

抗酸性菌ファージに関する研究

檜 川 義 親

財団法人結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受 付 昭和 33 年 12 月 28 日

I 結 言

1910 年代に d'Herelle によつて赤痢菌を溶菌するバクテリオファージの分離が報告されて以来、各種細菌について、それぞれ対応するファージが発見され、その研究も非常に多方面にわたつてみられるようになった。その後一時下火となつたファージの研究も、電子顕微鏡の発達に伴い、ファージが細菌を宿主とする一種のウィルスであることが立証されるに及んで再びその研究も活発となり、さらに近年にいたつてとくに大腸菌 T 系ファージを中心として、きわめて詳細な研究の発表をみるまでに発展した。

しかし抗酸性菌ファージは、分離が困難とされており、Gardner and Weiser (1947), Hauduroy and Rosssett (1948), Penso and Ortali (1949), Whittaker (1950), McLaren (1953), Hnatoko (1956)¹⁾ らによる非病原性抗酸性菌ファージの分離および、これらのファージを用いての非病原性抗酸性菌のファージ型別による細分類の試みが報告されているにすぎない。

病原性結核菌を溶菌するファージの分離は、1954 年 Froman ら²⁾ により土壌から分離された多数の非病原性抗酸性菌ファージの中で、4 株が病原性結核菌をも溶菌することを報告して以来、一躍活況を呈してきたようである。すなわち、この発表に引続いて、わが国では武谷ら³⁾ が、やはり畠土よりトリ型菌をも含む広範な溶菌域を有する抗酸性菌ファージの分離を報告している。

著者は、抗酸性菌ファージの分布をも知る目的で、畠土および鳥獣糞便を用いての分離を試み、かなり高率にファージの分離に成功した。この中には、明らかに病原性を有するトリ型菌をも溶菌するものが含まれているが、このようなファージの分離の報告はまだみられない。またこれらのファージを用いて抗酸性菌の細分類および抗酸性菌ファージによる治療を目標とする実験を行い、さらにファージ活性に対する血清の影響を検討したので、その成績を報告する。

II 分 離 方 法

まず土壌約 50 g をとり、約 100 ml 容量の滅菌コルベンに入れ、これに滅菌蒸溜水約 50 ml を加えて充分混和させる。糞便を用いる場合は、拇指頭大のもの 2~

3 コまたはこれに準じた量を用いる。ついで、あらかじめグリセリンブイヨン 7 日間培養したファージ増強用の非病原性抗酸性菌チモテー株 (有色株) および No. 19 株 (白色株) を、数回洗滌し、菌体を滅菌乳鉢で粗く磨砕、滅菌蒸溜水を加えて坩状の濃厚菌液としたものを試料に 2~4 ml ずつ加えて 37°C に保つ。増強用菌液は 3 日目ごとに 4 回注加し、最終注加の日より 3 日後にこの上澄をとつて遠沈後、ジャンペラン型濾過管 L₃ を用いて濾過する。

増強用に用いた非病原性抗酸性菌をそれぞれ別個にグリセリン寒天平板に平等に接種しておき、この上に、濾液 1 滴ずつを滴下して 37°C に培養し、溶菌斑の出現の有無をみる。溶菌が認められた場合の溶菌斑の大きさは、濾液中のファージの多少により、大きく明瞭な場合と、小さく不明確な場合とがある。とくに小さい場合等は、この溶菌斑を掻き取り、対応菌と混和してさらに平板に接種を繰返しファージの増強を行う。直接の濾液中に含まれるファージは $10^2 \sim 10^5$ plaques/ml 程度である。

このファージ液を階段希釈して対応菌菌液の適量とともに半流動寒天 (0.75%) に混ぜ、寒天重層法により孤立した溶菌斑を作らせる。単一溶菌斑より再びファージ液を作り、さらに寒天重層法で孤立溶菌斑を作らせる。この操作を数回行つてファージの純化を行い、最後にグリセリンブイヨンによつて対応菌とともに通気培養を行い、これを濾過すれば、 $10^7 \sim 10^9$ plaques/ml の濃厚なファージ液を得ることができる。これを原液として以下の実験に使用した。

III 実 験 成 績

1) 分離試料と分離成績

上述の方法により、表 1 に示すように、14 種の畠土より 9 株の抗酸性菌ファージを分離した。

畠土は、著者が直接採取したものもあるが、一部は地方よりビニール袋に入れて郵送されたものである。畠土のほか、鶏糞 3 種より 2 株、家兎糞 1 種より 1 株、綿羊糞 1 種より 1 株および鶏舎土 3 種より 2 株の計 15 株のファージの分離に成功したが、鳩糞 2 種およびモルモット糞 1 種よりは分離しえなかつた。

これらの抗酸性菌ファージは、増強に用いた No.19 株

表 1 分離に使用した試料と pH および分離ファージとの関係

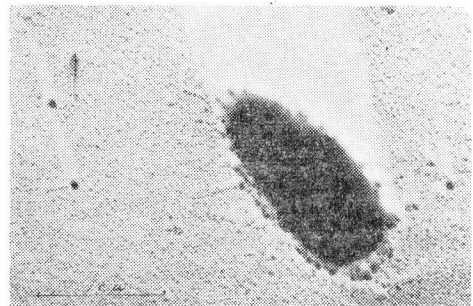
a) 土 壤

土 壤 の 種 類	pH	ファージ
野 菜 畠 1 (赤 土)	6.9	M 1
〃 2 (黒 土)	7.1	M 2
〃 3 (〃)	6.3	—
〃 4 (〃)	6.1	M 4
〃 5 (〃)	6.2	M 5
〃 6 (赤黒土)	4.9	—
〃 7 (黒 土)	6.6	—
〃 8 (〃)	7.8	—
〃 9 (〃)	7.7	M 9
〃 10 (赤 土)	7.4	M10
〃 11 (赤黒土)		谷川
〃 12 (黒 土)		K 1
〃 13 (〃)		K 2
〃 14 (〃)		—

b) 鳥獣糞便

糞 便 の 種 類	pH	ファージ
鳩 糞 1	6.1	—
〃 糞 2	5.8	—
鶏 糞 1	6.9	K 5
〃 糞 2	7.4	—
〃 糞 3	6.7	K 8
家 兎 糞 1	7.1	K11
緬 羊 糞 1	7.2	K12
モルモット糞 1	7.2	—
鶏 舎 土 1	6.7	K 7
〃 土 2	6.1	—
〃 土 3	6.5	K14

写 真 2



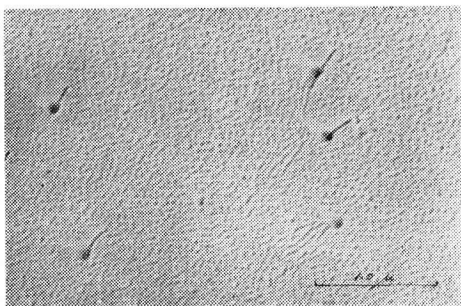
のみを溶菌し、チモテー株を溶菌するファージは得られなかつた。

土壌の pH とファージ分離の成否との関係は、表 1 に示すようにとくにありとはいえないが、強酸性ないし強アルカリ性のものからの分離はあまり期待できないようである。pH の測定は、各試料の蒸溜水浸出液について電気 pH メーターを使用した。

2) 分離ファージの形態および溶菌斑の性状

No. 19 株を用いてのグリセリン寒天平板上の溶菌斑より作製した普通乾燥標本での金影づけによる電子顕微鏡所見では、ファージは大体オタマジャクシ状で頭部は球形を呈し、これに続く尾部が認められる。谷川株での大きさは、頭部の径が約 80 μm 、尾部の長さが約 180 μm であつた。尾部は場合によりジュズ玉状を呈することがあるが、撮影条件によるものと考えられる。

写 真 1



No. 19 株を用いての寒天重層法での溶菌斑の大きさは、48 時間培養で全株ともおおそ径約 2.0~6.0mm、透明で辺縁は比較的直である。溶菌斑の大きさは接種菌の多少によつても変化する。

谷川株について、48 時間培養後の溶菌斑をみると、径 2.0 mm 前後のものと同径 6.0 mm 前後のものおよびその中間のものが認められる。この中より最大のものおよび最小のものをとり、おのおのファージ液を作製して、寒天重層法により単一溶菌斑を作らせることを 14 回繰返して純化を試みたが、大きい溶菌斑からのファージ液から常に小さい溶菌斑が出現し、また小さい溶菌斑からのものにも常に大きい溶菌斑を伴い、この両者を純粋な 2 つの株に分けることはできなかつた。

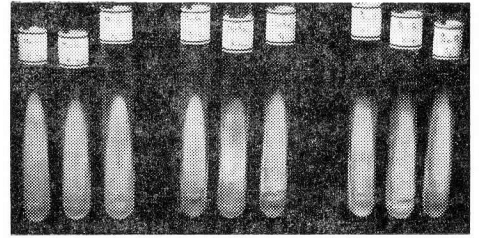
3) 各種抗酸性菌の分離ファージに対する感受性

a) 実験方法

抗酸性菌のファージ感受性をしらべる場合、液体培地を用いて、大腸菌等の場合のごとく濁濁度でみる方法も一応考えられないではないが、後述するごとくキルヒナー培地は不適当であり、このほかにすべての抗酸性菌が均等な発育ができてかつファージ作用の阻害されないような適当な液体培地がない。グリセリン寒天もすべての抗酸性菌の発育は望めない。したがつて、はじめは 1% 小川培地を用い、これを平板として、この上に菌を平等に接種し、フラン器内で充分乾燥させたのち、ファージ液を 1 滴滴下して溶菌の有無の判定を行つたが、雑菌の混入率も高く、操作も煩雑で、判定もみにくい等の欠点が多い。

種々試みた結果、普通に用いられている1%小川培地を利用する簡易な方法を考案した。すなわち、被検菌の1~0.1 mg/ml 菌液 0.1 ml を斜面に平等に接種し、斜面台のまま1~2日37°Cで乾燥させる。ついで斜面の対側ガラス壁に沿ってファージ液を0.5 ml 入れ、そのまま直立させて封ろう後37°Cに培養する。菌の発育に応じて1週ないし数日ごとに観察すると、溶菌の強さに応じて液面より上方に明瞭な菌の発育阻止が認められる。判定は発育阻止帯の高さによって定め溶菌の程度をⅠ~Ⅳの4段階に分かった。対照としてグリセリンパイオンを加えたものは、液面まで旺盛に菌の発育が認められ、時として液面に菌膜を形成する。培養が長期にわたると、時には一度菌発育の阻止された部分にファージ耐性菌が二次的に集落を形成することがある。

写真 3



菌 株 H₃₇Rv H₃₇Ra 青山B
 ファージ 谷川 K₁₄対照 谷川 K₁₄ 対照 谷川 K₁₄ 対照
 判 定 Ⅲ - - Ⅲ Ⅲ - Ⅲ - -

以下に述べる感受性実験はすべて本法に従った。

b) ヒト型結核菌保存株のファージ感受性

表 2 分離ファージに対する菌の感受性

a) ヒト型結核菌保存株のファージ感受性

ファージ 菌株	谷川	K ₁	K ₂	K ₁₂	K ₁₁	K ₁₄	K ₅	K ₇	M ₁₀	M ₂	K ₈	M ₉	M ₅	M ₁	M ₄
H ₃₇ Rv	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
青山B	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陸 F	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KH ₁	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	+	±	-	-	-	-	-	-
S F	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	+	±	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	-	-	-	-
H ₃₇ Ra	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	+	+	Ⅲ	+	-	-

b) ウシ型結核菌保存株のファージ感受性

ファージ 菌株	谷川	K ₁	K ₂	K ₁₂	K ₁₁	K ₁₄	K ₅	K ₇	K ₈	M ₁	M ₂	M ₄	M ₅	M ₉	M ₁₀
263 t	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Ravenel	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
芝 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三 輪	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B C G	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

c) トリ型結核菌保存株のファージ感受性

コロニー 型	菌株	ファージ	M ₉	M ₄	K ₁	K ₇	K ₁₁	K ₁₄	M ₁₀	谷川	K ₅	K ₈	M ₅	M ₁	M ₂	K ₂	K ₁₂	病原性
R 型	Avt		Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	+	±	±	-	-	なし
S 型	Av		-	Ⅲ	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	なし
	Maren Cecilie		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	あり
	E 38686		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	あり
	Kirchberg Flamingo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	あり

当室保存の代表的菌株6株を用いた。表2 a) に示すように、供試ヒト型菌株はいずれもM₁およびM₄の2株に感受性を示さない。他の13株のファージは供試菌株の全部あるいは1~4株を溶菌した。とく

に弱毒株SFおよびH₃₇Raは、これらのファージの大部分に広い感受性を示した。この成績はSF, H₃₇Raが他の各菌株とやや異なつた群に属するものかもしれないことを思わせる。

c) ウシ型結核菌保存株のファージ感受性

表 2 b) に示すように、263 t は谷川, K₁, K₂, K₁₂, K₁₁, K₁₄ の各ファージにより溶菌されたが、他の 4 菌株は、いずれのファージにも全く感受性を示さない。したがって同じウシ型菌といつても 263 t は、他の 4 菌株とはかなり性状の異なつたものではないかと考えられる。

d) トリ型結核菌保存株のファージ感受性

表 2 c) に示すように、1% 小川培地における発育が R 型を示す Avt を溶菌するファージは、15 株のうち 11 株を占めるが、トリ型菌本来の型とされる S 型を示す菌株を溶菌するファージはわずかに 2 株である。

すなわち、M₁ は Av を溶菌し、M₉ は Maren Cecilie および E 38686 を溶菌する。しかし、表 3 に示すように、同じ S 型の性状を呈しても、Av は鶏に全く病原性を欠き、他の 4 株は強い病原性を有する。しかも Kirchberg と Flamingo は敗血症型で Maren Cecilie および E 38686 は結節型といつた異なつた病変を鶏に起させており、前 2 者は後 2 者とやや異なつた性状を有する菌株と考えられる。ファージ感受性がこの 2 つの群を明らかに区別していることはなほ興味深い。

e) ヒト型結核菌の薬剤耐性とファージ感受性との関係

表 2 d) に示すように、KH-1 を in vitro で薬剤

表 3 供試トリ型結核菌の毒力

菌 株	鶏番号	感染方法	生存期間	剖 検 所 見			培 養 成 績		
				肝	脾	肺	肝	脾	肺
Avt	1	1mg/ml	70日目屠殺	-	-	-	-	-	-
	2		"	-	-	-	-	-	-
Av	3	の	70日目屠殺	-	-	-	-	-	-
	4		"	-	-	-	-	-	-
Maren Cecilie	5.	液	70日目屠殺	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕
	6		"	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕
E 38686	7	ず	70日目屠殺	+	+	-	⊕	+	2
	8		"	+	+	-	⊕	-	1
Kirchberg	9	つ	24日目死亡	-	-	+	⊕	⊕	⊕
	10		"	-	-	-	⊕	⊕	⊕
Flamingo	11	注	38日目死亡	+	-	+	⊕	⊕	⊕
	12		41日目死亡	±	-	-	⊕	⊕	⊕

表 2 分離ファージに対する菌の感受性

d) ヒト型結核菌の薬剤耐性とファージ感受性との関係

菌 株	ファージ														
	K ₂	K ₁₁	K ₁₂	K ₁₄	谷川	K ₁	K ₅	K ₇	M ₉	M ₁₀	M ₂	M ₁	M ₄	K ₈	M ₅
KH-1	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	-	±	-	-	-	-	-
KH-1 SM 100,000γ<	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	±	±	-
KH-1 INH 100γ	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	-	-	
KH-1 SM 100,000γ< +	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	
KH-1 INH 50γ	⊕	⊕	⊕	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	⊕	⊕	⊕	

耐性を獲得させた 3 株の感受性は、原株よりかえって広がっているが、耐性の程度および薬剤の種類とは無関係のようである。

f) ヒト型結核菌分離株のファージ感受性

患者の喀痰より分離した結核菌11株について、保存菌株における溶菌の様相に特徴のある谷川, K₁₄, M₉ および M₁₀ の 4 株を用いてその感受性をしらべた。表

2 e) に示すように、分離株のうち7株はなんらかの薬剤にある程度の耐性を有していたが、耐性度とファージ感受性との間に特定の関係を見出すことができなかつた。しかし、この 11 株は大別して谷川, K₁₄ および M₁₀ の 3 株に感受性を示す 3 株と、谷川および K₁₄ に対応する 7 株、さらに谷川のみに感受性を示す 1 株の 3 群に大別することができた。

表2 分離ファージに対する菌の感受性

e) ヒト型結核菌分離株のファージ感受性

菌株	ファージ		谷川	K ₁₄	M ₁₀	M ₉
	薬剤耐性					
1	SM	10 γ	+	+	+	-
	INH	10 γ				
	PAS	1 γ				
2	SM	100 γ	+	+	+	-
	INH	10 γ				
3	—	—	+	+	+	-
4	SM	10 γ	+	+	-	-
	INH	10 γ				
5	SM	100 γ	+	+	-	-
	PAS	10 γ				
6	SM	10 γ	+	+	-	-
	INH	1 γ				
7	SM	10 γ	+	+	-	-
8	INH	10 γ	+	+	-	-
9	—	—	+	+	-	-
10	—	—	+	+	-	-
11	—	—	+	+	-	-

4) マウスにおけるファージ接種実験

抗酸性菌ファージの活性が *in vivo* でどのような態度をとるかについて知るために実験を行った。マウスの3群に、KH-1 菌株を用いその 5 mg/ml 菌液を 0.1 ml ずつ静注した。さらに第1群は菌接種と同時に谷川株の 5×10⁶ plaques/ml 力価のファージ液 0.1 ml を静注、第2群は菌接種7日後に同様ファージ液を静注した。第3群は対照として菌接種のみとした。60日間観察後屠殺剖検およびその肺を培養したが、剖検の結果は各群とも肺に同程度の病変が認められたにすぎず、培養成績も表4に示すごとく特定の差は各群ともみられず、所期の目的は達しえなかった。

5) 溶菌作用におよぼす血清の影響

in vivo でファージ活性が現われない理由を探求するために、その推測される種々の因子を検討しようとして、はじめに 37°C におけるファージの生存が培地によりどのような影響をうけるかをしらべた。

すなわち、1% 小川培地およびキルヒナー培地を用い、No. 19 株の 1 mg/ml 菌液 0.1 ml とファージ液

表4 マウスにおけるファージ接種実験

動物番号		稀釈度	1	2	3	4	5	6	7	8
実験群	第1群 菌、ファージ同時接種	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+
		10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	24
動物番号		稀釈度	1	2	3	4	5	6		
実験群	第2群 菌接種1週後ファージ接種	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+		
		10 ⁻²	+	+	+	+	+	53		
動物番号		稀釈度	1	2	3	4	5	6	7	
実験群	第3群 菌のみ接種	10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	56	
		10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	7	

注: 1) 菌株……KH-1株

2) ファージ株……谷川株

表5 培地別活性ファージの消長 (定性的検査)

菌の有無	キルヒナー培地				1% 小川培地			
	ファージのみ		No.19 とファージ		ファージのみ		No.19 とファージ	
	谷川	K ₂	谷川	K ₂	谷川	K ₂	谷川	K ₂
直前	+	+	+	+	+	+	+	+
3日	-	-	-	-	+	+	+	+
7日	-	-	-	-	-	-	-	-
10日	-	-	-	-	-	-	-	-

0.1 ml を一緒に培養した場合およびファージ液のみの場合について、一定時間後におのおの1白金耳をとり、別に準備した No. 19 を平等に接種したグリセリン寒天平板上に滴下して、活性ファージの有無をしらべた。表5に示すように、谷川および K₂ の2株を用いた実験で、キルヒナー培地では3日目にすでに全く活性ファージは検出されず、1% 小川培地に菌とともにファージを接種した場合のみ10日後まで活性ファージの検出が容易であつた。

このことは、キルヒナー培地中の何かファージ作用を阻害していることを示すと考えられるので、その中の血清をとりあげて次のような実験を試みた。

4% グリセリン寒天, 10% 牛血清加グリセリン寒天およびキルヒナー寒天を用い, No. 19 を平等におのおのの平板に接種後, 谷川, K₁ および K₂ のファージ液をおのおのの1白金耳ずつ滴下して48時間37°Cで培養後その溶菌状態を観察した。

表6 培地別溶菌状態

(ファージ液1白金耳, 48時間判定)

培地 ファージ	4%グリセリン寒天	10%牛血清加グリセリン寒天	キルヒナー寒天(牛血清)
谷川	17×16mm(透明)	11×10mm(翻状)	3×3mm(半透明)
K ₁	12×12mm(透明)	8×8mm(翻状)	4×3mm(半透明)
K ₂	12×1mm(透明)	5×3mm(半透明)	0×0mm

注: 菌株……No. 19株

表6に示すように, 血清を加えた培地での溶菌斑の形成はきわめて悪い。とくにキルヒナー寒天では溶菌のみられない場合もある。したがって, キルヒナー培地に含まれる薬品がファージ作用に強い悪影響を及ぼすことが想像されると同時に, 血清もかなりの悪影響があることが充分察せられた。

そこでさらに, 血清の影響を詳しく検討する目的で, 各種の血清を用いて以下の実験を行った。

馬, 家兎 および人の血清をおのおのの蒸留水で10%溶液としたもの18mlずつを大試験管にとり, これに谷川株の3×10⁶ plaques/ml 力価のファージ液をおのおのの2.0mlずつ加えた。これを37°Cに保ち一定日後とり出してNo. 19株を用いて寒天重層法により活性ファージを定量した。表7および図1に示すように, 馬

表7 各種血清のファージ不活性化におよぼす影響

血清 時間	馬	家兎	人	蒸留水
直前				3.0×10 ⁵
3日	2.7×10 ⁵	2.1×10 ⁵	6.9×10 ³	2.4×10 ⁵
7日	2.6×10 ⁵	1.5×10 ⁵	4.2×10 ³	1.4×10 ⁵
14日	1.4×10 ⁵	1.2×10 ⁵	2.1×10 ³	6.4×10 ⁴
21日	1.4×10 ⁵	4.8×10 ⁴	1.3×10 ³	4.7×10 ⁴
28日	1.3×10 ⁵	3.7×10 ⁴	6.2×10 ²	4.8×10 ²

注: 1) 血清は10%溶液とした
2) ファージは3.0×10⁵ Plaques/ml に加えた

および家兎血清は, むしろ活性ファージの減少を防いでいるように思われた。したがって, 表6に示された現象は, 対応菌とともに固型培地にある場合のみにみられるものとも考えられるので, 各種血清をグリセリン寒天に0.1%より10%まで段階的に含ませ, No. 19株を用いて寒天重層法により一定量の菌と一定量の谷川株のファージ液との混合液を培養することによる溶菌斑形成状況を定量的に観察した。

図1 各種血清のファージ不活性化におよぼす影響

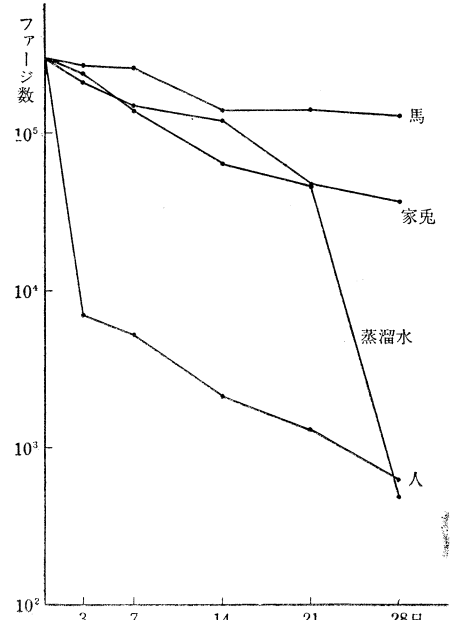


表8 各種血清加グリセリン寒天平板上の溶菌状態 (48時間判定, 1平板当り溶菌斑数)

血清含有度 種類	対照 (0%)	0.1 %	0.2 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %	5.0 %	10.0 %
馬	冊	冊	冊	371	141	47	13	0
家兎	217	125	121	123	122	126	64	41
人	156	73	71	75	72	38	27	3
牛	169	95	54	44	33	32	22	10
栄研アルブミン	178	158	155	51	28	18	4	0

注: 1) 使用ファージ……谷川株
2) 使用菌株……No. 19株

図2 各種血清加グリセリン寒天平板上の溶菌状態

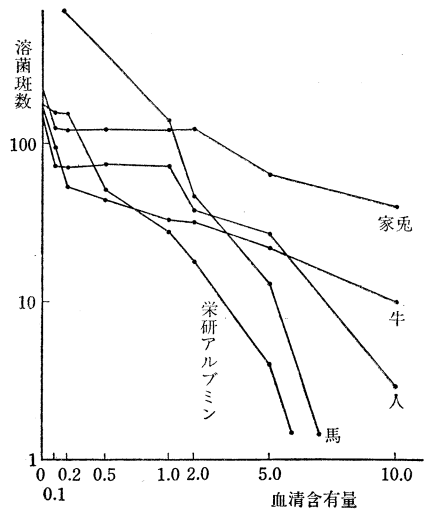


表8および図2に示すように、各血清ともその含有量の増加に従って溶菌斑形成数は減少し、とくに馬血清においてその傾向の強いことが明らかにされた。

さらに液体培地の場合については、グリセリンブイヨンで通気培養を行いファージの増強を計るさいに、血清添加によりファージの増強がどのように影響をうけるかを検討した。

グリセリンブイヨンに馬血清を10%に加え、これに谷川およびNo. 19を入れて37°Cで通気培養を行い、一定時間ごとにとり出してファージの増殖状況を寒天重層法により定量した。このさい菌の増殖状況もファージを加えない同様の培地で平行して同時に測定した。

表9 ファージ増殖におよぼす馬血清の影響 (Plaques/ml)

時間	血清 (-)		血清 (+)	
	ファージ数	菌数	ファージ数	菌数
直前	8.7×10^8	8.7×10^4		
3時間	7.5×10^8	5.8×10^4	1.0×10^4	1.5×10^5
6時間	7.6×10^8	3.1×10^4	6.4×10^8	6.7×10^4
12時間	7.4×10^8	4.4×10^4	6.8×10^8	3.9×10^5
24時間	2.1×10^8	1.5×10^5	1.2×10^4	1.4×10^6
48時間	1.1×10^8	2.8×10^6	9.1×10^4	3.3×10^7

注：1) グリセリンブイヨン通気培養による
 2) 馬血清は10%に含有
 3) ファージは谷川株、菌株はNo. 19株

図3 ファージ増殖におよぼす馬血清の影響

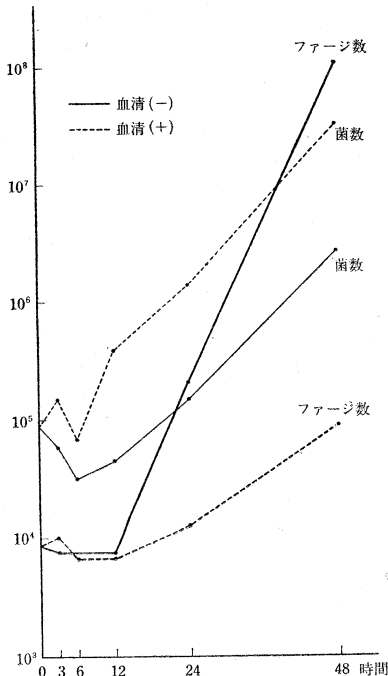


表9および図3に示すように、ファージは血清の有無にかかわらず培養12時間まではほとんど増減なく、これをすぎると急激に増加してくる。そして48時間後のファージ数は、血清を加えた場合は加えない場合の約1/1,000に止まっている。菌の増殖はこれと反比例して、血清を加えた場合の方がしからざる場合の約10倍にも達していることは興味深い。

IV 総括ならびに考案

近時、注目を浴びつつある抗酸性菌ファージの分離と性状の検討を試み、興味ある知見を得た。

分離はほぼFromanら²⁾の方法に準じてこれをやや改良して行つた。本研究では分離源として畠土のみならず鳥糞糞便をも用い、かなり高率に抗酸性菌ファージの分離に成功したが、現在までのところ病原性抗酸性菌ファージの分離は土壌に由来するもののみであり²⁾³⁾、その他の材料からの分離は報告をみない。このことから、抗酸性菌ファージの分布は意外に広く、雑菌の多く存在するような試料にはどこにも抗酸性菌ファージも存在するものと想像される。試料のpHは極端に偏らないかぎりファージの存否にあまり関係ないようである。現在までに得られた15株のファージの性状は以下の通りである。

電子顕微鏡上の形態は現在までの報告³⁾⁴⁾のものとは大差はない。また同一ファージ株の形成する大小の異なつた2種の孤立溶菌斑の純化を14代試みたが成功しなかつた。これはBowman⁵⁾の報告にみられるが、おのおのが安定した別個のファージ株とみなすことはできなかつた。

これらのファージはほとんど全部が病原性を有するヒト型菌を溶菌した。しかし家兎に明らかに病原性を有するウシ型菌を溶菌するファージはこれらの中に見出されなかつた。263tはウシ型菌とされているが、家兎にほとんど病原性を示さないもので、真にウシ型菌としての特性を現在も保有しているものといえるかどうかは疑問である。

さらに分離ファージの中に、明らかに鶏に強い病原性を有するMaren CecilieおよびE 38686の2株を溶菌するM₉が含まれている。現在までのところ、病原性が明らかにあるトリ型菌を溶菌するファージの分離は報告されておらず、トリ型菌として保存されている病原性がない菌株を溶菌するファージの存在が報告⁶⁾⁷⁾されているにすぎない。武谷ら³⁾はトリ型菌ファージの分離を報告しているが、室橋ら⁸⁾はPensoより分与をうけた4株のファージを用いての実験で、これらのファージが病原性のないトリ型菌のみを溶菌するにかかわらず病原性菌は全く溶菌しないことから、武谷らの用いた菌株をトリ型菌とすることに疑問をもっている。しか

し本実験において強毒トリ型菌を明瞭に溶菌する M₉ が得られたことにより、多数のフェージ株の中にはトリ型菌を溶菌するものもあることが立証された。しかもこのフェージは従来少ないとされた^{8) 9)} S型菌を溶菌したものでありはなはだ興味深い。

分離フェージを用いてヒト、ウシ、トリ型菌の代表的保存株 17 株について、フェージ感受性を検討したが、全体の傾向としてヒト型菌では毒力の弱い菌株ほど多数のフェージに感受性を示した。このような菌株は増強に用いた No. 19 株と共通なものをより多く有するのではないかと思われる。

さらに薬剤感受性菌と *in vitro* で得られた耐性菌との間では、フェージ感受性が若干異なり、耐性菌がより多く感受性を示した。吉村⁷⁾ は薬剤感受性菌と耐性菌の間に全く差がないとしているが、非病原性抗酸性菌の INH 耐性菌のみの実験であり、著者はヒト型結核菌の SM, INH および SM+INH 耐性菌を用いているのでこのような相違ができたものであろう。

谷川, K₁₄, M₉, M₁₀ を用い患者よりの分離株について細分類を試み、大別して3群に分類することができた。この点について吉村⁷⁾ は同一菌型中では溶菌の様相がほぼ共通であつたと述べているが、本実験の結果は必ずしもそうではないようである。しかしまだ例数も少ないのでさらに例数を増して検討を試みつつある。このような目的のために特異性の強いフェージが得られれば、幾つかの組合せによりさらに詳細な分類も十分可能と考えられる。特異性の強いフェージの分離を目的として患者の保有する結核菌をフェージの増強に用い、その患者の糞便からの分離を試みつつあるが現在までのところ成功していない。

溶菌の有無の判定に吉村⁷⁾ はグリセリン寒天や 1% 小川培地の平板を利用し、Adams の変法を用いており、室橋⁸⁾ はグリセリン寒天平板にそのまま菌接種後乾燥させ、その上にフェージ液を滴下して試んでいる。平板を利用する判定法は操作も煩雑で、雑菌の混入率も高い。著者は普通に用いられる 1% 小川培地を利用する方法を考案した。これによれば操作はきわめて簡単で雑菌の混入は少なく、また判定も容易であり、将来臨床検査室等で分離菌の細分類を試みるさいにも手軽に利用できる。

White ら¹⁰⁾ は Tween 80 がフェージ活性を阻害し、血清がこの阻害を防止することを証明しているが、さらに血清そのものもフェージ活性を阻害することを証明した。このことは、動物を用いての治療を目標とした実験が目的を達しえなかつたことの一因とも考えられる。しかし、フェージは一般にかなり変異をきたしやす

いものとされているので、この点を利用して将来血清耐性フェージを用いれば、あるいはフェージによる治療も望めないことはないであろう。

V 結 論

著者は、従来の土壌のみならず鳥獣糞便からもかなり高率に抗酸性菌フェージの分離に成功した。したがって、抗酸性菌フェージもかなり広く存在するを知つた。

分離しえた 15 株のフェージを用いて、各保存菌株および分離菌株のフェージ感受性を検討した。その結果ヒト型保存株では多数のフェージに溶菌される弱毒菌と、一部のみに対応する一群に大別され、分離株では態度の異なつた 3 群がみられた。有毒ウシ型菌を溶菌するものはなかつた。トリ型ではとくに鶏に強毒である 2 菌株を溶菌するフェージ M₉ が含まれていた。このものは、H₃₇Ra をも溶菌した。これらの溶菌域検査の結果はフェージによる Typing が充分期待しうるものであることを示唆している。

各種の血清は、抗酸性菌フェージの増殖および溶菌に悪影響があり、これが生体内でのフェージ活性が阻害される 1 つの原因と考えられる。

なおフェージ感受性試験を簡便に行う方法を工夫した。

擱筆するにあたり、終始御鞭撻ならびに御校閲を戴いた隈部所長、岩崎部長、大林副部長に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導を戴いた工藤祐是博士に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Hnatoko, S.I. : *Canad. J. Microb.*, 2 : 39, 1956.
- 2) Froman, S., Will, D.W., & Bogen, E. : *Am. J. Pub. Health*, 44 : 1326, 1954.
- 3) Takeya, K., & Yoshimura, T. : *J. Bact.*, 74 : 540, 1957.
- 4) Sellers, M.I., Tokuyasu, K., Price, Z., & Froman, S. : *Am. Rev. Tuberc.*, 76 : 964, 1957.
- 5) Bowman, B.U. : *J. Bact.*, 76 : 52, 1958.
- 6) Will, D.W., Froman, S., Krasnow, I., & Bogen, E. : *Am. Rev. Tuberc.*, 76 : 435, 1957.
- 7) 吉村 : *医学研究*, 28 : 1080, 昭33.
- 8) 室橋・関 : *投稿中*, 昭34.
- 9) 武谷 他 : *日新医学*, 45 : 251, 昭33.
- 10) White, A., & Knight, V. : *Am. Rev. Tuberc.*, 77 : 134, 1958.