原 著

細菌ウイルスの血清学的中和反応に関する研究

第I報 T2 ファージの多元的中和現象について*

宮 島 吉 広**

YOSHIHIRO MIYAJIMA: STUDIES ON SEROLOGICAL
NEUTRALIZATION OF BACTERIAL VIRUSES

1. POLYPHASIC NEUTRALIZATION OF T2 BACTERIOPHAGE

〔受稿 7月2日 1958〕

緒 言

細菌ウイルス（バクテリオファージ）が抗原性を有し、抗ファージ血清は宿主菌に対するファージの溶菌力を阻止する中和力をもつことは Bordet 及び Ciuca (1921)⁵⁾ によつて最初に報告された。しかし、抗血清によるファージ中和反応の定量的研究は Andrewes 及び Elford (1933)⁴⁾ から始つたと考えられている。

1940年代に至りファージの定量的な研究方法が確立されて以来、ファージ血清学も急激な発展を示し、数多くの業績がとげられて来た。

就中、ファージの中和反応実験では、高度に精密な測定が可能であるため、他のウイルス系では伺い得ぬ多くの重要な知見がもたらされた。それらの知見を総合して、現在では原則的に次の3法則が成立することが一般に認められている。

1) 過剰の抗体が存在する場合では、与えられた血清濃度においては、一定時間中に中和されるファージ量は（かなりの範囲に亘つて）そのときのファージ濃度と無関係にはゞ一定であること。これはふつう“パーセントの法則”と呼ばれている（Andrewes 及び Elford, 1933)⁴⁾。

2) 抗血清によるファージの中和は、生残ファージ部分の対数が、接触時間と血清濃度の積に比例するよ

うに進行する。従つて、一定濃度の血清を用いた場合には、生残ファージ部分は時間と共に指数函数的に減少してゆくこと（Kalmanson 及び Bronfenbrenner, 1942¹³⁾; Delbrück, 1945⁶⁾）。

3) ファージ中和反応は、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こと。

ファージ粒子と抗体粒子との結合は特殊の場合を除き稀釈によつては分離しない^{註1)}。しかし乍ら、超音波（Anderson 及び Doermann, 1952)³⁾ 或は抗体を消化する酵素パバイン等（Kalmanson 及び Bronfenbrenner, 1943)¹⁴⁾ で処理することにより、ファージと抗体の結合体から再び活性ファージを分離できることが知られている。これらのことは、中和されたファージ粒子は抗体によつて破壊されず、たゞその活性表面が機械的に覆われたにすぎないことを示していよう。

× × ×

恐らくファージ粒子の抗原構造の複雑性によると思われる二元性のファージ中和現象は、Kalmanson 及び Bronfenbrenner (1942)¹³⁾ によつて最初に報告され、最近田波 (1955)²⁰⁾ によつて再検討が加えられているが、この現象はウイルス感染機構について新しい考え方をひらいた点で甚だ深い意味を持つているように思われる。

本論文の目的はこのような多元的なファージ中和反

* 本研究の要旨の概略は昭和31年11月、第4回日本ウイルス学会総会において発表した。

**信州大学医学部細菌学教室（指導 田崎忠勝教授）

註1) 特殊の場合として免疫初期の抗血清では、中和された T₄ ファージの大部分が稀釈により再活性化することが最近報告されている（Jerne 及び Avegno, 1956)¹²⁾。

応がどの程度一般性をもつものか明らかにする為と、その現象の分析を通して多価感染性 (polyvalent) ファージの中和機序を解明する点にある。

実験は国際標準株である T1, T2, T4 等を用いて行つたが、いづれについても顕著な多元的な中和反応が見出された。

本報においては T2 ファージについて見出された多元的中和現象を記載する。

実験材料と方法

1. ファージ：用いたファージは T2+ (正常型) ファージである。本ファージは約 $65 \times 80 \text{ m}\mu$ の頭部と、約 $20 \times 100 \text{ m}\mu$ の尾部より構成される特異の形態をもち、後述するように、頭部と尾部は機能的にも抗原構造的にも相異することが知られている^{7), 15), 16)}。その生物学性状のあらましは次の如くである。37°C のパイオン中で、大腸菌 B 株に感染させた場合の潜伏期は約 20 分、菌あたりのファージ放出量 (burst size) は約 200~300 である。37°C のパイオン中での、B 菌に対する吸着は迅速に行われ、約 $10^8/\text{ml}$ の菌濃度においては、5 分間に添加ファージの 80% 以上が吸着する。吸着速度係数は約 $300 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ である。

2. 宿主菌：大腸菌 B 株 (以下単に B 菌とよぶ) の他に次の 3 種の赤痢菌を用いた。

駒込 BIII 菌 (原株) *Shigella flexneri* type 2a,
(以下 BIII 菌とよぶ)

駒込 A 菌 (原株) *Sh. flex.* type 5,
(以下 KA 菌とよぶ)

駒込 BI 菌 (原株) *Sh. flex.* type variant Y,
(以下 BI 菌とよぶ)

T2 ファージは以上 4 種の菌を、いづれも略々等しい効率で侵す。即ち、同一量のファージ液を、夫々の菌で検定した場合に得られるプラーク数は、実験誤差の範囲で互いに略等しい (表 2, 3 参照)。3 種の赤痢菌に対する T2 の吸着は、B 菌に対する吸着よりもやや遅いが、実験に支障を来すことはない。それらに対する吸着速度係数は約 $100 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ 程度である。

3. ファージの記号：あるファージでは、別種の宿主菌で増強すると、ときとして、宿主域に関する表現型の変異を示すことがある。従つて、数種の異なる菌を

用いて実験を行う場合はファージの増殖に用いた菌名を明示する必要がある。我々は以下、ファージの増殖に用いた菌名を角カッコ内に記して、例えば KA 菌で増殖した T2 ファージを T2[KA] というように表すことにする。

4. ファージの用意：実験に用いたファージ液は、いづれも繰返しプラーク分離を行つて純化した上で増強したもので、元のファージ溶菌液は、いづれも $10^{10}/\text{ml}$ 程度の感染価を示した。これらのファージ溶菌液は使用前にすべて 60°C, 30 分間加温し充分分離せしめてある (Sagik, 1954)¹⁷⁾。この加温処理は同時に滅菌になる。こうして用意された T2 ファージ液は氷室 (2°~4°C) に保存すれば年余に亘つて殆んど感染価の低下を示さない。

5. ファージの検定方法：Adams (1950)¹¹⁾ の記載による寒天重層法を用いた。指示菌としては上記 4 種の菌のパイオン培養液を用いたが、条件を一定にするため、常に振盪培養で対数発育期にあるもの (菌濃度は $2 \sim 3 \times 10^8/\text{ml}$) を用いた。

6. 培地及び培養：液体培地としてはすべて普通パイオン (pH 7.2) を用い、培養はすべて 37°C で行つた。

7. 抗ファージ家兎血清の用意：T2[B] ファージのパイオン溶菌液 (約 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ の検定価のもの) を用いて細菌学実習提要 (伝研学会編) の記載に従つて家兎を免疫した。そのスケジュールの概要を記すところの如くである。

夫々 1 及び 5 日目に 5ml づつ皮下注射、9, 14 及び 19 日目に夫々 0.5, 1.0 及び 2.0ml 宛耳静脈内注射、24 日目に試血、25 日目に採血。得られた抗血清は数回に亘つて強く B 菌で吸収し、56°C, 20 分間加温非働化のち、防腐剤を加えずに氷室に保存する。実験に用いた抗血清のファージ中和速度係数は、B 菌で検定した場合約 300 min^{-1} でかなり強い中和能力を示している。

その他の実験方法の具体的なすゝめ方については、それぞれの場所で述べよう。

実験成績

(1) T2 ファージの多元的中和現象。

実験方法、約 $10^7/\text{ml}$ ^{18, 22)} の濃度の T2 ファージ液と、

註 2) 中和実験の際のファージ濃度が高すぎると、ファージ粒子が互に凝集しあう結果、プラーク数の見掛け上の減少、従つて中和速度の見掛け上の増大という誤差が生ずる。この誤差を避けるために、ファージ中和実験は $10^8/\text{ml}$ 以下の低濃度で行われねばならない (Lanni 及び Lanni, 1953)^{15), 16)}。

ブイヨンで1000倍に稀釈した抗ファージ血清を、予め37°C に温めた後、等量あて混合し、37°C のゆぶね中で作用させる。従つて抗ファージ血清の最終稀釈倍は2000倍になる。血清とファージ液を混合したのち、種々の時刻にその一部を取出し、生理食塩水で1000倍に稀釈して抗血清の作用を停止させ、その一定量中の活性ファージ数を夫々B, BIII, BI, 及びKA菌を指示菌として寒天重層法で検定する。それで、このとき検定平板上に添加される抗ファージ血清量は原血清の僅か10-7ml 程度にすぎない。

抗血清によるファージ中和反応の速度係数, k , は次式によつて計算される。

$$\frac{P}{P_0} = e^{-kt/D} \dots\dots\dots (1)$$

$$\dots\dots k = \frac{2.3D}{t} \cdot \log \frac{P_0}{P} \dots\dots\dots (1)'$$

但し, D は抗血清の最終稀釈倍数(上の実験条件では $D=2000$), t はファ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ァージ数をあらわす。

実験結果の一例を図1に示すが、こゝで次のような事柄がまず注目される。

(a) 未中和のファージ数は、約95~99%のファージが中和される迄は、時間と共に exponential に減少してゆくが、それ以後では中和速度が緩徐になること。このように、ファージの中和が進むにつれて中和速度が次第に減じてゆくことは他のファージ系でも一般に見出されることであるが、これは抗体の消費に基くものでなくてファージ集団の抗原性の分布(異質のファージ部分の存在)によることが Delbrück(1945)⁶⁾ によつて明らかにされている。

(b) 次に、T2+ 及び T2r ファージのいずれの場合でも、夫々の指示菌で検定して得られる中和曲線の傾きが夫々異なることと、そこに一定の順位があつて、B菌で検定した場合の中和曲線の傾斜が最もゆるく、以下BIII菌, BI菌, KA菌で検定した場合という順序

Fig. 1 Inactivation curves of T2 phage by the specific anti-T2 rabbit serum assayed on four different indicator cells, *E. coli* B and three *Shigella*, BIII, BI and KA strains.

Inactivation curves were obtained by plotting the logarithm of the surviving T2 fraction against the time at which the inactivation was stopped by dilution.

Table 1. Unneutralized active fraction of T2 bacteriophage and neutralization velocity constant (k)* with a treatment by 2,000 times folded anti-T2 serum at 37° C for 10 minutes.

Indicator strain	E. coli: B.		Shigella flex.: BIII.		Sh. flex.: BI.		Sh. flex.: KA.	
	Plaque counts per plate	Survival fraction of original	Plaque counts per plate	Survival fraction of original	Plaque counts per plate	Survival fraction of original	Plaque counts per plate	Survival fraction of original
Phage		(K-value) min ⁻¹ .		(K-value) min ⁻¹ .		(K-value) min ⁻¹ .		(K-value) min ⁻¹ .
T2[B]	740 × 2	0.320 (230)	515 × 2	0.115 (433)	718 × 2	0.037 (659)	681 × 2	0.019 (792)
Control	472		119		53		26	
Experimental								
T2[BIII]	634	0.153 (376)	600	0.072 (523)	578	0.026 (730)	730	0.015 (840)
Control	112		43		15		11	
Experimental								
T2[BI]	255	0.348 (212)	220	0.073 (524)	260	0.046 (616)	161	0.012 (884)
Control	90		16		12		2	
Experimental								
T2[KA]	540	0.263 (266)	495	0.073 (524)	447	0.040 (645)	441	0.014 (854)
Control	142		36		18		6	
Experimental								

$$*K = \frac{2.3 \times 2000}{10} \cdot \log \frac{P_0}{P}$$

で傾斜が急になってゆくことが見出されよう。

この現象が本論文で取扱うところの多元的中和現象であるが、その事象の内容についての考察は後にゆずる。

(2) 各宿主菌で増強した T2 ファージ間での中和曲線の比較

本節では夫々 B 菌, BIII 菌, BI 菌, 及び KA 菌で増強した T2+ ファージについて、それらの間に多元的中和反応に関して差があるかないか比較検討を試みる。

先にのべたように、夫々のファージ液はプラーク分離を繰返した後、振盪培養中の各菌に加えられ、溶菌が完了するまで培養をつづけて得られたものであつていづれも約 10¹⁰/ml 以上の感染価をもつものである。

前節でのべた実験方法に従つて、夫々 T2[B], T2[BIII], T2[BI], 及び T2[KA] ファージについて行つた 3 回の実験結果のうちの一例を夫々図 2 及び表 1 に示す。こゝに見出される事柄は前節の場合と略々同様であつて次のように纏めることができる。

(a) いづれのファージにおいても、夫々の指示菌に対応して夫々傾斜の異なる 4 種の中和曲線が得られること。

(b) それぞれの中和速度係数の大きさ (又は中和曲線の傾斜) を比較してみると、どのファージについても一定の順序が見出されること。即ち、i 菌を指示菌として計算される中和速度係数を k_i という記号で表わすと、いづれのファージの場合も次の関係が成立することが見出される。

$$k_{KA} > k_{BI} > k_{BIII} > k_B \dots\dots (2)$$

(c) いづれのファージにおいても、夫々の菌で測定して得られる k の絶対値は、実験誤差の範囲で略々一定であり、 k_B は約 200~380 min⁻¹, k_{BIII} は約 430~520 min⁻¹, k_{BI} は約 620~730 min⁻¹, k_{KA} は約 800~900 min⁻¹ の間に夫々分布している (表 1)。

(3) ファージ検定におよぼす抗ファージ血清の影響の検討

ファージ溶菌液中で免疫して得られる抗ファージ血清は、溶菌液中に含まれる菌崩壊物のために該菌に対する凝集素を多量に含んでいるが、これは使用前に該当菌で充分吸収される。又、ファージ中和実験において指示菌に加えられる抗ファージ

ジ血清量は極めて微量（原血清の 10^{-7} ml の程度）であるので、この抗ファージ血清が直接各指示菌に作用して T2 プラークの形成に影響を与えることは先づ考えられないが、念のために次のような実験を行った。

実験方法。標準寒天重層法で T2 ファージの感染価を検定する際に、指示菌液に直接、原血清を 10^{-6} に希釈したものを 0.1ml 加え、この血清が検定平板上の T2 プラーク形成に及ぼす影響をしらべる。こゝで加えられる抗血清量は中和実験のとき検定平板に加えられる抗血清量にほぼ等しい。

表 2 に夫々 4 種の菌で増強した T2 について行つた実験成績の一例を示すが、こゝに、上記の条件で検定平板に加えられた抗ファージ血清はすべての指示菌上でのプラークの形成に事実上何らの影響も与えないことが認められる。

(4) 混合指示菌上のプラーク形成に関する実験

上に記述したような多元性の中和現象のおこる可能性として、T2 ファージ液が夫々指示菌のうちの一つのみを侵すような単価ファージ群によつて構成されている場合を挙げることができるが、このことを検討する方法の一つとして次のような実験を行った。

Figure 2. Neutralization curves of T2 phage assayed with four different indicator strains, B, BIII, BI, and KA.

Procedures were written in the text.

Indicators: ○—*E. coli* B; ×—*Shigella flexneri*, BIII strain; □—*Sh. flex.*, strain BI; △—*Sh. flex.*, strain KA.

実験方法。T2 ファージの適当量（平板あたり数百のプラークがえられるような量）を夫々 B 菌, BIII 菌,

Table 2. The effect of anti-T2 phage serum on the T2 plaque formation when it was added at plating into layer agar.

Phage	Plaque counts per plate with each indicator strain indicated below.				
		B	BIII	BI	KA
T2[B]	With no serum	902	923	880	972
	With 10^{-7} ml of the antiserum	928	892	882	906
T2[BIII]	With no serum	304	330	352	432
	With 10^{-7} ml of the antiserum	330	361	377	405
T2[BI]	With no serum	532	345	385	401
	With 10^{-7} ml of the antiserum	581	398	399	385
T2[KA]	With no serum	141	137	153	193
	With 10^{-7} ml of the antiserum	166	182	204	174

Note: Assaying was carried with 0.2 ml of the each phage stock.

BI菌, KA菌, 及びこれらすべてを等量宛混合した混合指示菌で検定する。

こゝでも上記の可能性が事実であるとしたら、混合指示菌上のプラーク数は夫々単独指示菌上のプラーク数の総和に等しく、かつ混合指示菌上のプラークはすべて半透明である筈である。しかるに、表3に示した実験成績からわかるように、混合指示菌上のプラーク

数は他の単独指示菌上のプラーク数と略々等しく、しかも混合指示菌上のプラークもすべて全く透明なものであつた。

これらの結果から、T2 ファージ液が夫々 monovalent な4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る。

Table 3. Plaque formation of T2 on the mixed indicator strain.

Phage	Plate No.	Plaque counts per plate on each indicator strain.				
		B	BIII	BI	KA	Mixed indicator B+BIII+BI+KA
T2[B]	1.	923	897	962	935	948
	2.	961	907	976	914	962
T2[BIII]	1.	855	923	931	838	901
	2.	872	909	911	877	899
T2[BI]	1.	976	928	998	840	938
	2.	962	846	1028	895	957
T2[KA]	1.	308	355	355	313	364
	2.	314	338	363	280	336

Note: Assaying was carried with 0.2 ml of the each phage stock per plate.

(5) 物理的因子(熱, X線, 紫外線)によるT2ファージ不活化現象

T2 ファージの感染力に対する抗ファージ血清の中和作用が、単純なものでないことは上記の実験結果から伺いえる通りであるが、このような抗体の中和作用と比較する意味で、夫々熱, X線及び紫外線によるT2 ファージの不活化現象を4種の指示菌を用いてしらべてみた。

実験方法

(a) 熱によるT2ファージの不活化実験

T2+[B] ファージの適当量(約4000/ml)を含むブイオン液を64°Cのゆぶねにひたし、3分おきにその一部を取出して、たぐちに型の如く寒天重層法で検定する。

(b) X線照射^{註3)}によるT2ファージの不活化実験

上に用いたと同様のT2+[B] ファージのブイオン液を1.0mlを径2.5cmの小シャーレに入れ(従つて液層の厚みは約2mmにすぎない)、約5°~10°Cの温度で管球から3.5cmの距離で種々の時間照射し、

その一定量を型の如く検定する。用いたX線発生装置はPhillipus型近接照射用X線発生装置で、45kV, 2.5 Ampere, フィルターなしで、液面における空中X線量は約5,000r/min.であつた。

(c) 紫外線照射によるT2ファージの不活化実験。

T2+[B] ファージ溶菌液をM/50 磷酸緩衝食塩水で約1000/mlになるように希釈し、その2.5mlづつを数枚の9.5cmシャーレに分注する。従つて液層の厚みは約0.5mmにすぎない。この各被検ファージ液を、マツダ殺菌灯(15W)で60cmの距離から種々の時間照射し、型の如くその一部を寒天重層法で検定し生残ファージ量を求める。

実験前に食塩水は氷水中にて冷しておき、シャーレは氷室中に保存し、照射時の温度が2°~5°Cであるようにする。

以上の各実験の成績を図3に示すが、いずれの場合でもT2ファージの不活化は指数函数的な減少を示すと同時に、その不活化の速度は検定指示菌と無関係に、どの菌でも同様の価が得られることが認められよ

註3) 本実験は信州大学医学部附属病院放射線医学教室金田教授、宮崎講師並に近藤助手の並々ならぬ御好意によつて行うことができた。記して厚く感謝の意を表する。

う。即ち、熱、X線或は紫外線による T2 ファージの不活化は中和抗体による不活化（中和）とは異なるメカニズムによることが明らかに認められる。抗体によるファージの不活化は恐らくファージ粒子の活性表面

が抗体によつて覆われるためと思われるが、X線や紫外線の効果は恐らくファージの核に作用するものと考えられる (Watson, 1950²¹; Stahl, 1956¹⁸)。

Figure 3. T2 inactivation curves by heat(64° C), ultraviolet light, and Xrays irradiation assayed with four different host cells.

考 察

(1) T2 ファージ粒子の抗原構造と感染機序に就て

ファージの血清学的中和反応の実験的意義は、まづ第一にウイルスの感染防禦の機序を明らかにすることにある。従つてこういう目的の為にその感染のメカニズムが非常に詳しく判つている T2 ファージが実験材料として最適ということになる。

周知のように T2 ファージ粒子は (T4, T6, T5, 或は T1 等と同様に) 特徴のある「おたまじゃくし」形をしているが、T2 の場合では、この頭部と尾部とが抗原的にも機能的にも全く異なるものであることが明らかにされている。即ち、DeMars 及びその他 (1953)⁷⁾、及び、Lanni 及び Lanni (1953 a, b)^{15), 16)}などは T2 粒子の頭部に対応する抗体は T2 粒子を中和する力を持たないことを証明した。従つて、ファージ中和抗体は、尾部のどこかに作用することになる。同様の結論は T5 及びそれに類縁の PB ファージについて最近報告されている。

このような実験結果は、Anderson 等 (1953)²⁾ による電子顕微鏡的観察や、放射能アイソトープを用いて行つた Hershey 及び Chase (1952)¹⁰⁾ による T2 ファージの感染現象の研究から得られた結果と、次のような点でよい一致を示している。即ち、ファージの遺伝的物質 (DNA 部分) は頭部の被膜 (主として蛋白質より成るといわれている) 内に包まれて存在し、尾部は菌表面に対する結合と、DNA 部分の菌体内侵入に導管的役割をすると考えられている。

以上の知見を総合するとき、抗ファージ中和抗体の感染防禦作用は、尾部の何処か (恐らく尾端であろうと推定されているが) に存在する、感染機能に本質的な役割をもつ活性局面——以下感染局面と略称する——を機械的に被覆することによつて効果をあらわすものと考えてよいであろう。

(2) ファージ中和反応の動力学

緒言で一部のべたように、一般に抗血清によるファージの不活化は作用時間に対して近似的に exponential に進行することが認められているが、本実験で用いた血清とファージについてもこのことが正しく認め

られた (図1, 2).

このことは、ファージ粒子の不活化が、原則的に唯一個の中和抗体分子がファージ粒子上のどこかの狭い「致命的な場所」に結合することによつておこることを推定させる。このような考え方は Kalmanson 及び Bronfenbrenner (1942)¹³⁾, Hershey, Kalmanson 及び Bronfenbrenner (1943)¹⁴⁾, Delbrück (1945)⁶⁾ の他多くの研究者によつて支持されているが、特に Jerne 及び Avegno (1956)¹²⁾ による詳細な論議は極めて興味深いものがある。更に Dulbecco 等 (1956)⁸⁾ は、ファージ研究に用いられる技法を組織培養による動物ウイルスの定量的検定法にそのまま応用し、西部馬脳炎ウイルス及びポリオ・ウイルス等に対する中和抗体の作用が、やはり原則的に唯一個の抗体分子の結合によつておこることをその不活化が作用時間に対し exponential に進行することから結論していることも意義深く思われる。

これらの知見において共通に見出しうる事柄は、ウイルスの不活化が近似的に exponential にすゝむという実験的事実であるがこのことに基き、2, 3 の仮定の下にファージ中和反応の動力学を簡単にのべてみよう。

仮定 1. 各ファージ粒子は「致命的な場所」=「感染局面」をもつがその場所は n 個の中和抗体分子と結合できるものとする。

仮定 2. その「致命的な場所」内にたゞ一個の中和抗体分子が結合すると、そのファージ粒子は感染力を失うものとする。

扱、中和反応のおこっている試験管内での時刻 t における遊離中和抗体の濃度を A , $t=0$ (即ちファージと血清をまぜる瞬間) の抗体濃度を A_0 、同様に夫々時刻 t 及び 0 における遊離感染局面面積 (但し、一個の抗体分子と結合する面積を単位とする、従つて一個のファージ粒子は n 単位 の面積をもつ) を夫々 P 及び P_0 とすれば、単位時間内に減少する遊離感染局面面積、 $-\frac{dP}{dt}$, は次式で与えられる。

$$-\frac{dP}{dt} = k_1 PA \\ = k_1 P[A_0 - (P_0 - P)], \quad \dots\dots\dots (3),$$

但し k_1 は反応速度係数である。

こゝで抗体量 A_0 が抗原 (ファージの感染局面) 量に対して過剰な場合、或は反応開始後短時間内の場合

を考えると $(P_0 - P)$ は A_0 に対して無視しうる量となるから (3) 式は近似的に次のように書きうる。

$$-\frac{dP}{dt} = k_1 PA_0, \quad \dots\dots\dots (3)$$

その解は

$$\ln \left| \frac{P}{P_0} \right| = -k_1 A_0 t, \quad \dots\dots\dots (4)$$

こゝで仮定 (1) と (2) から、

$$\frac{V_t}{V_0} = \left(\frac{P_t}{P_0} \right)^n \quad \dots\dots\dots (5)$$

但し V_0 , V_t は夫々時刻 $0, t$ における活性ファージ濃度である。(4) と (5) から、

$$\ln \frac{V_t}{V_0} = n \ln \frac{P_t}{P_0} = -k_1 n A_0 t \quad \dots\dots\dots (6)$$

となつて、生残ファージ量の対数、 $\ln \frac{V_t}{V_0}$ は反応時間 t と直線関係になることが導かれる。

以上は、中和管内の抗体量が略々一定に保たれるような条件についてのみ考えたものであるが、抗体の消費も考慮に入れた場合の解は Dulbecco 等 (1956)⁸⁾ の論文を参照せられたい。

(3) T2 ファージの多元的中和現象の解析

以上述べたことから、抗血清によるファージの不活化は、原則的には、唯一個の抗体分子がファージ粒子の「致命的な場所」に結合し、機械的にファージと菌との結合を妨げて感染の成立を阻止するということが推論される。このことを前提として、こゝに見出された多元的中和反応のメカニズムについて以下考察を加えてみよう。

もし T2 粒子の感染局面が唯一種の抗原成分から構成されているとしよう。そうすれば抗 T2 血清は唯一種の中和抗体のみを含むことになる。そこで、T2 ファージの不活化が唯一個の抗体分子による事実上不可逆的な結合によるものと仮定すれば、個々の T2 ファージ粒子の不活化は all-or-none 的な現象となり、こゝに見出されたように多元的中和現象はあらわれない筈である。

これらの論議から、次のような結論が導かれる。即ち、T2 ファージ粒子はその感染局面においてかなり複雑な抗原構造を有し、夫々異なる菌に対する感染局面構造は互に異なるのではないかと考えられる。

この推定を支持する別の実験的事実として T2, T4, 及び T6 間に中和反応における部分的交叉反応 (cross

reaction) が存在することが挙げられる。即ち、これらのファージは、種々の量において互に共通な抗原を「部分的」にもつてをり、従つて、例えば、抗 T4 血清の中和能力は、T2 ファージで吸収することによつて「部分的に」除去される（その逆も又成立つ）のである (Streisinger, 1956)¹⁹⁾。

この事実は T2 ファージの感染局面の抗原構造がいくつかの異なる成分から構成されていることを意味するものであろう。

同様の結果は T5 と PB ファージの関係でも、Fodor 及び Adams (1955)⁹⁾ によつて報告されている。又彼等は T5 と PB ファージの交雑実験を行い、宿主域的にも血清学的にも両親 (T5 と PB) と異なる、中間的なある態度をとるいくつかの雑種ファージを見出しているが、こゝで、これらの雑種ファージが中和反応及び補体結合反応のいづれにおいても検出できるところの多元的な抗原構造をもっていることが注目される。更に、彼等の実験結果から、これらのファージ粒子はその尾部及び頭部の抗原構造を支配するいくつかの遺伝因子をもつていと推定されることは特に興味深く思われる。

総括及び結論

(1) T2+ ファージとそれでは免疫して得られた家兎血清を用いて中和実験を行つたところ、夫々大腸菌 B 株、駒込 BIII 菌、駒込 BI 菌、及び駒込 A 菌で検定した場合に、相互に顕著な差を示す 4 種の中和反応曲線が得られた。

(2) この多元的中和現象は、上の 4 種の菌のいづれで増強した T2+ ファージについても同様に見出された。

(3) 夫々熱 (64°C)、X 線及び紫外線照射による T2+ ファージの不活化においては、指示菌による不活化速度の差異は認められなかつた。

(4) T2+ ファージの抗血清による多元的中和現象の理由を検討する為に数種の実験を行つた結果、この現象は個々の T2+ ファージ粒子の感染成立に本質的に関与する場所（尾端と推定される）が或る複雑な抗原構造をもっていることに由ると推論された。

終に臨み、終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜つた田崎教授に、又有益な御助言を与えられた田波助教授に、又 T2 ファージの X 線不活化実験に際し御援助を賜つた信州大学医学部放射線医学教室、金田教授、

宮崎講師、近藤助手諸氏に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) ADAMS, M.H. Methods of study of bacterial viruses. In Methods in medical research. Vol. II, 1-73, (1950) Year Book Publishers, Chicago, Ill.
- 2) ANDERSON, T.F., The morphology and osmotic properties of bacteriophage systems. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **18**, 197-203. (1953)
- 3) ANDERSON, T.F. and DOERMANN, A.H. Sonic reactivation of antiserum-neutralized bacteriophage T3. J. Bacteriol., **63**, 291-292. (1952)
- 4) ANDREWES, C. H., and ELFORD, W. J. Observations on antiphage sera. I. The "percentage law". Br. J. Exp. Path., **14** 367-376. (1933)
- 5) BORDET, J., and CIUCA, M. Autolyse microbienne et sérum antilytique. C.R. Soc. Biol., **84**, 280. (1921)
- 6) DELBRÜCK, M. Effects of specific antisera on the growth of bacterial viruses. J. Bacteriol., **50**, 137-150. (1945)
- 7) DEMARS, 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)
- 8) DULBECCO, R., VOGT, M. and STRICKLAND, A. G. R. A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western Equine Encephalitis Virus and Poliomyelitis Virus. Virology, **2**, 162-205. (1956)
- 9) FODOR, W.J., and ADAMS, M.H. Genetic control of serological specificity in bacteriophage. J. Immunol., **74**, 228-235. (1955)
- 10) HERSHEY, A.D., and CHASE, M. C. Independent function of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol., **36**, 39-56. (1952)
- 11) HERSHEY, A. D., KALMANSON, G., and BRONFENBRENNER, J. Quantitative relationships in the phage-antiphage reaction: Unity and homogeneity of the reactants. J. Immunol., **46**, 281-289. (1943)
- 12) JERNE, N. K., and AVEGNO, P. The development of the phage inactivating properties of serum during the course of specific immunization of an animal: Reversible and irreversible inactivation. J. Immunol., **76**, 200-209. (1956)
- 13) KALMANSON, G. M., and BRONFENBRENNER, J. Evidence of serological heterogeneity of polyvalent "pure line" bacteriophage. J. Immunol., **45**, 13-19. (1942)
- 14) 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)
- 15) LANNI, F.,

and LANNI, Y.T. Antigenic structure of bacteriophage T2. Fed. Proc., **12**, 450-451. (1953a) 16) LANNI, F., and LANNI, Y.T. Antigenic structure of bacteriophage. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **18**, 159-168. (1953b) 17) SAGIK, B.P. Specific reversible inhibition of bacteriophage T2 J. Bacteriol., **68**, 430-436. (1954) 18) STAHL, F. W. The effects of the decay of incorporated radioactive phosphorus on the genome of bacteriophage T4. Virology,

2, 206-234. (1956) 19) STREISINGER, G. The genetic control of host range and serological specificity in bacteriophages T2 and T4. Virology, **2**, 377-587. (1956) 20) 田波洋：あるテンプレートなフェージ粒子の二相性抗原構造について. VIRUS, **5**, 366-371. (1955) 21) WATSON, J. D. The properties of X-ray inactivated bacteriophages I. Inactivation by direct effect. J. Bacteriol., **60**, 697-718. (1950)

E₂ 群, E₃ サルモネラの産生する ε¹⁵ phages の 電子顕微鏡学的研究

(サルモネラにおける抗原の人工変換 XIX)

土 屋 厚

ATSUSHI TSUCHIYA: ELECTRON MICROSCOPY OF DIFFERENT STRAINS OF PHAGE ε¹⁵ PRODUCED BY GROUP E₂ AND E₃ SALMONELLA
CHANGES INDUCED IN THE ANTIGENS OF SALMONELLA XX

[受稿 7月17日 1958]

著者はさきに E₂ 群, E₃ 群サルモネラ各菌株の産生する ε¹⁵ phage の血清学的性状並に生物学的性状 (宿主域, 熱抵抗性, 紫外線抵抗性, 溶菌斑の性状, pH 並にクエン酸塩の影響等) について比較実験研究を行った結果, 各菌株の産生する ε¹⁵ phage 相互の間には差異が認められないこと報告した¹⁾²⁾。その後著者はこれらの phages の形態を電子顕微鏡像により確認し, 比較検討したのでその結果を報告する。

実験材料並に実験方法

E₂ 群菌株 ; S. newington, S. selandia, S. newbrunswick, S. cambridge, S. kinshasa.

E₃ 群菌株 ; S. canoga, S. illinois, S. thomasville.

上記の各菌株より得た ε¹⁵ phage について S. anatum を指示菌株として交叉塗抹法又は寒天重層法により溶菌斑をつくらせる。溶菌斑の辺縁に滅菌蒸留水を 1 滴軽くふれさせて得た液を phage 浮游液として鏡検材料に用いた。電子顕微鏡は日本電子光学の 4

型 I を使用した。

実験成績

第 1 図～第 8 図に示すように phage はいづれも頭部と 1 本の尾部からなり, 精子状を呈している。頭部は円型又は不正円型で 52～57×54～62mμ, 尾部は比較的長く 20×162～186mμ である。第 1 表に示す様に各菌株の産生する ε¹⁵ phages 相互の間には形態学的に著しい差異は認められない。

総括並に考按

ε¹⁵ phage の電子顕微鏡像については先に井関³⁾, 原田⁴⁾ による報告があり, 井関は 40～50mμ の粒子であるといふ, 原田は 26～40mμ の球型粒子であるといふ。しかし両者とも ε¹⁵ phage の尾部の存在は認めていない。

著者は前述のように電子顕微鏡像により ε¹⁵ phage が頭部と 1 本の尾部から成る精子状の形態を呈することを確認した。しかし著者の実験においても, 同一株

* 札幌医科大学微生物学教室 (主任: 植竹久雄教授)