 原 著

溶原化の機転に関する研究

第1報 potential prophage の確認*

遠 藤 啓 三**

KEIZO ENDO: STUDIES ON THE MECHANISM OF LYSOGENIZATION.

(1) THE RECOGNITION OF THE POTENTIAL PROPHAGE.

〔受稿 1月26日 1960〕

結 言

テンプレート・ファージをそれに感受性をもつ宿主菌の培養に混合すると、それらの量比によつて若干の相異があるが、通例溶菌があこり、つづいて二次増殖がおこる。このことは、テンプレート・ファージの感染した菌集団のある細胞においてはファージ産生と共に溶菌がおこるに反し、他のものでは溶原菌が形成され、それが増殖するためであると考えられている (Boyd 1952)³⁾。

以下にのべられるファージ・菌系——それらは従来われわれの溶原菌研究に一貫して用いられてきたものであるが、——の場合、この二次増殖を平板に分離するときは、集落の辺縁が完全でない、いわゆる「虫くい集落」が多数証明される。もしこの集落が感受性菌よりでき上つているとすると、虫くい現象は平板にまかれた遊離ファージがたまたまおこした接触による感染で説明されるが、同時にかなりの濃度にファージを含むメジウム内で、感受性菌が増殖ないしは存在していたという矛盾におちいる。従つてこの集落のもとになる菌は、溶原菌ないしは、同種のファージによつては溶菌されない状態の菌と考えざるをえない。しかもこれが集落を作つたさいに部分的に溶菌するというこ

とは、集落の一部に感受性細胞が発生するためであると想像される。

以下の実験は、この現象に妥当な説明を与えるために感染菌 (産生的感染菌***を除く) のその後のなりゆきについて追究したものである。そして溶原化の過程について若干の推論を試みるであろう。

実験材料および実験方法

1) ファージ: 溶原性大腸菌 A34 株 (内田, 寺島, 1952)¹⁰⁾ から放出されたファージ (われわれはそれを前に β ファージと名付けた) を駒込 A 菌 (2) をみよ) にて増殖させたものでその宿主菌に対し、テンプレート・ファージとしての性格を示す。

β ファージ原株は直径約 0.5~1.0mm の円形のやや混濁した小さい溶菌斑をつくる。ここではこの野生型を β^+ と名づける。この β^+ を駒込 A 菌にて増殖させると、明瞭で溶菌斑が大きく (直径約 2~3mm), しかも溶菌斑内に輪状の菌集落をつくる溶菌斑変異株が得られる。それをわれわれは βb と名付ける。(かつて寺島, 1955⁹⁾ はそれを α ファージとよんだが、 β ファージの溶菌斑変異株 (plaque-type mutant) にほかならないのでここにそれを βb と改めた)。これらはテンプレート・ファージとしての性格においても、

* この研究は第6回日本ウイルス学会総会 (1958, 東京) において発表された。

** 千葉大学医学部細菌学教室: (指導 川喜田愛郎教授)

*** 田波, 寺島 (1954)⁵⁾ によつてすでに報告されたように、ある種の菌ファージ系では、感染菌のうち一定の割合の菌は溶原化、あるいは流産感染をすることが知られているが、それに対して溶菌して子ファージを放出するという定型的な経過をとる菌を産生的感染菌とよぶ。

また血清学的にもほとんど差を示さない。以下の実験には主に β^+ ファージ、時には βb ファージが用いられた。 β^+ ファージ液には βb ファージがかなりの率で混在した場合もしばしばあった。

2) 菌：宿主菌および指示菌として、用いられたのは駒込菌原株 (*Shigella flexnerii* type 5, 以下 KA 菌と略す) である。ブイオンで 20 時間静置培養した KA 菌を新しいブイオンに約 $1/40$ 量接種し、2 時間半から 3 時間 37°C において振盪培養して対数増殖期にあるものをいつも使用した。この際、菌数は通例は $2 \sim 3 \times 10^8/\text{ml}$ となる。

3) 培地：普通寒天平板培地および普通ブイオン (いずれも pH 7.4) が用いられた。

4) 溶菌斑算定方法：寒天重層法¹⁾を用いた。被検液 $0.2 \sim 0.5\text{ml}$ に指示菌を 0.2ml 加え、さらに 1.2% 軟寒天を 2ml 加えて普通寒天平板上に重層し、1 夜 37°C に培養のち溶菌斑を算定した。

5) 抗 β ファージ血清： βb ファージを $6 \times 10^{11}/\text{ml}$ に含むブイオン浮遊液を最初家兎に 3ml 筋注し、ついで $2 \sim 3$ 日の間隔にて耳静脈へ 0.3ml 注射し、漸次注射量を増量しつつ最大量 5ml に至るまで計 7 回接種した。採血された抗血清は KA 菌にて十分に吸収され、 58°C 30 分間非働化された。この抗血清の β ファージに対する中和速度恒数 K^* は約 500 である。

6) 溶原性の検定方法および β ファージ感受性の有無の検定方法については、実験の項において記載される。

実験成績

〔I〕 虫くい集落の分析

ファージを接種された菌培養から分離される虫くい集落について、われわれは当初ファージ未感染の感受性菌集落が培地上で遊離ファージと接触したためにおこるものであらうと考えた。従つて実験条件として未感染菌を可及的に少なくするため、high multiplicity で感染をおこなつた。その際、未吸着ファージは抗ファージ血清でできるだけ取除かれた。

しかし、そのような条件ですべての細菌が感染をうけたと考えられるにもかかわらず、その生残菌はやはり虫くい集落をつくることのみいだされた。この集落

の内容を分析した結果、溶原菌の集落が形成される途中に感受性菌が発生して来ると考えられた。以下この実験の詳細を説明する。

24 時間普通斜面寒天にて培養した KA 菌の微量を約 8ml のブイオンに接種し 37°C にて 150 分間振盪培養した。この対数増殖期にある菌液 4.5ml にあらかじめ計数してあるファージ液を 0.5ml 加え全量 5ml としてそのまま 37°C で 10 分間吸着させた。吸着後、冷凍遠心器 (約 8°C) で $6,000\text{ r.p.m.}$, 20 分間遠心沈澱した。この上清のファージを計数し、未吸着ファージ数をしらべた。この際 multiplicity は 4.2 であつた。その後沈澱に 500 倍抗 β 血清を 5ml 加え、よく混和して 37°C にて 10 分間保ち未吸着ファージの中和を行つた。然る後 $6,000\text{ r.p.m.}$ にて 15 分間遠心沈澱し、その沈澱をブイオンにて原量に浮遊してよく混和し、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ に稀釈した後 100 倍の抗 β 血清加普通寒天平板に 2 滴ずつ滴下し、コンラージ棒にてまいた。そして表面をよく乾燥させた後 37°C で 1 夜培養した。また 500 倍抗 β 血清による中和の際、未吸着遊離ファージの大部分が中和されたか否かを確かめるために上清のファージ数の計数を行つた。また溶菌反応をとる菌数をしらべるため、 10^{-5} , 10^{-6} 稀釈液をとり指示菌とともに軟寒天重層法を行い、溶菌反応をとつた菌の計数を行つた。抗血清処理後の上清の未吸着ファージは溶菌反応をとつた菌数に比して無視し得る程度であり、また集落形成菌の約 $1/100$ であるため、平板上における集落形成菌へのコンタミネーションの可能性はほとんどない。

上記実験に使用した、菌数、ファージ数、multiplicity、吸着率、上清の遊離ファージ数、および結果として得られた成績は Table 1 のごとくであつた。

これによると、全感染菌の約 9% が集落を形成している。これが溶原菌であるか、抵抗性菌であるか、または復原反応をとつた菌の集落であるかを明らかにするため、それらの菌のファージ産生能の検査と感受性の有無をしらべた。

ファージ産生能の検査は次のようになされた。被検集落の少量を新鮮ブイオン約 5ml 内に接種し、 37°C で $2 \sim 3$ 時間振盪培養した。然る後 58°C 30 分の加熱処理で菌を殺し、その培養液 0.2ml に指示菌 KA と

$$* K = 2.3 \cdot \frac{D}{t} \times \log \frac{P_0}{P}$$

D = ファージ・血清混合液中の血清の最終稀釈倍数、もし濃度が $\frac{1}{100}$ ならば、 $D = 100$ となる。

P_0 = 0 時間におけるファージ数

P = t 時間におけるファージ数

Table 1. Protocol of experiment.

1. Bacterial number in adsorption tube.
1.9 × 10⁸/ml
2. Number of phages in adsorption tube.
8.6 × 10⁸/ml
3. Number of unadsorbed phage
after adsorption period. 6.0 × 10⁷/ml
4. Adsorption rate. 94%
5. Multiplicity of infection. 4.2
(Number of uninfected cells is reasonably
expected to be less than 2% under these
conditions.)
6. Free phage in last supernatant.
1.3 × 10⁵/ml
(Free phage still remained to be neutral-
ized after the exposure to the antiphage
serum.)
7. Number of infected cells which belong
to lytic response, 8.9 × 10⁷/ml
and its percent in all infected cells.
47%
8. Number and percent of colony formers.
1.7 × 10⁷/ml
9%
9. Percent of lethal response. 100 - (47 + 9)
= 44%

ともに普通寒天上に重層し1夜培養後溶菌斑の生ずるか否かによつて判定した。また感受性の有無は被検集落の少量を新鮮ブイオン5 mlに接種し、37°Cで3時間振盪培養後この対数増殖期の菌を指示菌としてあらかじめ用意してあるβファージ液を加え、較寒天重層法を行つて1夜培養後溶菌斑の出現の有無によつて判定した。

この実験で得られた菌集落群とし、この集落群の中から、任意に15個の集落をとり1から15までの番号をつけ、各集落について上記のファージ産生能の検査と感受性の有無についてしらべた。その結果はTable 2の如くであつた。

この15個の集落中に虫くい集落が5個あつた(No. 1 ~ No. 5)。この5個はすべてファージ産生能を有し、βファージに対する感受性を失つていた。溶原菌の性質をあらわしたこれら5株のうちの1株No. 3集落についてふたたびその分枝群を検討した。すなわち500倍抗β血清加ブイオン5 ml内にNo. 3菌集落の1

Table 2. Assay of phage-producing ability and susceptibility in colonies on the second isolating plate.

No. of Colonies	phage-producing ability	Susceptibility
No. 1	(+)	(-)
No. 2	(+)	(-)
No. 3	(+)	(-)
No. 4	(+)	(-)
No. 5	(+)	(-)
No. 6	(-)	(+)
No. 7	(-)	(+)
No. 8	(-)	(+)
No. 9	(-)	(+)
No. 10	(-)	(+)
No. 11	(-)	(+)
No. 12	(-)	(+)
No. 13	(-)	(+)
No. 14	(-)	(+)
No. 15	(-)	(+)

白金耳を入れ、37°Cで10分静置し菌周囲に付着しているファージを中和し、6,000 r.p.m.にて15分間遠心沈澱を行い沈澱をさらにブイオン5 mlで1回洗滌して遊離ファージを徹底的に洗いおとした。その沈澱を再浮遊して、さらに適当に稀釈した後、第1代目と同じように平板に一滴ずつコンラージ棒にてまき、その表面をよく乾燥させて、37°Cで1夜培養した。かくして得られた第2代目の集落群より第1代目と同様に15個の菌集落をとりNo. 3・1, No. 3・2……No. 3・15, というように番号をつけた(これは第1代集落群のNo. 3集落より分離したNo. 1, No. 2, No. 3……No. 15, 集落というわけである。そして第1代目と同様に、この第2代目の15集落のファージ産生能と感受性の検査を行つた。その結果はTable 3の如く、No. 3・2, No. 3・5, No. 3・6, No. 3・7, No. 3・8, No. 3・10, No. 3・11, No. 3・13, No. 3・15の9個の各集落が溶原菌の性質を表わした。

この第2代目集落群中のNo. 3・2集落をとり、第2代目分離の場合と同様に抗β血清処理および洗滌のうち、第3代集落群を分離した。

この第3代集落群のうちで第2代目の場合と同様に25個の集落をとりNo. 3・2・1, No. 3・2・2, ……No. 3・2・25というように番号をつけた。そしてそのファージ産生能の検査とβファージ感受性の有無をしらべた。その結果、Table 4の如くNo. 3・2・6, No. 3・2・17, の2株がファージ産生能を有した。

Table 3. Assay of phage-producing ability and susceptibility in colonies on the second isolating plate.

No. of colonies	Phage-producing ability	Susceptibility
No. 3. 1	(-)	(+)
No. 3. 2	(+)	(-)
No. 3. 3	(-)	(-)
No. 3. 4	(-)	(+)
No. 3. 5	(+)	(-)
No. 3. 6	(+)	(-)
No. 3. 7	(+)	(-)
No. 3. 8	(+)	(-)
No. 3. 9	(-)	(+)
No. 3.10	(+)	(-)
No. 3.11	(+)	(-)
No. 3.12	(-)	(+)
No. 3.13	(+)	(-)
No. 3.14	(-)	(+)
No. 3.15	(+)	(-)

そして No.3・2・22, No.3・2・24, No. 3・2・25, の 3 株はファージ産生能もなくβファージに対する感受性も失なわれており、いわゆる抵抗性菌であろうと考えられた。

以上の実験によつてファージ産生能力を示す集落は、当然溶原菌を含むとともに、その産生するファージによつて溶かされるところの感受性菌も含むことがわかる。すなわち、1 個の生残集落内には、溶原菌と同様に、感受性菌が生じ、あるいは、溶菌されて虫喰い状を呈し、あるいはみかけ上溶菌されないで共存していることが、上記の集落の分析によつて明らかである。

ところでこの集落の成り立ちについて考えてみよう。この集落の先祖となる感染菌は集落をつくる以上、溶菌反応をとらなかつたことは自ら明らかである。またもしそれが復原反応をとつたとしたならば、その子孫がファージ産生能を示すことはないであろう。なぜなら寒天平板にまかれた感染菌は、二度と外来の感染をうけない条件にあるからである。

この感受性菌が溶原化反応をとつた菌あるいはその子孫より解離されてくるものであろうか、またはそれら自身が比較的高率に感受性菌への復帰をおこすものかどうかは、決定することが出来ない。しかしながら感受性菌がこのように高率に解離してくる以上は、それを解離する菌が溶原性をすでに有していると考え

Table 4. Assay of phage-producing ability and susceptibility in colonies on the third isolating plate.

No. of colonies	Phage-producing ability	Susceptibility
No. 3.2. 1	(-)	(+)
No. 3.2. 2	(-)	(+)
No. 3.2. 3	(-)	(+)
No. 3.2. 4	(-)	(+)
No. 3.2. 5	(-)	(+)
No. 3.2. 6	(+)	(-)
No. 3.2. 7	(-)	(+)
No. 3.2. 8	(-)	(+)
No. 3.2. 9	(-)	(+)
No. 3.2.10	(-)	(+)
No. 3.2.11	(-)	(+)
No. 3.2.12	(-)	(+)
No. 3.2.13	(-)	(+)
No. 3.2.14	(-)	(+)
No. 3.2.15	(-)	(+)
No. 3.2.16	(-)	(+)
No. 3.2.17	(+)	(-)
No. 3.2.18	(-)	(+)
No. 3.2.19	(-)	(+)
No. 3.2.20	(-)	(+)
No. 3.2.21	(-)	(+)
No. 3.2.22*	(-)	(-)
No. 3.2.23	(-)	(+)
No. 3.2.24*	(-)	(-)
No. 3.2.25*	(-)	(-)

* These colonies were determined to be truly resistant by the assay following subcultures repeated.

ことはできない。いいかえれば溶原化反応をとつた感染菌（先祖）、および感受性菌を解離するその子孫の菌は、溶原化反応の方向を取り、しかもまだ溶原性を獲得していない状態にあると考えなければならないだろう。

溶原菌の性質を示す菌集落が、少くも 2 回の平板分離の間、なおも感受性菌と混在しているという事柄はこの段階では説明するに困難である（この問題は考察で再びふれる）。

第 1 代集落群の分析によつて、KA 菌と βb ファージとの間には溶菌反応、溶原化反応、復原反応、致死反応の諸反応が証明されることは、Table 1 に見た通りである。

〔II〕 感受性菌の解離について

実験 1) によって、感染後溶原化反応をとった菌が集落を形成する過程で感受性菌を解離して行くことがわかった。ところでわれわれは、溶原化反応をとった菌がその分裂過程でその菌の分枝群中にどのような比率で感受性菌を生じていくかを確かめようとした。

以下その実験方法を記載する。

普通寒天に24時間培養した KA 菌の微量を約 8 ml のブイヨンに接種し 37°C で2時間30分間振盪培養した。この対数増殖期にある菌液 4.5ml にファージ液を 0.5ml 加え 37°C で10分間吸着せしめた。吸着後、ただちに 6,000r.p.m. で15分間、冷凍遠心し吸着率の測定および感染の multiplicity の決定のためにその上清の遊離ファージ数をはかった。この沈渣をふたたび 5 ml のブイヨンに浮遊し、よく混和した後、適当に (10⁻⁴)に希釈、その 0.2ml を250倍抗β血清加ブイヨン 7.8ml に加え 37°C にて培養しつつ経時的にサンプルをとり 1〜2 滴ずつ平板にコンラージ棒で接種した。その1夜培養後、平板の集落の数をしらべ、またその溶原性の検査を行った。検査の方法は次のようである。

普通斜面寒天に1夜 37°C で培養した KA 菌を小量とりコンラージ棒にて寒天平板に平等にうすくぬり、その上に被検集落の微量を白金耳にてとり線状に接種する。このようにして多数の被検菌集落を画線した(場合によつては、その上に微量の紫外線照射を施した)のち1夜37°Cにて培養すると附図の如くファージ産生能を有する菌集落の周囲に KA 菌の溶菌部が生じ、ファージ産生能を有しない被検菌集落の周囲には溶菌部が生じない。この溶菌部の有無により被検菌集

落のファージ産生能の有無を決定した⁴⁾。ファージ産生能を示す集落は当然その中に溶原菌を含むと考えられる。なぜならファージのコンタミネーションの可能性は抗血清によつて除去されているはずだからである。

1) high multiplicityの場合 (multiplicity 20)。

上記の実験方法にてファージの吸着率は93%であり、感染の multiplicity は20であつた。集落形成菌は全感染菌の約46%であつた。経時的にとつた各平板の菌集落について、105個〜162個を任意にとりそのファージ産生能の有無をしらべたところ、産生能を有すると同定された菌の百分率は、Table 5 のごとくであつた。

すなわち、感染直後には、生残集落の99%が溶原性を保有していたが、この感染菌がブイヨン内で増殖するにつれて、子孫の菌集団内には(集落を作らせたのち)証明される溶原菌の数は、次第に少なくなつてゆ

Table 5. Change of percent of lysogenic center accompanied by the growth of survival bacteria following infection of the high multiplicity (20).

Time of incubation	Percent of lysogenic center	Ratio
0 min.	99.0	1.00
60	79.0	0.80
90	74.0	0.75
120	34.9	0.35
150	16.0	0.16
180	8.4	0.09
210	2.9	0.03
240	4.3	0.04

Table 6. Change of percent of lysogenic center accompanied by the growth of survival bacteria following infection of the low multiplicity (2.2).

Time of incubation	Percent of lysogenic center	Ratio
0 min.	44.0	1.00
60	25.1	0.57
90	19.1	0.43
120	5.1	0.12
150	2.5	0.06
180	2.2	0.05
210	0.9	0.02

附 図

くことがわかる。

2) low multiplicity の場合 (multiplicity 2.2)。

実験方法は、high multiplicity の場合と全く同じに行つた。吸着率が89%で multiplicity は 2.2 であつた。集落形成菌の百分率は全感染菌の約 7.9% であつた。経時的にとつた各平板の菌集落について、173 個から 318 個の集落を任意にとり、そのファージ産生能の有無をしらべたところ、産生能を有すると同定さ

Fig. 1 Growth curves of survival bacteria and lysogenic centres following infection.

The bacterial suspension was mixed with phage in broth. After the adsorption, the mixture was washed once with broth, diluted into fresh broth added with antiphage serum finally and incubated at 37°C. The cultures were assayed on the agar plates containing antiphage serum to count the number of survival (squares) at various time intervals. After the incubation of overnight colonies picked up at random, were tested for lysogeni (citycircles).

Low (2.2) and high (20) multiplicities of infection are shown with solid and empty signs respectively.

れた菌集落の百分率は Table 6 の如くであつた。high multiplicity の場合と異り、感染直後の生残集落の44%しか溶原性を有していない*。しかしこの感染菌をブイヨン中で増殖させ、生じた子孫の菌集団を平板に固定して、そこに証明される溶原性集落の数をしらべるときは、high multiplicity の実験 (Tab. 5) と同じく、菌の増殖につれてそのしめる割合は次第に小さくなつてゆく。

いま生残菌の増殖曲線とともに Table 5, 6 の溶原菌百分率にもとづいて溶原性集落の実数をわりだし、プロットすると、Figure 1 をうる。low multiplicity の実験においては、平板上に生じた菌集落のうち溶原性を示すものの割合がかなり少なかつたため、150分以後における溶原菌の含まれる比率は極めて小さいものとなり、溶原性集落数の曲線はある程度不正確なものとならざるをえない。しかしながら、この2つの曲線より知られることは、溶原菌集落は、感染後90分 (low multiplicity) ないし150分 (high multiplicity) の間、増加するが、その後は生残菌の増殖に比してほとんど増加しないということである。いいかえれば、Figure 1 にみられる菌の増殖は大部分、非溶原菌の増加でまかなわれており、これらの菌は感染後溶原化への反応をとつた菌から発生してくると思えざるをえない。この溶原化反応をとつた菌の菌集団内における存続のしかたを菌の分裂に関係づけて知るために、縦軸に菌集団内における溶原性集落を作る菌の百分率、横軸に時間のかわりに Table 7 に計算された菌の分裂回数 (number of division cycle) をとると Figure 2 のようになる。

この図によると曲線は2~3分裂以後はほぼ直線的に下降してくることがわかる。これが菌の分裂とどういう関係をもっているかを吟味してみよう。

もし感染直後プロファージが成立してしまうとすれば、プロファージは子孫のすべての菌に伝達されるから子孫菌集団内の溶原菌の百分率は、減ずることなく縦軸 1.0 の点より横軸に平行してゆくはずである。

(curve 1). しかし溶原菌百分率が急に下降してゆくという事実は、感染して直ちにプロファージが成立しえないことを意味している。すなわち感染後溶原化反応をとる一定数の菌があつてそれから溶原化反応をとらないものと感受性菌が解離してゆくと考えられ

* これは感染の multiplicity が大きいほど全感染菌中の溶原菌のパーセンテージが大きくなることを示していると考えられる。

Table 7. Relation between the time of incubation and number of division cycle during the growth of survival bacteria.

Time in minutes	N*	
	M=20	M=2.2
60	1.52	1.49
90	2.26	3.27
120	3.58	4.33
150	5.71	5.27
180	6.64	6.75
210	7.77	8.43
240	8.10	9.70

$$* \text{ (Number of division cycle) } = \frac{\log n - \log n_0}{\log 2}$$

n_0 ; initial concentration of bacteria.

n ; bacterial concentration in time t .

M means the multiplicity of infection.

る。一方溶原性集落の百分率の減少ははじめの90分から150分の間、いちじるしくないことが注目されるが、その程度は感染の multiplicity のふえるにつれて著明であるようにみえる。これらの観察から、溶原化の反応を菌に与えているものは感染したファージ物質であつて、Figure 2 の曲線はこれが菌の分裂に伴つて分配されてゆく様相を示していると考えられる。

いま最初に感染した菌に対するファージの比（感染の multiplicity）を M とすると、未感染菌の割合は e^{-M} で与えられる。上の実験のように感染菌が溶けないでさらに増殖するときは、その分裂回数（Number of division cycle）を N とすると菌数は 2^N でふえる。侵入したファージ物質はその数を変えないもの（すなわち、増加や不活性化をしない）と仮定すると、それははじめ1個菌あたり M 個だから、 $e^{-\frac{M}{2^N}}$ の割合にファージ物質をもたない菌が存在することになる。従つてファージ物質を保有する菌の割合は、 $1 - e^{-\frac{M}{2^N}}$ となる。⁶⁾ これを縦軸にとり N を横軸にとると Figure 2 の curve 2（点線； $M=1, 2$ および 20 ）となる。この際、感染したファージ物質をもつ菌と、もたない感受性菌との増殖速度は相等しいと仮定される。Figure 1 の $m=20$ の増殖曲線の初期はほぼすべての菌がファージ物質を含んでいるに反し、 $m=2.2$ の曲線は大部分ファージ物質をもたない菌によるもので、それらの増殖の割合を比較するときは上の仮定はほぼ満足されると考えられる。

Fig. 2 Relation between percentage of lysogenic centres and number of division cycles.

Assuming that the infected phage materials are of particulate nature in the cytoplasm and distributed randomly to daughter cells, we would obtain following formula (see text), where Y means the ratio of lysogenic centres to total population (ordinate), N the number of division cycles undergone by a given time (abscissa) and M is the multiplicity of infection.

$$Y = 1 - e^{-\frac{M}{2^N}}$$

Dashed lines show theoretical curves expected from the multiplicities of infection designated.

If the phage material multiplied synchronously with the division of cells, the ratio of lysogenic centres to survival bacteria should remain constant (curve 1).

理論曲線の性格は、 $M=1$ の場合はファージ物質を含む菌の割合は分裂と共に直ちに指数函数的に減少するが、 M が多くなるにつれて、最初の数分裂の間 plateau をつくり、ついで前者に平行な曲線となる。

実験でえられた二つの曲線を見ると、それはこれらの理論曲線とほぼ平行していて、感染の multiplicity の増加は M の増加と対応するようにみえる。理論曲線とおおむね平行することは菌細胞の溶原化の反応をささえている物質がほぼ増殖しないということ

ある。また感染の multiplicity に応じて理論曲線のように plateau の部分が大きくなるということからは侵入したファージ物質の 1 個 1 個が感染菌の溶原化の反応を支えていることを示している。もし感染菌が溶原化した場合は、プロファージは平等に子孫の菌につたえられるはずだから曲線は横軸に平行となるべきであるが、現在の実験の範囲内（約 4 時間）までではこの曲線の平坦化は観察されなかつた。しかしながら、これらファージ物質を保有する菌は、寒天平板上で集落を作ると、ファージ産生能をもつに至ることは前述のとおりである。これは 4 時間という実験時間の後、しかも 24 時間以前にプロファージが成立するものであることを意味している。実験〔I〕においては、溶原菌の性質を示す集落を分析しても感受性集落と溶原菌を内に含むと考えられる虫くい集落をうるだけで溶原菌のみの集落を検出できなかつたが、これは感染菌中にしめる溶原菌の割合が数パーセントである上に、感染したファージ物質がプロファージとして成立するまでの道程が長い集落中には多量の感受性菌が解離し、それらが成立した溶原菌より生ずるファージでふたたび感染して前と同じ過程をくり返すと考えられるので（田波、私信 1957）、感受性菌の出現する頻度は実は非常に多いものと思われる。

実験〔I〕の成績や、感染したブイオン培養からいつまでも（数日後も）感受性菌を証明する事実——従来テンプレート・ファージを扱っている間にしばしば経験された——はこう説明される。

しかし分離を繰返す間にわれわれは感受性菌をもちや解離しない永続的な溶原菌を分離することができるのはいうまでもない。

要約すれば、テンプレート・ファージ β の感染後プロファージの成立するまで、通常の培養条件では 4 時間以上数時間が必要とされる。その間、ファージ物質が子孫の菌細胞内に伝えられ、同時にかなり多数の非溶原性の感受性菌が溶原化の反応をとつている菌より解離してくるということが理解される。

考 察

テンプレート・ファージ β は、通例の条件で KA 菌に感染した場合、感染後 40 分にして子孫ファージを放出する。しかしテンプレート・ファージは当然あらゆる感染菌を溶菌するのではなく、そのある一定部分を溶原化する性格をもっている。この β ファージは実験 1 においてみられたごとく（また田波・寺島 1953 の

報告⁵⁾ のように）産生的感染（あるいは溶菌反応、溶原化反応）、以外に流産感染、すなわち復原反応および致死反応の諸形式のいずれかをとりものである。これらの諸反応、少なくとも致死反応を除く諸感染形式は細胞内成熟ファージの出現する 25 分より以前に決定されなければならない。

当面の問題とする溶原化の反応は感染後 25 分以前に「決定」されるわけである。（このことは第 2 報にて証明される通りである）。

もしこの感染菌における溶原化反応の「決定」（“decision”）がすなわちプロファージの成立であつたとすれば、この菌の子孫はすべて溶原菌より成り立つはずである。しかしながらはじめのべたようにこの感染菌の子孫がつくる集落は虫くい様の変化をおこすという事実がある。これは実験 I によつて明らかになつたように、多数の感受性菌の解離に起因したものであつた。このことは感染後しばらくの間プロファージと異なる感受性菌を高率に解離するような状況が存続していることを意味している。なぜならプロファージとはファージを産生する遺伝的潜勢力であつて、ほとんどすべての子孫の菌に伝わるべきだからである。

実験〔II〕においてのべたように、溶原性集落を形成しうる菌の百分率と菌集団の分裂回数との関係（Fig. 2）は、第 1 に溶原化反応をになう粒子が感染の multiplicity に比例して多数個生じうるのであること、第 2 にその粒子（ファージ物質）が自身増殖することなく、感染菌の分裂につれて子孫の菌細胞にランダムに分配されてゆくと考えられるとよく説明される。もしもこのファージ物質がこの期間に菌分裂と同調しないまでもある速度で増殖するものであれば、その曲線の傾きは理論曲線のそれより緩やかになるであろう。また、このファージ物質が次第に消滅したり、ある割合でファージ産生へと向うものならば、実験でえられる曲線の multiplicity は理論曲線のそれより少なく現われるであろう。この実験の精度は、被検集落の数において実施上制限をうけるため上記の吟味に対して必ずしも充分とはいえないが、感染細胞においては、侵入ファージ物質がほとんど増殖しないで、そして娘細胞に受動的に配分される期間があるといえる。感受性菌を多数解離する原因はこのように解釈される。この感染菌の子孫からわれわれは溶原菌、すなわち容易に感受性菌を解離することのない、いいかえればプロファージをもつた菌を分離できる。

Lieb (1953)⁴⁾ は感染後のテンプレート・ファージはおそらく細胞の遺伝子のプロファージ部位に接合し、遺伝機構に合体することによりプロファージに転化するものと考えた。そしてこのプロファージになるまでの期間を大腸菌 λ ファージにおいて温度感受性の面より測定し、その期間を reduction time と名付けた。Lieb の λ による実験における reduction time は 37°C で約 1 時間であつたに対し、われわれの行つた β ファージでは実験 [Ⅱ] に示したように明瞭な時間を指摘することは出来なかつたが、4 時間以後と考えられる。Lieb はこの reduction に関与するファージ物質を potential prophage と呼んでいる。そしてこの potential prophage が reduction をおこすまでの間、その感染菌から感受性菌が分離して来ることを証明した。これらの現象はわれわれの実験においても等しく証明された。

G. Bertani (1954)²⁾ が定義した preprophage も彼が言っているように本質的には Lieb のいう potential prophage に該当するものと思われる。彼はそれを、感染ファージが溶菌か溶原化かの不可逆な段階をとる以前に一時的にブロックされたファージ発育環の一状態として考えた。

田波 (1957)⁶⁾ は β ファージと駒込 BI 菌において実験し、プロファージが成立するまでには 7~11 世代を要し、かつその間いわゆる preprophage は増殖することなく、ただ菌の子孫に稀釈されつつ伝わるということをしてのべている。われわれの実験において認知される感染ファージの状態は、上述の諸研究者のいうところの potential prophage あるいは preprophage と本質的に同一と考えることが出来る。ことに田波の成績とは reduction がおこるまでの時間を除いては、全く同じと見られるが、その差は宿主菌の相違や実験の際の生理的条件に起因するものと考えられる。

総 括

テンプレート・ファージ β がその宿主菌 KA (*Shigella flexnerii*, type 5) に感染したとき生ずる虫くい集落は、ファージがプロファージになるまでの間

に解離した感受性菌の部分的な溶菌によつて説明される。この感受性菌はファージが感染してからプロファージとなるまでの間、感染菌の増殖に伴つて解離する。逆にいうならば、溶原化反応を支える粒子はそれ自身ほとんど増殖せず子孫の菌へと受動的にうけ伝えられてゆくもので potential prophage と同一のものと考えられる。

potential prophage の期間はこのファージ菌系では特に長い。これはまた虫くい集落が高率に見出されるゆへんでもある。

稿を終るにのぞみ御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜つた恩師川喜田愛郎教授に感謝の意を表します。

また終始御指導、御鞭撻下さつた寺島東洋三博士ならびに多大な御援助を惜しまなかつた教室員の各位に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Adams, M.H.: Method of Study of Bacteriophage. Methods in Medical Research, 2, 1-73, 1950. Year Book Publisher.
- 2) Bertani, G.: Studies on lysogenesis. III. Superinfection of lysogenic *Shigella dysenteriae* with temperate mutants of the carried phage. J. Bact., 67, 697-707, 1954.
- 3) Boyd, J.S.K.: The role of mutation in the survival and multiplication of bacterial viruses. The Nature of Virus Multiplication. Cambridge Univ. Press., 119-148, 1953.
- 4) Lieb, M.: The establishment of lysogenicity in *Escherichia coli*. J. Bact., 65, 642-651, 1953a.
- 5) 田波洋・寺島東洋三: 細菌ウイルスの感染の諸型式. ウイルス 4, (2), 109-114, 1954.
- 6) Tanami, Y.: Studies on decision and establishment of lysogenization in a *Shigella flexnerii*. Virus (Japan) 7, 55-62, 1957.
- 7) 田波洋: 私信, 1954.
- 8) 寺島東洋三: 2 種のファージを産生する溶原性大腸菌 A34 株のファージ誘発に関する実験. ウイルス 5, 101-110, 1955.
- 9) 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 について. ウイルス 5, 108-112
- 10) 内田清二郎・寺島東洋三: ファージ産生大腸菌株の検出成績. 日本細菌学雑誌 7, 12-15, 1952.