Fig. 4.

(Middle stage)

HeLa cells 48 hours after infection.

Twelve basophilic inclusions are seen just like a section of onion in the elongated nucleus (center of the picture), and they are surrounded by rearranged chromatin mass. 800 $\times$.

Fig. 5. HeLa cells 96 hours after infection. (Late stage)

In most of the cells chromatin mass condense at the center of nuclei, glassy background are seen between nuclear membrane and central mass, and cytoplasm almost disappear. 800 $\times$.

溶菌も溶原化も起さぬファージ感染*

中 川 昭 久**・内 田 孝 宏**
植 竹 久 雄**・牧 野 利 一**

AKIHISA NAKAGAWA, TAKAHIRO UCHIDA, HISAO UETAKE and
TOSHIKAZU MAKINO: PHAGE INFECTION LEADING NEITHER
TO LYSIS NOR TO LYSOGENY

緒 言

ϕ^{34} ファージは E_3 群サルモネラの産生するテンペレートファージで、 E_2 群の菌株に感染し、溶原化すると共に O 抗原を 3,15 から (3)0534 に変換する (Uetake 1956; 中川(昭) 1957a, 1957b, 1959; 原田 1956a, 1956b)。又 ϕ^{34} ファージに性状を異にする変異株のあることも明かにされた (中川等, 1959) が、その研究中に E_2 群の *S. selandia*, *S. kinshasa* *Escherichia freundii* 4598-53 の三株が 3, 15 の抗原構造をもつにもかかわ

らず、 ϕ^{34} に対する感受性が異常なことを見出した (内田, 1957 中川等, 1959)。そしてこれらの菌株は ϕ^{34} を吸着し核酸の注入をうけるにもかかわらず溶菌も溶原化も殺菌もうけないことが確かめられた。本報ではこれらの成績をのべる。

実験材料と実験方法

菌株：サルモネラ菌株はすべて国際標準株で、日本腸内細菌委員会より分与をうけたもの。*S. newington* C₂, *S. selandia* 7482, *S. kinshasa* 309 は夫々 84,

* 本研究には文部省科学研究費の補助を受けた (植竹)。

** 札幌医科大学微生物学教室

85, II-2 と略記する.

Escherichia freundii 4598-53 は Dr. P. R. Edwards より分与をうけたもので 3, 15:Z₃₆ の抗原構造をもつ(Edwards et al. 1954). これは4598と略記する.

85M, II-2M(=E II-2M)については中川(昭)(1957 a)が報告した. 85M, II-2M を抗34因子血清中で培養して ϵ^{34} を失った株 85MR, II-2MR を夫々得た.

ファージ株, 溶原化された菌株の記号, ファージ吸着の検査法, ブラック算定法等はすべて中川の報告(1959)と同じ.

ファージによる殺菌のしらべ方: プイヨン1夜培養或は対数増期培養を稀釈し約 2×10^5 /ml の菌細胞とし, 2×10^6 /ml のファージを等量混合し, 37°C30分おいてから稀釈して生菌数算定を行った. 稀釈前に予め抗ファージ血清で遊離ファージを中和した実験と中和せぬ実験と共にを行った.

抗 ϵ^{34} ファージ血清: ウサギ免疫血清で中和速度恒数 $k=130$ のものを用いた.

抗菌血清の製法, 因子血清の製法, 凝集反応の術式はすべて型の如く行った. 抗34因子血清は抗84(ϵ^{34}) O 血清を84で吸収し, 抗15因子血清は抗A(ϵ^{15}) O 血清をAで吸収して作った(A=*S. anatum*). 凝集価は夫々640倍, 1280倍である. O凝集反応は50°C 2時間後室温に1夜おいて判定した.(Kauffmann, 1954; 伝研学会, 1951)

溶原性の検査: 1) プイヨン培養上清につき寒天重層法でファージ産生をしらべた.

2) 指示菌液を重層した平板寒天に集落のレプリカを行ってしらべた.(Uetake et al, 1958, 萩原, 1959 a)

紫外線感受性検査: 対数増殖期菌細胞を磷酸緩衝液で100倍に稀釈, その5ml を滅菌シャーレにとり, マツダ殺菌灯(GR 1510型15W)で80cmの距離から照射して時間を逐つて生残菌数をしらべた(Uetake, 1959).

実験成績

1. 吸着

85, II-2, 4598 は何れもO抗原3, 15をもち ϵ^{34} を吸着する. 夫々の吸着速度恒数Kは Table 1 に示す通りである.

2. 殺菌

85, II-2, 4598 には何れの ϵ^{34} 株を, m.o.i=5位で

Table. 1 Adsorption of phage ϵ^{34}

Phage strain Bact. strain	Adsorption rate constant ($\times 10^{-9}$ ml min $^{-1}$)			
	K	Tu	k	tu
84	1.31	3.54	2.66	5.64
85	1.58	1.12	0.78	0.90
II-2	0.69	0.63	0.89	0.61
4598	0.47			

Phages employed were those propagated on *S. newington* (=84).

感染させても生菌数の減少は全然みとめられなかった. これは中川(1959)の報じた通りである. それで m.o.i を遙かに高くして菌細胞約 10^5 /ml に対しファージ約 10^9 /ml の割合に混合してしらべてみたが, それでも生菌数の減少は認められなかった. 又テンプレートファージの代りにビルレントファージを用いても同じ成績であつた(Table 2). ファージと菌細胞を混合後, 抗ファージ血清を用いなくとも同様に生菌数減少は認められなかった.

Table. 2 Killing of cells by phage ϵ^{34}

Phage strain Bact. strain	Proportion of cells killed by phage ϵ^{34} (%)			
	K	Tu	k	tu
84	95.6	93.6	25.0	28.3
85	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
II-2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4598	0			

Notes are the same as in Table 1.

Parentheses indicate results by infection with virulent mutants of respective phage strains.

又対数増殖期の4598 8.5×10^7 /ml に m.o.i=5.2 の割合に ϵ^{34} を感染させた場合, 生菌数の推移は Fig. 1 に示す様に対照未感染培養と同じ様に増殖する. 即ち感染により菌細胞の増殖に著しい影響はないものとみられる.

3. ブラック形成

1) 殺菌でしらべると数%以下の菌細胞の死滅を検出することは困難である. 云いかえれば数%以下の菌細胞でファージが増殖し細胞が殺されても killing test ではつかめないことになる. そこで夫々の細胞と夫々のファージを混和後, 感染中心の形成をしらべてみた. しかしこの場合も 85, II-2 夫々と K, Tu, k,

tu, 4598 と K の組合せではブラックの形成は全くみとめられなかつた (Table 3). ファージは 10^9 /ml から 10^3 /ml 迄, 種々の稀釈につき重層法でしらべたが, 何れの場合もブラック形成はみられなかつた.

2) 然し各菌細胞を軟寒天培地と共に重層してその上にファージの種々の稀釈液を spot してしらべたところ, 85, II-2 は何れのファージでも全く溶菌を示さなかつたが, 4598 は 10^{10} /ml のファージ液を spot した部分だけ溶菌(?)を示した. しかしこの溶菌(?)は通常の溶菌と異り, 非常に濁濁して居り異常なことを思はせるものであつた. そこでこの部分をパイオンにとり, クロロホルムで菌を殺してから上清を夫々の菌株に spot したが, これでは溶菌は全く認められなかつた. 即ちファージ増殖を伴う溶菌ではなさそうである.

4. ファージ DNA の注入

ファージは吸着するが殺菌もファージ産生も認められないなら, 吸着後ファージ DNA は細胞内に注入されるのであろうか?

Table. 3 Efficiency of plating

Bact. strain	Phage strain	K	Tu	k	tu
84		2×10^9 /ml	1.6×10^9 /ml	1.2×10^9 /ml	10^9 /ml
85		0	0	0	0
II-2		0	0	0	0
4598		0			

Notes are the same as in Table 1.

これを確かめる為, 対数増殖期細胞約 2×10^8 /ml にファージ 10^9 /ml を等量に混じ, 37°C に培養をつづけ 30 分後, 60 分後にその一部をとり 100°C 4 分加熱して細胞を殺してから凝集反応で O 抗原 34 の出現をしらべた (Uetake et al 1958; 萩原, 1959b). Table 4 に示す様に何れの場合にもファージの感染を受けた細胞に O 抗原 34 が出現することが知られた. 又テンペレートファージ k の代りにビルレントファージ kv を II-2 に感染させてみたが, ほぼ同様の成績が得られ, 明かに抗原 34 が感染細胞上に証明された. これらの成績はファージ DNA が注入されることを示すものである. 尚抗 3 或は抗 15 因子血清による凝集反応は終始不変で夫々 1280~2560 倍, 640~1280 倍血清稀釈まで凝集を示した.

5. ファージ感染生細胞の溶原性, 抗原, 紫外線感受性

Fig. 1. Growth of *E. freundii* 4598—53 infected with phage ϵ^{34}

ファージ核酸が注入されることが明らかになつたので, その子孫細胞がどうなるか改めてしらべてみた.

1) 感染生細胞の溶原性検査: 菌細胞 2×10^8 /ml とファージ 10^9 /ml を等量に混合し, 30 分後抗ファージ血清で遊離ファージを中和, その後寒天平板にまいて 1 枚の平板に約 50~100 ケの集落をつくらせた.

a) 各平板を紫外線で 80cm20 秒照射後約 2 時間孵卵器に入れ, それから夫々の該当菌株 (未感染) 及 84 を指示菌としてレプリカを行いファージ産生の有無をしらべたが, すべての組合せに於てファージ産生は認められなかつた.

b) 又他方各菌株と各ファージの組合せ毎に, 任意に 20~30 ケ宛集落をとり, パイオンで 1 夜培養後クロロホルムを加えて生菌を殺し, 夫々の該当菌株 (未感染) 及び 84 を指示菌としてスポット法でファージ産生をしらべたが何れの場合にもファージ産生は認められ

なかつた。

2) 抗原34の検査：各組合せ毎に又多数の集落につき直接抗34因子血清によるスライド凝集を試みたが凝集を示す集落は全然見出されなかつた。

3) 紫外線感受性の検査： ϵ^{34} は紫外線誘発可能であるが (Uetake, 1959), 上記生残り細胞の集落は母株細胞と比べ紫外線感受性に差は認められなかつた。

Table. 4 Agglutination of freshly phage-infected cells by anti-34 serum

Bact. strain	Time after infection (min)	Phage ϵ^{34}			
		K	Tu	k	tu
84	0	—	—	—	—
	15	40	—	40	—
	30	160	—	160	—
85	0	—	—	—	—
	30	80	80	320	80
	60	80	80	320	80
II-2	0	—	—	—	—
	30	80	80	80	80
	60	80	80	80	40
4598	0	—	—	—	—
	20	—	—	—	—
	40	640	—	—	—
	60	640	—	—	—

Figures indicate the highest serum dilution at which agglutination occurred.

6. 継代通過実験

ϵ^{34} ファージ各株を別々に夫々 85, II-2 で継代通過して、ファージ増殖の有無をしらべたが10代通過しても全然ファージ増殖の証拠は得られなかつた。4598株でも ϵ^{34} の増殖はみとめられなかつた。

7. 85(Tu_0) 及 II-2(Tu_0) 株について

中川はその第1報 (1957) で85及 II-2 からも ϵ^{34} で溶原化された株のあることを報じている。これは前述の実験成績と矛盾してみえるが、継代により宿主域変

異株が選択され、これにより溶原化されたものであろうか。それとも菌側の変異株が溶原化されたものであろうか。

これらの溶原性株 85M, II-2M を紫外線で照射後ブイヨン培養した上清には84を指示菌とすると夫々10~20/ml, 100~150/ml 程度にブラックの形成が認められる。これは抗 ϵ^{34} ファージ血清で阻止されるから ϵ^{34} ファージによると見られる (これを Tu_0 とする)。然し85, II-2, を指示菌としても全然ブラック形成は認められない。又このファージを85や II-2 で継代通過しても増殖は認められなかつた。

そこで85M 及 II-2M から夫々 ϵ^{34} ファージを失った細胞をとり (夫々85MR, II-2MR と記す), これらを指示菌としてみたが、やはりブラックは形成されず、又10代継代してもファージ増殖は認められなかつた。

次に85MR, II-2MR に84で増殖させた Tu_0 を作用させてその感受性(殺菌と溶原化の有無)をしらべた。その成績が Table 5 である。かなり高い m.o.i. で Tu_0 に接触させると15分接触で85MR も II-2MR も約50%位の細胞は殺される。そして生残り集落の中には溶原化され抗原34をもつ様になつた集落が検出される。兎が同じ Tu_0 を85や II-2に作用させたのでは殺菌も起らないし溶原化もおこらない。85や II-2 を Tu_0 と混合して37°Cに1夜おいてからしらべても溶原化は認められなかつた。又一方 Tu_0 の代りにK或はTuを用いたのでは85MR や II-2MR でも殺菌も溶原化も認められなかつた。

従つて以上を括めると85MR, II-2MR は夫々85, II-2 と少し性状を異にし、又 Tu_0 は Tu, K と異なることが知られる。II-1(Tu_0) と II-1(Tu)とは異なる (中川, 1959) から Tu_0 は Tu ととも異ると見られる。即ち菌細胞も異りファージも異なるのでその組合せで溶原化が成立したものと解される。

Table. 5 Susceptibility to phage ϵ^{34} of the strains, 85MR and II-2MR

Bact. strain	Phage ϵ^{34}	Tu_0			Tu or K		
		Survival (%)	Antigenic variants	Colonies tested	Survival (%)	Antigenic variants	Colonies tested
85MR		45.5		3/20	100		0/20
II-2MR		52.3		5/15	100		0/20
85		90		0/30	100		0/20
II-2		100		0/30	100		0/20

About 2×10^5 /ml of growing cells and 10^9 /ml of phage ϵ^{34} were mixed in equal amount and kept at 37°C without aeration. At 15 minutes samples were plated out for surviving cells and resulting colonies were tested for antigens.

総 括 考 按

85, II-2, 4598 は一般の E₂ 群サルモネラと同じ O 抗原構造 3, 15 をもち ϵ^{34} ファージを吸着し、而も共に DNA は注入されて抗原 34 が感染細胞上に形成されるにもかかわらず、感染細胞は殺されず感染ファージの増殖、溶菌は認められない。又感染をうけた細胞の子孫には ϵ^{34} による溶原化も認められなかつた。即ちファージ核酸の注入は行なわれるけれども、結局は失われてしまうものと解される。テンペレートファージの代りにビルレントファージを用いても結果は同じであつた。

注入されたファージ DNA がレプリケートされたかどうかはしらべてないが、恐らく免疫の細胞に注入された時の様に増殖せずに稀釈され失はれて行くものと推定される (Lwoff, 1953)。而もかかる型のファージ核酸でもその遺伝子機能は働き、抗原 34 が形成されることが知られる。類似の現象は免疫細胞に ϵ^{15} を感染させた場合にも見られている (Uetake & Uchida, 1959)。

又溶菌も溶原化も共に起らなかつたことは溶菌と溶原化へ進む過程に——早い時期の部分に——共通な過程があることを暗示するものかも知れない (Bertani, 1953)。

ファージ核酸の注入をうけても殺菌も溶菌も起らないことに対する説明として次の可能性が考えられる。

1) 菌細胞の酵素でファージ合成に利用されるものが何か欠けているため。E. freundii 869 株 (O 抗原 3, 10) に ϵ^{15} を感染させて生ずる 869 B 株は O 抗原 3, 15 をもつが ϵ^{34} は産生しない。即ちこの場合には溶原化 (恐らく) はおこるが成熟ファージの合成はおこらないと解されているから、本実験とは全く同じではないことになるが、本実験の結果を説明するのに 1 つの類例を提供するものと云えよう (内田, 1957)。

2) 非類縁プロファージが存在するため。その類例は P₁, P₂ (S. Lederberg, 1957) や T₄ の YII 突然変異株 (Benzer, 1957) に見られる。この場合も非類縁プロファージの存在により菌の代謝に変化がおこり、即ち 1) と同じ様な状態になるためかも知れない。

我々の同僚は最近溶原化の過程も非類縁プロファージの存在の影響をうけることを観察している。即ち特殊条件の下で S. anatum (= A) を ϵ^{34} で溶原化して得られた A (ϵ^{34}) に ϵ^{15} を感染させてその溶原化の過程をしらべてみると、少くも 6 時間後までも溶原化が成立

しない。之に対し A に ϵ^{15} を感染させた場合には約 3 時間で溶原化が成立する (Uetake et al, 1958)。即ち A (ϵ^{34}) では明かに ϵ^{34} の存在が ϵ^{15} のプロファージ化を妨げていると解される (萩原, 未公表)。

感染性ファージの産生を伴はないファージ感染を流産感染と云うが、流産感染では通常感染細胞は死滅する点が本実験例と異なる。流産感染の特別の例として β ファージの赤痢菌への感染例がある。この時は一部の細胞ではファージの増殖溶菌がおこり、一部の細胞では溶原化がおこり、他の一部の細胞では感染後治療が認められる。第 3 の場合を田波等は復元反応と称している (田波等, 1954)。我々の例はすべての感染細胞が元の感受性菌に戻るわけで、感染そのものは成果なしに終るわけであるから、広い意味での流産感染とみなされる。

中川(昭), (1957) はさきに 85, II-2 から ϵ^{34} で溶原化された細胞 (85-M, II-2M) の得られることを報じた。これらの株を紫外線照射してから培養すると極少数の ϵ^{34} ファージが産生される。このファージは 84 ではブラックをつくるが 85MR, II-2MR ではブラックをつくらず、継代しても増殖が認められない。然し 85MR, II-2MR の細胞は一部殺され、又一部の細胞は溶原化もうける。これらの所見に対する説明としては次の 2 つの可能性が考えられる。1) 85MR, II-2MR は Tu₀ の感染をうけても極少数の細胞しかファージを産生せず、且 1 ケの細胞の産生するファージも恐らく少数にすぎない (85M, II-2M のファージ産生が少数) ので継代すると稀釈され失われてしまう。少数の溶原化細胞が生じてても産生するファージ数が極めて少いから、溶原化細胞の割合はふえにくい。且最初の感染で生ずる溶原化細胞の割合は 1/5 以下である。従つて継代で失われる機会が多い。2) Tu₀ は 85MR, II-2MR を通ると unadapted host-induced modification (Luria and Human, 1952; Luria, 1953) をおこすので 150/ml 以下ではブラックも生じないし、又継代で失われてしまう。

85, II-2 は何れの ϵ^{34} ファージでも溶原化が出来ないのに、85MR, II-2MR は Tu₀ で溶原化が成立する。これは菌細胞もファージも共に変異株同志の組合せとなるので溶原化が成立したものと解される。

結 論

サルモネラ E₂ 群の S. selandia, S. kinshasa 及び Escherichia freundii 4598-53 は ϵ^{34} ファージを吸着

し、その核酸の注入をうけるが殺菌も溶菌も溶原化も起らず、又継代培養してもファージの増殖は認められなかった。但し核酸の注入をうけた細胞には一過性に抗原34が形成される。

文 献

- 1) Bertani, G. : Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **18**, 65-70 (1953)
- 2) Benzer, S. : The chemical basis of heredity, 70-93, Johns Hopkins Press, Baltimore, (1957)
- 3) 伝研学友会 : 細菌学実習提要 (1951)
- 4) Edwards, P. R. and McWhorter, A. C. : J. Bacteriol., **63**, 756-757 (1954)
- 5) 萩原 : ウイルス, **9**, 468-472 (1959a)
- 6) 萩原 : ウイルス, **9**, 472-475 (1959b)
- 7) 原田 : ウイルス, **6**, 285-299 (1956a)
- 8) 原田 : ウイルス, **6**, 300-307 (1956b)
- 9) Kauffmann, F. : Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen (1954)
- 10) Luria, S. E. : Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **18**, 273-244 (1953)
- 11) Luria, S. E. and Human, M. L. : J. Bacteriol., **64**, 557-569 (1952)
- 12) Lwoff, A. : Bact. Revs., **17**, 269-337 (1953)
- 13) 中川(昭) : 日細菌誌, **12**, 47-52 (1957a)
- 14) 中川(昭) : 日細菌誌, **12**, 107-110 (1957b)
- 15) 中川(昭) : 日細菌誌, **14**, 693-697 (1959)
- 16) 中川・内田・牧野・萩原 : 日細菌誌 **14**, 845-847 (1959)
- 17) 田波・寺島 : ウイルス, **4**, 108-114 (1954)
- 18) 内田 : ウイルス, **7**, 133-138 (1957)
- 19) Uetake, H. : Proc. Intern. Genetics Symposia, 1956, 645-650.
- 20) Uetake, H. : Virology, **7**, 253-262 (1959)
- 21) Uetake, H., Luria, S. E., and Burrous, J.W. : Virology, **5**, 68-91 (1958)
- 22) Uetake, H. and Uchida, T. : Virology, **9**, 495-505 (1959)