hemagglutination in normal animal sera. Bull. WHO. 6: 467 (1952) 16) Burnet, F. M. The effect of periodate on the virus-inhibitory qualities of mucoids in solution. Austral. J. exp. Biol. Med. 27: 361 (1949) 17) Jensen, K.

E., Dunn, F. L. and Robinson, R. Q. Influenza 1957 A variant and the pandemic. Progress in med. Virology. S. Karger. Basel & New York (1958)

溶原菌の各増殖期に於けるX線感受性の変化について*

放射線によるファージ誘発現象に関する研究(第Ⅱ報)

高 幣 常 郎**

TSUNERO TAKAHEI: RADIOBIOLOGICAL STUDIES ON PHAGE INDUCTION IN LYSOGENIC STRAINS (II). VARIATIONS IN THE SENSITIVITIES OF LYSOGENIC BACTERIA TO X-RAY DURING THE GROWTH CYCLE.

[受稿 12月11日 1958]

前報¹³⁾においては私の用いた溶原菌でのX線ファージ誘発現象が原則的に single-hit 的におこることから、放射線によるファージ誘発の機序は主として菌の核部分に対する直接効果によるものと考えられた。

ところが実験を進めてゆくうちに、溶原菌の放射線感受性は照射時の菌の生理的条件によつて顕著に左右されることが見出されたのである。このことは所謂ターゲット説の立場からは、どのように解釈すべきであろうか？

一般に分裂増殖中の細胞の方が静止細胞より高い放射線感受性をもっていることは周知のことである。またX線照射による大腸菌の実験に於ても (Stapleton¹²⁾, 1955), 紫外線を用いた溶原菌の誘発実験に於ても (Jacob 及び Wollman⁴⁾, 1953), 対数増殖期にある菌の方が、定常期の菌よりも一般に高い放射線感受性をもっていることが報告されている。ところが、溶原菌の誘発効果に関して、その増殖周期とX線感受性の変化を追った系統的な実験報告は未だ見当らない。

このように、溶原菌を含めた細菌細胞の放射線感受性が、菌の増殖期のちがいう、ごくありふれた生理的条件のちがひによつて顕著に変動することは、細胞の放射線感受性をきめる因子が何であるかを考える

上に興味ぶかいことであろう。

そこで、私は溶原菌の放射線によるファージ誘発感受性が菌の増殖期と関連してどう変動するのか系統的に追求したところ、二、三の興味深い知見が得られたのでここに報告したい。

実験はX線と紫外線を用いて行つたが、実験成績の記載は便宜上二部にわけて行い、本報ではX線に対する溶原菌の感受性の変動についてのべる。

材 料 と 方 法

試験菌は前報¹³⁾と同じ人為溶原性赤痢菌, KA(β L)株 (*Shigella flexneri*, type 5)-駒込A菌原株に、 β Lファージを感染させて得られた溶原菌⁻、及び駒込A菌(以下KA菌と呼ぶ)である。その一般生物学的特性は田波¹⁴⁾(1956)によつて記載されている。

ファージの検定及びその他の技法は、Adams¹⁾(1950)の記載した広く行われている標準法によつた。 β Lファージの検定には指示菌として赤痢菌、駒込BI菌(原株 *Shigella flexneri*, Variant Y)を用いた。

放射線照射の要領は前報と全く同様である。X線源は島津製作所製 Phillipus 型近接照射用体腔管を用い、45 kV, 2 mA, フィルター無しの条件で照射され

* 本研究は昭和32年度文部省科学研究費によつてなされた。録して感謝の意を表する (田崎)

**信州大学医学部細菌学教室 (指導：田崎忠勝教授)

た。菌液は約 10^5 /mlの濃度になるようにM/50磷酸緩衝食塩水 (pH 7.0) で手早く稀釈し、その1.0mlを内径2.6cmの小型シャーレに分注し、体腔管の対陰極から3.4cmの距離で、 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ の低温に保たれ照射された。上の条件下で試料表面の空中線量は、毎分約5,000 roentgen(r)であった。

一定時間照射後直ちに被照射菌液の0.1mlを取出し、新しいブイヨン (pH 7.2) 9.9ml中に稀釈して所謂放射線の“after effect”を防止する。その稀釈液の適当量 (0.2~0.5 ml) を数枚の寒天平板上に“寒天重層法”で流し固める。以上寒天に重層するまでの操作は、出来得る限りの手早さで行なうよう特に注意した。平板はよく乾燥してから 37°C で一晩培養し、生じた集落数及びブランク数を算えて致死効果及びファージ誘発効果を得る。

実験結果

1. 致死感受性の増殖期による変動

溶原菌に対するX線の効果の変動を、まず殺菌効果の面においてながめてみよう。実験のすめ方は次の如くである。 37°C で16時間静置培養したブイヨン培養菌 (約 2×10^8 /ml) の0.5mlを新しいブイヨン9.5mlにまぜ、強く攪拌したのも 37°C のゆぶねの中に静置培養する。この条件では Growth Cycle は非常に早く、約30分の遅延期の後培養菌は対数期に入り、約3時間

Fig. 1 variation in radiosensitivity of two strains, KA and KA(β L), of various ages.

後ごろから定常期に入つて菌の増殖は殆んど停止する (図1)。この培養中、30~60分おきにサンプルを取出し、氷水中で冷した緩衝食塩水で1,000倍に稀釈してその1.0mlを小型シャーレに分注して先のべた手

Fig. 2 Comparison between radiosensitivities of two strains, lysogenic KA (β L) and non-lysogenic KA.

順で照射し、検定する。

実験結果の一例を図1に示す。この図においては縦軸には生残率（生残集落数/対照集落数）及び単位体積あたりの生菌数（集落を形成するもの）を、ともに対数目盛でめもり、横軸には培養時間が示されている。なお、対照として非溶原性の駒込A菌に関する実験成績を併記した。ここに見られる事柄は次のように纏められる。

(1) KA菌及びKA(βL)菌とも、そのX線感受性は培養後ただちに増大しはじめ、KA菌は培養60分後に最高に達し以後は徐々に回復に向い4時間後にはほぼ始めの値に戻る。ところが、KA(βL)菌の感受性は培養時間とともに更に増大し、その回復はKA菌より遙かに遅れる。このちがいは主としてファージの誘発感受性が対数期の菌よりも定常期菌においてより敏感であることに由来するものと思われる。（図3、4参照）

(2) 同一線量で照射された場合の生残菌率を比較してみると、一般にKA(βL)菌の方がKA菌よりも遙かに感受性が高い（生残率が低い）ことが認められる。

図2に示した成績は縦軸に生残率を対数目盛で示し、横軸に線量を目盛つたものである。ここで見出されることは対数期(60~120分)菌の不活化曲線が近似的に所謂 single-hit 形であることと、今のべたようにKA(βL)菌の感受性の方がKA菌のそれよりも高いことである。初期の不活化曲線が所謂 multi-hit 形であるのは（静置培養のため）菌が幾分凝集しているた

Fig. 3 Induced fraction as a function of X-ray dose for cells of various ages.

めではなかろうかと考えている。

2. ファージ誘発感受性の変動について

増殖期とファージ誘発感受性の関係について行つた実験結果の一例を図3に示そう。

この図の縦軸には誘発率（照射された菌のうち、ファージを産生するように誘発された菌の比率）を線量（横軸）の函数として示してある。ここに明らかに見られるように、菌の致死感受性の変動とは異なりファージ誘発率は菌が対数増殖期に入るにつれて低下し、培養2時間後に最低となり、以後は次第に回復して5時間後にはほぼ始めの値に戻る。前報で述べたように、KA(βL)菌におけるβファージのX線誘発は原則的に次式に従うことが認められる。

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\gamma D} \cdot \gamma D \dots \dots \dots (1)$$

但し $\frac{N}{N_0}$ は誘発率を、 γ はファージ誘発係数を、 D

Fig. 4 Fraction uninduced as a function of X-ray dose for cells of various ages.

はX線量をあらわす。

ここで線量の比較的小さい範囲のみについて考えれば誘発率は近似的に次のように表わされよう。

$$\frac{N}{N_0} = 1 - e^{-\gamma D} \dots\dots\dots (2)$$

或は

$$1 - \frac{N}{N_0} = e^{-\gamma D} \dots\dots\dots (2')$$

即ち、縦軸に誘発しない菌の比率を対数的に目盛るならば、それは線量Dに対し近似的に直線関係をなす筈である。実験成績の一例を図4に示すが、ここに見られるように、各増殖期にある溶原菌におけるX線誘発は夫々感受性は顕著に異なるけれども、そのメカニズムは原則的に single-hit 的であることが推定される。

ここで、ファージ誘発の感受性の変化を菌の致死感受性の変化及び増殖期と関連づけて考察し易いように、溶原菌の増殖曲線を中心として、これ等の関係を図5に示すと対数増殖期の中頃、即ち培養2時間目で菌のX線致死効果が最も高まっている時に、該菌のファージ誘発効果は反対に最低となつている関係が明瞭となる。

Fig. 5 Surviving or induced fraction of strain KA(β L) as a function of the age of the culture.

考 察

本実験における中心問題は、第一に溶原菌KA(β L)株のX線による致死感受性とファージ誘発感受性がその増殖の各時期に従つて弾力的な変動を見せること、第二に該菌の致死とファージ誘発感受性の間の相互関

係について、第三には人為的溶原菌KA(β L)と非溶原菌KA株のX線感受性の比較についてである。

先ずKA菌とKA(β L)菌の集落形成能に関するX線感受性であるが、共に対数期菌に於ては定常期菌よりも強く、また両者を比較する場合、一般にKA菌よりもKA(β L)菌の方が感受性が高く、対数期の後期から定常期の初期にかけて益々その差が大きくなる傾向があつた。また一方、KA(β L)菌のファージ誘発感受性は対数期よりも定常期に於て敏感であつた。

菌のX線感受性が増殖期の違いにより変化することは、Stapleton¹²⁾ (1955)、平野・池口³⁾ (1958)等の成績と同様である。しかし増殖期と感受性の増減との相互関係は必ずしも一様でなく、用いた試験株によつてかなりの差が認められる。即ちStapletonの実験では、大腸菌B/r株を用い、対数期菌に最も感受性が増大し、遅延期菌に於て異常な放射線抵抗性の増加が見られるが、私の実験成績では遅延期の抵抗性増加がない。また、平野・池口の報告によれば、大腸菌B株では遅延期で最も感受性が増大するという。

ターゲット説(Lea 1946)の立場から、Stapletonは、電離線の作用点は主として細胞の核部であるが、その細胞が分裂するまでは効果をあらわさないという考え方に立脚し、放射線感受性の変動を次のように解釈している。即ち急激に分裂しつつある対数期菌の方が、定常期菌より radiosensitivity が高いのは、前者では電離線障害からの回復が充分おこなううちに菌分裂が始まつてしまうためであり、後者では、次の菌分裂までの時間が長いので、その間に電離線障害からの回復がおこりうる為であろうと考えている。また、間接説の立場から Tobias¹⁵⁾ (1950)は細胞に対する放射線の効果を照射の結果、細胞原形質内に生じた毒物が周囲に拡散して行き、細胞内の感受域がその毒物によつて侵されることによると考えている。村地⁷⁾ (1955)は放射線生物学的に、実際の作用点としてターゲットを次のように解釈している。即ち target は放射線により直接電離される部分でなくてもよく、放射線により生じたあるものにより化学変化をうける部分も含めて考えればよいと述べている。

私の実験成績は既述の条件下では、菌の致死及びファージ誘発効果ともにX線の効果は主として直接作用によるものと解釈出来る。各増殖期にある菌の致死とファージ誘発のメカニズムは、その感受性が顕著に変動してはいるが、その何れもが近似的にsingle-hit曲線として表わされる。換言すれば、ターゲットの数は

常に1であり、数の変化はなく、個々のターゲットの感受性が変化すると云える。このことからX線の作用点は菌の核部分であり、菌の核の感受性、即ちターゲットの感受性が増殖時期に従って変化することが推定される。更につき進めた考察は今後の研究に待ちたい。

次にX線に対するKA(β L)菌のファージ誘発感受性を考えてみるに、菌の致死効果の変動とは反対に対数期菌においては却って定常期菌よりも著しいファージ誘発の低下が認められることが注目される(図3, 4, 5)。

溶原菌の誘発効果が菌の生理的条件で影響をうけることは、紫外線誘発の場合Lwoff(1953)⁶⁾; Jacob及びWollman⁴⁾, (1953)の記載があり、また我国では、同様紫外線誘発に於て寺田一門の森内⁸⁾, 青木²⁾, 中島⁹⁾, 野木村¹⁰⁾, 大庭¹¹⁾(何れも1957)の報告があるが、Jacob及びWollman⁴⁾は対数増殖期の菌は90%の紫外線誘発を得られたのに対し静止期並びに停止期菌は、同じ紫外線線量で20~30%誘発しか得られなかつたと云い、寺田門下の諸報告²⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾も、あまり顕著な差はないにしても対数期、時に停止期に誘発効果の増大を認めて居り、ここに得られた如く菌の致死効果とは反対に却って対数期菌に著しいファージ誘発の低下を認めた報告は未だ見られない。

誘発刺激因子としてX線と紫外線の違いがあるとはいえ、注目すべきことである。

本報の実験結果では、同一X線量に於て対数期菌の誘発率は、静止期、停止期のそれに比して約1/3以下という顕著な成績を示して居る事実より、若しX線のファージ誘発効果が単に致死効果の二次的結果であるとすれば、対数期菌においてこそ、誘発率は上昇しなくてはならぬ訳で、このことから既に前報で述べた通り、ファージ誘発効果は菌の致死効果とは別個に起こることが推定し得る。

ここに得られたデータのみから最終的な結論は得られないけれども、前報¹³⁾でのべたように、KA(β L)菌におけるX線誘発は同時に不活化のメカニズムを伴っていると考えられること(本論文(1)式参照)から、対数期菌において却って誘発率が低いことはファージ誘発後の過程の展開が再び不活化されるものと想像される。

総括及び結論

赤痢菌駒込A菌(KA)及びその人為溶原菌KA(β L)菌を用いて、各増殖期におけるX線感受性をしらべた

ところ、次のような結果が得られた。

(1) 同一線量で照射された場合の菌の生残率は、KA A(β L)菌の方がKA菌よりも致死感受性が大であつた。

(2) X線による致死感受性は、KA菌、KA(β L)菌ともに、対数期菌の方が定常期菌よりも著明に大であつた。

(3) 一方、KA(β L)菌のX線によるファージ誘発感受性は、該菌の致死感受性とは反対に対数期菌の方が定常期菌よりも遙かに小であつた。

(4) 溶原菌KA(β L)における β ファージの誘発は該菌の致死効果とは別個に起こることが推定された。

(5) X線による致死及びファージ誘発効果は、各増殖期を通じて、原則的にsingle-hit曲線として表わされた。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師田崎教授、並びに多くの有益な御助言をお与え下さつた田波助教授に厚く謝意を表します。又、X線照射実験に際し貴重な装置の使用に寛大な御便宜を賜つたのみならず、御懇篤なる御指導を賜つた元本学医学部放射線医学教室金田教授(現京都府立医科大学教授)始め宮崎講師、近藤助手他教室員各位に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Adams, M. H.: Methods of study of bacterial viruses. In Methods in Medical Research, Vol. II., The Year Book Publishers, Chicago. 1950.
- 2) 青木茂正: 人為溶原株の誘発に関する研究. 東京慈恵会医科大学雑誌, **72**, 1557-1570, 1957.
- 3) 平野清寿・池口五郎: 菌のGrowth CycleとX線感受性. 日本細菌学雑誌, **13**, 166-169, 1958.
- 4) Jacob, F. and Wollman, L. E.: Induction of phage development in lysogenic bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **18**, 101-121, 1953.
- 5) Lea, D. H.: Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press, 1946.
- 6) Lwoff, A.: Lysogeny. Bact. Review, **17**, 269-337, 1953.
- 7) 村地孝一: 生物に対する放射線の作用. 科学, **25**, 401-404, 1955.
- 8) 森内丈太郎: 溶原性 *S. arechavaleta* のファージ誘発に関する研究. 東京慈恵会医科大学雑誌, **72**, 1893-1902, 1957.
- 9) 中島雅朗: 溶原菌のファージ誘発に関する研究. 東京慈恵会医科大学雑誌, **72**, 1286-1300, 1957.
- 10) 野木村友一郎: 鼠チフス菌溶原株の誘発現象に関する研究. 東京慈恵会医科大学雑誌, **72**, 1931-1943, 1957.
- 11) 大庭隆: 溶原菌に於けるファージ増殖に関する研究. 東京慈恵会医科大学雑誌

72, 1820-1828, 1957. 12) Stapleton, G. E.: Variations in the sensitivity of *Escherichia coli* to ionizing radiations during the growth cycle. *J. Bacteriol.*, **70**, 357-362, 1955. 13) 高橋常郎: 放射線によるファージ誘発現象に関する研究. (I) X線によるファージ誘発の動力学. ウイルス投稿中. 14) 田波洋: 溶原性 (Lysogenesis)

に関する研究. I. 溶原化の成立と人為的溶原菌の生物学的諸特性の比較. *日本細菌学雑誌*, **11**, 391-398, 1956. 15) Tobias, C. A.: The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. Symposium on Radiobiology The basic aspects of radiation effects on living systems. 1950.

光動力学的不活化ウイルスの性質に関する研究

岩 恭 三*

Kyozo IWA: THE NATURE OF ECTROMELIA VIRUS INACTIVATED BY THE PHOTODYNAMIC ACTION OF METHYLEN BLUE

〔受稿 12月12日 1958〕

一般にウイルスは紫外線, X線等の短波長の放射線の直接照射により不活化され, その宿主に対する感染力を失うが, 可視線にはその作用が殆んどない. ところが1933年, Perdau and Todd により数種のウイルスはメチレン青液の中で可視光線の Photodynamic action を受けて不活化されるという報告がなされた. その後, 数人の人々によりその不活化の作用機序に関してかなり詳しい説明がなされた. 特に1954年, Welsh and Adams は Phage 間の光動力学的作用に対する感受性の相異は血清学的分類と関連があるという1933年の Burnet の所見を確認した. 又, 1956年山本は多数の色素を試みて, この作用の強い色素は heterotricyclic の構造を有する塩基性色素であり, その作用機序はウイルス核酸に対する酸化作用であろうと推定した. 而るに, 動物ウイルスに関しては, この種の研究に乏しく, 特に不活化ウイルスそのものの性質に関する報告は殆んどなされていないので, 本論文は特に Ectromelia Virus を用いて, このウイルスが粒子として free の状態で在るとき, 及び細胞内に侵入して増殖過程に入っている時に, Photodynamic action を受ける態度, 更にこの不活化ウイルスが, 感染能, 免疫原性を保有しているか否かに関して試べてみたのである.

材料及び実験方法

ウイルス・宿主系として釜洞, 加藤により発見された Ectromelia Virus-Ehrlich 癌細胞系を用い, ウイルス不活化の判定には癌細胞内にウイルス感染によって特異的に出現する封入体を指標とした. 萩原, 古沢によれば感染20時間以内に出現してくる封入体は first cycle のもの, 即ち接種した親ウイルスにより生じたもので, 子ウイルスによる 2nd cycle の封入体は未だ混入していない. 又豊島によれば感染後20時間の封入体数は接種ウイルスの感染価に比例して増減する. そこで不活化の程度をいちいち感染価測定をしなくても, 癌細胞と混合してマウスに注入しておけば, 20時間後に出現してくる封入体数でかなり鋭敏な, %の level に於て計り得るのである.

1) Virus: 研究室保存の Ectromelia Virus ハムステッド株及微研株でマウス継代のもの. 使用に際しては斃死直前のマウス肝の20%乳剤, 3000 r. p. m. 10分後の遠心上清を原液とする.

2) Ehrlich 癌細胞: 研究室保存の Hyperdiploid 型, マウス腹腔内接種後7~10日頃のものを使用する.

3) Methyleneblue 水溶液: 1/15モルの磷酸 Buffer, pH 8.0 に溶かし, 0.001, 0.01, 0.1, 1%のものを作る.

4) 光源及照射方法: 照射材料 1~3ml を9cm直径の蓋付きシャーレに入れ, ガラス板上に置き, 手で軽

* 大阪大学微生物病研究所感染病理学部 (主任 釜洞醇太郎教授)