醗酵微生物のファージ現象に関する研究 (第3報)*

乳酸菌ファージの増殖に及ぼす pH の影響

金子太吉, 岩野貞雄, 北原覚雄 (東大応微研)

昭和 32 年 3 月 20 日 受 理

前報⁽¹⁾において著者等は、醗の乳酸菌ファージを問題とする場合には、温度及び pH の宿主とファージとに及ぼす影響がまず検討するべきことを指摘し、温度に関する実験結果を報告した。

培養液の pH 値が溶菌現象、plaque 形成等に与える影響については *Streptococcus*⁽²⁾, *Staphylococcus*⁽³⁾, *Clostridium*⁽⁴⁾ のファージを用いた研究がある。しかし pH がファージ増殖のいかなる段階に最も大きな影響を与えるかを検討したのは *Clostridium* を用いた Gold⁽⁴⁾ の報告以外見当たらない。

著者等は前報と同じ系について、宿主とファージとの増殖可能 pH 範囲を求めたところ、アルカリ性側で両者はほぼ一致するが、酸性側では一致せず、ファージ増殖が酸性の影響を受け易いことを知り、これは酸性において溶菌の段階が阻止されるためであることを明らかにし得たのでここに報告する。

実 験

1. 材料及び方法

使用菌株 (*Leuconostoc mesenteroides* S-8), ファージ株 (LP-17), 培地, 実験方法等はすべて前報⁽¹⁾と同様である。pH 値はガラス電極 pH メーターによって測定した。

2. 各 pH 値におけるファージ増殖

宿主の培養 (18 時間, 30°) を 10 倍量の培地に加えて 2 時間培養後、塩酸又は苛性ソーダで種々の pH 値に調整してから、ファージを加えて 30° で培養を続け、その間の濁度、ファージ力価の変動を調べて第 1 図の結果を得た。

これによると、宿主の増殖は pH 4.9 及び 8.3 でかなり阻害される (別の実験によれば、初発 pH 8.5 では 7 時間以上の lag を認めた)。これに対しファージ力価も、酸性の場合を除くとほぼ宿主と同様の経過で増加している。ファージ力価は試料を食塩水で稀釈して測定したが、その際 pH 4.9 及び 4.3 では予期しない現象に遭遇した。一例を挙げれば、試料の 20, 20², 20³ 倍稀釈液から形成された plaque 数は夫々 76, 32, 17 個であった。この結果は稀釈等の操作中にファージの放出が起り、しかも稀釈倍数が増す程ファージが放出され易くなる

第 1 図 各 pH 値における宿主 (左) とファージ (右) の増殖
(図中の数字は初発及び終末の pH 値を示す)

ことを示すと考えられる。この点の検討は次項で行うが、かようにして得られたファージの最小数をとってみると酸性ではファージ増殖を認め得ないことになる (第 1 図)。

3. 酸性における阻害

上の結果を検討するため single step growth technique による実験を行った。

* Bacteriophage Phenomena in Fermentative Microorganisms. Part III. Effect of pH on a *Leuconostoc* Phage.

By Takichi KANEKO, Sadao IWANO and Kakuo KITAHARA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

第 2 図 酸性による阻害

分目に中性培地に移した場合の曲線である。Dではファージは増殖しないがEでは対照(A)と殆んど同時にファージの放出が始められる。従って菌体内ファージの合成は、そのすべての段階が酸性培地中でも、中性培地中におけると同様に進み得ると考えられる(曲線AとEとを比較すると、酸性培地中の成績は明らかに悪いが、本質的には大差がないといえる)。かくして酸性培地においてはファージの single step growth の最終段階のみが阻止されていると判断され、前項でみた一見奇妙な現象も稀釈による pH 値の変動を考慮すればよく説明できる。

4. 溶菌に及ぼす pH 値の影響

上の実験でファージ増殖の最終段階が特に酸性に敏感であることを知ったので、次の実験によって溶菌と pH 値との関係を調べた。

常法により 30° の中性天然培地で吸着より 34 分目までを経過させ(この間血清を作用させて遊離ファージを除く)、34 分目に手早く 38° の酸性(pH 4.5, 酢酸緩衝液使用)培地に稀釈する。既報の通り 38° では菌体内ファージの合成は停止すると見做せる⁽¹⁾。また 38° でも中性培地では溶菌が起るが、酸性では溶菌しない。その意味で静的な状態にある感染菌を更に pH 値の異なる培地(pH 8.0 以上はペロナールを使用)100 倍量に稀釈、引き続きこの温度に約 30 分保ってからその一部について plaque count を行った。使用した培地の pH 値(実験

第 1 表 ファージ放出に及ぼす pH 値の影響(数字は ml 当りブラック数)

実験 初対	I	II
4.3	68	263
4.5	2,746	5,620
4.7	44	163
5.0	46	183
5.1	72	509
5.5	228	1,260
5.9	824	1,460
6.5	550	610
7.0	712	172
7.4	172	235
7.7	48	
8.1		
8.4		
8.5		
8.6		

直後に実測)及び plaque count の結果を第 1 表に示す。30° の中性天然培地に保った場合の 90 分における全 plaque 数を「対照」としてある。

表に見る如く、pH 5.9 ですでにある程度の放出阻害が認められ、pH 5.1 以下でファージの放出は全く認められず、この点既にみた結果とよく一致する。しかしアルカリ側(pH 8.4 以上)でも阻害されるのは第 1 図の実験と矛盾する。

溶菌とファージ放出とは平行しない場合があるといわれているが、著者等の系では両者はよく平行することを実験的に確めた。

5. アルカリ性における阻害

前項の結果を確かめるため、酸性側について行ったのと全く同様の single step growth 実験をアルカリ側について行った。第 3 図はその一例で図の A は終始中性、D は終始アルカリ性(pH 8.5, ペロナール緩衝液使用)、B は 20 分目以後、C は 20~50 分目の 30 分間、また E は 20 分目までをアルカリ性にした場合の single step growth 曲線である。

第 2 図がその結果である。図の A はファージを中性培地(pH 6.8, 天然培地のまま)で宿主に吸着せしめ、中性培地に稀釈した場合の single step growth 曲線である。

B は A の一部を 30 分目に 100 倍量の酸性培地(pH 4.8, 最終濃度 M/50 の酢酸緩衝液を含む天然培地)に移してそのまま酸性に保った場合、C は B の一部を 60 分目に再び 10 倍量の中性天然培地に移した場合の結果である。B においてはファージ増殖を殆んど認め得ないが、C では中性培地に移されるや直ちにファージ力価が上昇している。この事実は感染後 30 分目以後に関する限り酸性培地中でも菌体内ファージの合成は感染後 60 分以内に行われ得ることを示す。また曲線 D は酸性培地で吸着、以後も酸性に保った場合、E は D の一部を 40

第3図 アルカリ性による阻害

第2表 プレート効率に対するクエン酸及びカルシウムの影響

(A)

下層の $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5\frac{1}{2}H_2O$	上層の $CaCl_2 \cdot 2H_2O$		
	0%	0.5	5.0
0%	1,166	1,255	1,431
1	642	892	2,156

(B)

下層への添加物	上層への添加物	
	1% $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5\frac{1}{2}H_2O$	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
—	470	584
0.05 M $Na_3C_6H_5O_7$	151	794
0.03 M Na_2HPO_4	300	725
0.2 M $NaC_2H_3O_2$	478	589
0.1 M $NaCl$	518	494

緩衝作用が酸性においてのみ発揮されるためか殆んど無効であった(第2表B)。

考 察

他系との比較： 本報の宿主-ファージ系において、ファージの増殖は酸性で阻止されるが、アルカリ性ではむしろ宿主の増殖を認め難い pH 値でも僅か乍らファージ数が増加する。Cherry 等⁽⁶⁾の *Streptococcus cremoris* ファージも酸性側では増殖しないという。また Overcast 等の *Streptococcus lactis* 及び *S. cremoris* の5系についての研究⁽²⁾によると、ファージの増殖と宿主の増殖とは原則的に平行するが、その中2系では酸性側、2系ではアルカリ側のある pH 範囲でファージの増殖だけが阻止され、また3系ではアルカリ側のある範囲において宿主の増殖を殆んど認め得ないに拘らずファージは増殖し得るという。かように pH の影響は系によって異なるが、著者等の系もその一例であって少なくとも例外的なものとは思われない。

また本報の系では酸性において溶菌だけが阻止されたが、Gold 等⁽⁴⁾の *Clostridium madisonni* のファージにおいては侵入 (penetration) が酸性 (pH 5.1~5.2 以下) 及びアルカリ性 (pH 6.8~6.7 以上) で阻止され、

この結果によると、一般に pH 8.5 では潜伏期が長くなる(曲線 B, C, E)が終始この pH に保っても僅か乍らファージ力価の上昇が認められる(曲線 D)。またファージの放出も pH 8.5 で阻止されてはいない。全く同様の実験をアルカリ側の pH を 8.7 にして行った結果、B では 75~90 分、C では 64~74 分、E では 50~64 分の間にファージの放出を認めたが D では 90 分まで増殖を認めなかった。

これらの実験から、アルカリ性ではファージ増殖のある特定の段階が特に阻害されるとはいえず、むしろ宿主の生理的条件の悪化が間接的にファージの増殖に影響を及ぼしている様に思われる。前項において溶菌の段階がアルカリ性で阻止されるような結果を得たのはこうした二次的影響によるもので、酸性における現象とは本質的に異なるのが妥当であろう。

6. Plaque 形成に及ぼす緩衝剤の影響

Plaque が形成されるためには、上層寒天中の菌が相当長時間(少くとも6時間)はファージの感染を受け且つファージの合成、放出を行い得る状態になければならない。しかるに乳酸菌の場合にはその生酸性のために培地は酸性化し、本報のファージの如きはその影響を受けて増殖し難くなることが予想される。従って pH 値の低下をある程度抑制することによって、肉眼で認め得る plaque 数を増すことが可能かと思われる。

第2表Aの結果は下層寒天培地に緩衝剤としてクエン酸ソーダを使用し、上層寒天に $CaCl_2$ を添加することによって、明らかにプレート効率 (efficiency of plating) が上ることを示し、上の予想と一致する。このファージに対するカルシウムの効果は天然培地をそのまま使用する場合は顕著でないが、クエン酸ソーダを加えてから殺菌した培地を用いる場合極めて判然とする。

クエン酸ソーダの代りに Na_2HPO_4 を用うと、上層の寒天界面に白濁を生ずる。又酢酸ソーダはその

溶菌が酸性 (pH 5.1~5.2 以下) で阻害されるという。

この様にファージが増殖し得る pH 範囲のみならず酸またはアルカリによっていかなる段階が阻害されるかも系によって異なることは興味深いことであるが、その反面ファージの増殖と pH 値との関係を一般的に論ずることは差控えねばならなくなる。

溶菌機作について： 著者等は前報⁽¹⁾において、本報と同じ系に及ぼす温度の影響をしらべ潜伏期の前半において 30° から 38° に変えた場合には、ファージの合成は進行せずにそのままの状態に止まり、後半において温度を上げた場合にはファージの合成は停止するが溶菌は起ることを指摘した。また Gold⁽⁴⁾は溶菌が pH に依存するのは溶菌が酵素作用によることを示すものと論じた。更に本報の実験の終了後、各種のファージについて潜伏期間中に溶菌性酵素が合成されることが明らかにされ⁽⁶⁾、ファージによる溶菌が実はかかる酵素の作用によるとの見解が現われた⁽⁷⁾ことを知った。

これらの知見を総合するならば著者等の系について次のような仮説が成立する。即ち 38° ではファージの合成のみならず、溶菌性酵素の合成も直接または間接的に阻止され、酸性ではその酵素の作用が妨げられる。

プレート効率について： 乳酸菌ファージによる plaque 形成の条件は Cherry, Turner⁽⁸⁾ 等によって検討改良されたが、その結果を大腸菌等のファージの場合と比較すると、前者の場合にはできる限り plaque が大きくなるよう工夫されていることを知る。後者と同様の条件では前者の plaque は肉眼で認め得る大きさに達しないからである。その理由の一つとして乳酸菌が好氣的でないことを挙げ得るが、他の理由として培養中の pH 値の低下が考えられる。クエン酸ソーダを用うる方法は比較的簡単にプレート効率を上げる手段として他の乳酸菌はもちろん、一般に生酸性の菌に利用し得ると考える。

清酒のファージについて： 次に生酛の唯一の乳酸菌が *L. mesenteroides* S-8 であって、LP-17 の如きファージが混入した場合を仮定してみよう。既報の通りこのファージは低温でも増殖する⁽¹⁾から酛の pH 値が中性附近にある限りファージは増殖するが、pH 値の低下に伴ってその速度も低下し、やがてファージは全く増殖できなくなる。従って pH 値が低下する前にファージが増殖を遂げて宿主が全滅するか、宿主が自己の生産する乳酸によってファージの害をまぬがれる結果になるか、二つの事態が予想される。LP-17 とその宿主とが同一の生酛から分離された⁽⁹⁾事実は、第二の事態が実際に起っていたことを示すように思われるが、何れの事態が起るかはファージ混入量、ファージ混入時の菌数及び pH 等の諸条件によって決る。

清酒の醸造では 2 種以上の乳酸菌が混合培養される結果になっていると思われるので、そのうち 1 株がファージの害を受けても、他の株によって順調な酸酵が行われファージによる決定的な影響は予想し難いと思われる。もっともチーズに関する研究によれば、混合培養は純粋培養に比べれば明らかに有利であるが、必ずしも安全ではなく、その理由も完全には説明されていないようである。

要 約

Leuconostoc mesenteroides S-8 のファージ LP-17 の増殖に及ぼす培地の pH 値の影響をしらべた。宿主は pH 4.3 附近でも増殖を認めたが、ファージは pH 5.0 で増殖できない。この現象は酸性においてはファージによる溶菌が阻止されるためで、菌体内における合成には大きな影響が認められなかった。これに反してアルカリ性においては、宿主の生理的条件の悪化に基く間接的な影響しか認められなかった。またこのファージによる plaque の形成率は、下層寒天培地にクエン酸を、上層寒天に塩化カルシウムを加えることによって上昇する。

最後に本研究に協力された鈴木宏侑君に謝意を表する。また研究費の一部は文部省科学試験研究費に仰いだ。なお本報は昭和 30 年 10 月農化東京支部例会に於いて講演した。

(1) 金子太吉, 他 : 本誌, 29, 788 (1955).

(2) W. W. Overcast et al. : *J. Bacteriol.*, 61, 87 (1951).

(3) A. P. Krueger, J. Fong : *J. Gen. Physiol.*, 21, 137 (1937).

(4) W. Gold, D. W. Watson : *J. Bacteriol.*, 57, 17 (1950).

(5) W. B. Cherry, D. W. Watson : *J. Bac-*

teriol., 58, 601 (1949).

(6) J. Huppert, J. Panijel : *Ann. inst. Pasteur*, 90, 711 (1956).

(7) A. Brown : *J. Bacteriol.*, 71, 482 (1956).

(8) G. E. Turner : *J. Dairy Sci.*, 34, 755 (1951).

(9) 金子太吉 : 本誌, 29, 784 (1955).