専ら孵化鶏卵が用いられ、G. Henle 及び C. L. Mc Dougal (1947)⁷⁾ は耳下腺及び他の腺の腫脹を伴はない脳膜脳炎患者の髄液より孵化鶏卵の羊膜腔内接種法によつて「ム」ウイルスを分離した。L. Kilham et al (1949)⁸⁾ は17例の非麻痺性小児麻痺患者の中 6 例が血清反応によつて「ム」脳膜脳炎である事を証明し、その 6 例の中 3 例の

* 京都大学医学部微生物学教室（主任 木村廉教授）