

抗酸菌ファージの分類

徳永 徹・丸山 米夫・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 37 年 8 月 29 日

抗酸菌ファージの分離ならびにその溶菌域に関しては最近数年間に相当多くの報告がなされ、かつその成績によつて抗酸菌を分類同定しようという試みが進められている。しかして種々のファージを用いて抗酸菌を同定するためには、まず使用するファージの異同を確かめて、タイピングに適する特定のファージを選び出すことが方法論として重要である。しかるに従来分離されたファージはそのほとんどが土壌から得られたものであり、しかも各研究者がそれぞれ独自の立場で研究を進めているために、その使用ファージ相互間の異同に関しては、ほとんど検討が加えられていない。

著者らは自ら分離したファージを含め、世界各地から

提供された抗酸菌ファージ計 32 株について、その血清学的性状の速報を行なつたが¹⁾²⁾、本報告ではさらに抗血清の数をふやすとともに、人型結核菌に対する溶菌性状を加えて総合的な分類を行ない、この中より現段階においてタイピングに適當と認められるファージを選定したので報告する。

材料と方法

ファージ： 32 株の使用ファージの名称、宿主菌および分離者の氏名を表 1 に記載した。これらファージはすべて 4 % グリセリン加ブイオン中で型のごとく約 $10^9/ml$ に増強された。

Table 1. Phage Used

Phage	Host strain	Authors	Phage	Host strain	Authors
Y 1	Myc. sp. jucho	Murohashi, et al.	C 3	Myc. sp. 120	Takeya, et al.
Y 2	Myc. sp. 607	"	L 1	Myc. sp. jucho	Doke
Y 3	Myc. sp. jucho	"	PP	Myc. phlei	Penso, et al.
Y 4	"	"	PS	M. smegmatis	"
Y 5	"	"	PR	M. sp. rabinowitschi	"
Y 6	"	"	PL	M. sp. lacticola	"
Y 7	"	"	HC	M. sp. jucho*	Hauduroy
Y 8	"	"	HP	"*	"
Y 9	"	"	D 4	Myc. sp. F-21	Froman, et al.
Y 10	"	"	D 11	Myc. sp. F-89	"
Y 11	"	"	D 12	Myc. sp. F-87	"
Y 13	"	"	D 28	Myc. sp. F-13	"
Y 16	M. smegmatis	"	D 29	Myc. sp. 607	"
A 3	Myc. sp. 607	Takeya, et al.	D 30	M. sp. pellegrino*	"
A 6	"	"	D 34	Myc. sp. 607*	"
B 1	Myc. sp. jucho	"	D 39	M. sp. pellegrino*	"

Note PP: Phagus phlei PS: Phagus smegmatis PR: Phagus rabinowitschi PL: Phagus lacticola
HC: Phagus choremis HP: Phagus polonus

*: These host strains were adopted by the present authors.

Tohru TOKUNAGA, Yoneo MARUYAMA and Toyoho MUROHASHI (Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan) : Classification of Mycobacteriophage. — Kekkaku, 37 (12) : 672~676, 1962.

抗血清： 溶菌域および溶菌斑の形態が相互に明らかに異なる6株のファージ、すなわち、Y7, Y10, PP, B1, L1 および D29 を選び、その原液をそれぞれウサギの耳静脈 (D29 だけはモルモット腹腔内) に注射した。注射量は各ファージ原液の 0.5 ml から始め、漸次増量して 5 ml に及んだ。注射は週 2 回、計 16 回行ない、最終回注射後 5 日目に血清を採取し、型のごとくその力価を測定した。なお注射期間中ウサギの体重増加その他に異常を認めなかつた。

中和試験： ファージ相互の類縁関係の大まかな見当をつける目的で一律に次の条件で行なつた。各抗血清のブイオン 100 倍希釈液 (D29 のみは 10 倍) に、等量のファージ液 (約 $2 \times 10^5/ml$ のファージ粒子を含む) を加え、 $37^\circ C$ に 2 時間放置後、ブイオンでさらに 100 倍に希釈、その 0.5 ml を 2 ml の指示菌液と混じ、さらにその 0.5 ml を 0.5% 半流動寒天とともに型のごとく 4% グリセリン加寒天平板上に流し、 $37^\circ C$ 48 時間後に出現するプラーク数 (N_2) をカウントした。対照として抗血清の代りにブイオンを用い、同様にプラーク数 (N_1) を求めた。中和率はこれらの測定値から次の式により算出された。

$$\text{中和率} = \frac{N_1 \sim N_2}{N_1} \times 100$$

したがって中和反応後、対照と同数のプラーク数を示したものの中和率は 0.0、プラーク形成が全くみられなかつたものの中和率は 100.0 と表現される。

ファージ感受性試験： すでに報告した著者らの方法³¹⁾によつた。

成 績

抗血清の力価： 6 種のファージとこれらに対応する抗血清との中和反応を行なうと、温度条件が一定の場合は血清濃度、反応時間、および中和率の間に一定の関連性があり、Burnet らの一次反応式⁵⁾ がほぼ成立することが認められた。また 10^{-3} 程度の希薄な血清では、Burnet ら⁵⁾ や Kalmanson ら⁶⁾ が大腸菌ファージで指摘した initial lag が認められた。

血清の k-value は、Y7 抗血清が 80.5、PP が 11.8、B1 が 5.0、Y10 が 4.0、L1 が 2.9、D29 が 1.3 で一般に低い値を示した。このことは抗酸菌ファージの抗血清価がとくに上がりにくいとみるべきではなく、おそらく注射に用いるファージ原液の titer が抗酸菌ファージでは上がりにくいので注射ファージの絶対量が少なかつたためと考えられる。

抗血清を作るための動物としては、通常ウサギが用いられる⁷⁾ が、抗酸菌ファージの場合モルモットがより優れているという報告⁸⁾もある。著者らの場合注射ファージの種類と量が一定していないためこの点の比較はで

きないが、注射ファージ量をふやせばモルモットもまた実用に耐えうるものと思われる。

各ファージの中和率：ファージ間の類縁関係を正確に知るためには、各ファージに対する k-value をすべての血清について測定し、それを相互に比較することが望ましいが、本実験の目的は抗酸菌ファージの大まかな異同を知ることにあるので、一律に前述の式から中和率を

Table 2. Neutralization Rate of 32 Mycophages to 6 Antiphage-serums

Phage	Antiphage serum					
	Y-7	Y-10	PP	B-1	L-1	D29
Y-1	100.0	3.6	8.9	0.0	1.1	0.2
Y-2	2.5	100.0	5.0	2.3	9.3	10.9
Y-3	100.0	1.6	3.2	2.0	1.0	6.8
Y-4	100.0	5.5	5.5	8.7	2.1	5.5
Y-5	100.0	2.2	5.6	5.0	5.0	7.1
Y-6	100.0	2.1	0.0	6.6	10.0	8.9
Y-7	100.0	1.3	0.6	2.0	9.6	2.9
Y-8	100.0	1.3	6.3	9.6	4.8	2.9
Y-9	100.0	0.0	2.4	3.3	1.6	9.2
Y-10	7.7	100.0	4.4	2.0	2.8	0.9
Y-11	6.7	100.0	2.7	2.2	6.3	4.7
Y-13	2.8	5.9	0.0	6.0	0.0	5.9
Y-16	100.0	2.0	1.1	1.3	4.2	4.9
A-3	95.1	4.9	0.0	8.7	4.4	3.5
A-6	7.8	11.1	11.1	5.9	7.8	7.4
B-1	7.1	0.0	7.1	100.0	1.7	0.9
C-3	10.4	5.2	5.2	5.2	3.9	68.6
L-1	4.1	12.0	8.0	45.7	100.0	3.1
P-P	0.0	0.0	100.0	1.2	6.1	2.3
P-S	85.7	3.4	1.9	3.1	5.4	11.6
P-R	4.7	1.8	1.2	3.6	2.1	0.7
P-L	3.8	1.0	1.0	8.9	7.7	2.6
H-C	98.6	0.7	2.7	6.3	7.8	5.6
H-P	92.2	7.8	9.9	2.1	3.9	6.1
D-4	3.8	1.9	6.2	0.0	11.4	2.0
D-11	7.1	1.2	98.8	3.5	8.3	8.3
D-12	3.0	1.1	2.0	4.0	2.0	0.3
D-28	9.3	3.2	9.3	7.3	2.9	3.9
D-29	3.2	3.2	4.5	9.4	2.2	98.0
D-30	8.3	9.6	2.4	2.1	5.1	1.7
D-34	9.7	8.3	6.0	9.3	1.9	6.0
D-39	4.1	4.1	2.1	3.2	0.0	47.3

$$\text{Neutralization rate} = \frac{N_1 \sim N_2}{N_1} \times 100$$

N_1 : Plaque number before neutralization.

N_2 : Plaque number after neutralization.

計算した。32 株のファージに対する 6 種の抗血清の中和成績を表 2 に示した。

すなわち、homologous なファージと血清間にはほぼ

100% に中和が行なわれたが、heterologous なファージ血清間では多様な反応が行なわれた。しかし ± 15% に一応線を引くと、ほとんどすべてのファージが、全く中和を受けないか、あるいはいずれか1つの抗血清により中和を受け、2種以上の抗血清により中和を受けるものは、L1 ファージ以外にはみられなかった。したがって、中和を受ける抗血清の名称をとつて、32株のファージをY7型、Y10型、PP型、B1型、L1型、D29型およびX型(いずれの血清によつても中和されないもの)の7型に分けることができた。

人型結核菌に対する活性： 抗酸菌のいろいろな菌型に対するこれらファージの溶菌パターンについては別に報告したが^{3) 9) 10)}、後述する理由によりとくに人型菌に対する下記のごとき溶菌性状をファージの分類に利用した。著者らは抗酸菌ファージが人型菌に対して次の3様の態度をとることをすでに報告した²⁾。すなわち、人型結核菌を全く溶菌しない(a型)、濃厚なファージ液をスポットした場合は溶菌(あるいは溶菌様の外観)を示すが、RTDを用いた場合はそれを示さない(b型)、ファージ原液はもとよりRTDによつても溶菌を示す(c型)の3種である。

抗酸菌ファージの分類： 上記の中和反応と溶菌性状の成績を組み合わせて、表3のファージの分類表を考案した。この表に明らかなようにY10血清型はすべて溶菌型cであり、Y7血清型は溶菌型aとbとに分けられる。以下同様に各血清型と溶菌型の間にはきわ

めて高い関連性があることが見出された。なおこの表のうち、Y10型に属する3株のファージや、Y7a型に属するY系ファージや、またPP型に属する2株などは、その非病原性抗酸菌に対する溶菌パターンや溶菌斑の形態などからも、それぞれ同一種のファージ、あるいは互いにきわめて近縁のファージであると考えられる^{3) 11)}。一方Y7b型のA3と他の2者、D29c型の2者などは互いに溶菌斑の形態や溶菌域を異にしている。同じD29血清型でもD29とD39とは溶菌性状が全く別である。さらにX型に一括されたファージが互いに性状を異にすることはもちろんである。

タイピングファージの選定： これらの点を考慮して、表3中の*印を付したファージ14株をタイピングに用うべきことを提案した。その詳細については考察中に論ずる。

考 察

ブドウ球菌やサルモネラなどにおいては、そのスクリーニングやタイピングにファージが用いられ、分類学や疫学面で実用に供されている。抗酸菌の場合はこれらの菌に比して、抗原分析はもとより生物学的性状による分類同定もまだ困難な現状なので、ファージによる型別が可能となれば、その実際の意義は一層大きいと考えられる。そのゆえに、1947年抗酸菌ファージの発見¹²⁾以来、その研究の大半はファージタイピングに集中されてきたといつてよい。

本来タイピング用ファージとしては、チフス菌のVi-phage IIのように¹³⁾、適応力が高く、かつ菌の毒力とも一定の関連性を有するものが望ましい。しかし抗酸菌では目下のところこのようなファージは知られていないので、ブドウ球菌の場合のように¹⁴⁾、なるべく宿主域が特異的なファージを選びそれらを組み合わせるによりタイピングに役立てるよりほかはない。したがって抗酸菌ファージの感受性試験法をstandardizeする努力^{1) 2)}とともに、多数の抗酸菌ファージの異同を確かめ、整理を行なつて、ファージ自身のスクリーニングを行なうことが必要である。

従来、後者に関する努力としては、主として非病原性抗酸菌に対する溶菌パターンによりファージの同定が試みられてきた。Penso¹⁵⁾、Hnatoko¹⁶⁾、武谷¹⁷⁾、Froman¹⁸⁾などの諸報告がそれである。とくにFromanは多数のファージをテストして非病原性抗酸菌のためのタイピングファージの選定を試みた。

しかしながらファージの分類同定を行なうには遺伝的にもつとも安定な抗原性によるのがより確実な方法であろう。しかして抗酸菌ファージの抗原性に関しては、Bowmann¹⁹⁾、武谷ら²⁰⁾、Hnatoko¹⁶⁾、Sellersら⁸⁾が若干の検討を行なっているが、広範にファージの分類に

Table 3. Classification of Mycophages

Serological type	Lytic type**	Phage
Y 10	c	Y2, Y10*, Y11
Y 7	a	Y1, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7*, Y8, Y9, Y16, HP
	b	PS, A3, HC*
PP	a	PP*, D11
B 1	c	B1*
L 1	b	L1*
D29	a	D39*
	c	D29*, C3*
X	a	PR*, PL*, D12, D30*, D28, D34
	b	Y13, D4*, A6*

* Typing phages tentatively selected.

** Lytic type was determined by the sensitivity against human tubercle bacilli (H37Ra).

a: Can not lyse H37Ra.

b: Can lyse H37Ra at high titer but not at RTD.

c: Can lyse H37Ra at both high titer and RTD.

役立てた報告はなかつた。

また本報告においてはファージの分類に人型結核菌に対する溶菌性状を加味し、とくに a, b, c の 3 型に分けたが、この点は新しい試みである。本来ファージタイプは、単に分類学的興味のほかには疫学的・診断学的意味をもっている。抗酸菌ファージの場合、人型菌ないし有毒結核菌の分類同定に資しうることが望まれる。その意味では人型菌を溶菌しうるファージの中に有用なファージが見出される可能性が考えられよう。したがって人型菌を溶菌するか否かでファージを 2 大別することのほうが、従来のすべての研究がそうであったように多数の非病原性抗酸菌に対する溶菌パターンで抗酸菌ファージを細別することよりも実際の意味があらうと考えられる。

さて表 3 にはなおいくつかの問題点が含まれている。第一に中和率の誤差を一律に $\pm 15\%$ に見込むことによつてこの表ができていく点である。被検ファージ数 (N_i) の相違は percentage law が成立すると思われるので大きな影響はないかもしれないが、抗血清の力価の相違はかなり大きな影響があると考えねばならない。事実、たとえば D29 抗血清に対する C3, D39 のごとく 68.6%, 47.3% といった中間的な中和率を示すものは、血清濃度をさらに上げることによつて中和率は大きくなり、ちょうど Y7 血清に対する A3, PS, HC, HP と同様な中和率 (85~99%) を示すようになる。その意味で C3 と D39 は D29 血清型に所属せしめた。

もしさらに力価の異なる抗血清を用いれば表 2 の中和率はかなり変化することが予想される。ゆえにファージ間の類縁関係を正確に知るためには各ファージの各抗血清に対する k-value を一つ一つ測定し、それに基づいての比較をすべきであるが、その手技は多数のファージ、抗血清について行なうにはあまりに煩雑であるので、ファージ相互の異同に関して大まかな目やすをつけるために上述の計算式に従い、かつ $\pm 15\%$ に一応の線を引いた次第である。

次に L1 は B1 血清に対しかなり高い中和率を示すが、B1 は L1 血清によつて中和を受けないことの解釈である。これがアデノウイルスと流行性イヌ肝炎との間の one-sided immunological reaction²¹⁾ と相似の現象であるか、あるいは別に実験上の原因を考えなくてはならぬかについては、さらに検討を行ないたい。

人型菌に対し b 型の溶菌態度を示すファージについても別個の検討が必要である。希釈ファージ液を用いると溶菌を示さなくなるものの原因が abortive infection による host killing によるものか、宿主菌あるいはファージの mutation, あるいは modification を考えるべきか明らかでない。ただし Y13 の場合は 2 種類の

ファージの混在が明らかとなつた (未発表)。またある系では抗酸菌ファージの吸着により宿主菌が殺されることが明らかとなつた²²⁾。

表 3 の分類に基づいて、14 株のタイプング用ファージを選んだが、この選定が必ずしもファージ型と一致していないのは、人型菌以外の抗酸菌に対する溶菌性状³¹⁰⁾をも考慮したためである。しかし実際にはこの 14 株のうちタイプングの目的に応じていくつかのファージがさらに選ばれるべきである。その点に関してはタイプングの結果とともに別に報告することとしたい。

付言せねばならないが、この 14 株の選択は、研究の未開拓な現段階においては最良と考えられる方法に基づいて行なわれた。しかし選定の方法が最良でも、選ばれたファージはなお抗酸菌のタイプングには不十分である。われわれは今日依然として人型菌の中をいくつかに分かちうるようなファージをもたない。著者らの分類表が将来さらに追加、改良され、あるいは適応性の高いファージが発見されることを望みたい。

結 論

世界各地から集められた 32 株の抗酸菌ファージについてその総合的な分類を試みた。しかし、Y7, Y10, PP, B1, L1, D29, X の 7 血清型と、人型結核菌に対する溶菌態度により a, b, c の 3 溶菌型とに分ち、これらを組み合わせて、全体を 7 型、10 亜型に分類した。

これらの中からタイプングに必要と認められるファージ 14 株を選定した。

以上に関し種々の考察を行なつた。

文 献

- 1) 徳永徹・室橋豊穂・関又蔵：医学と生物学，55：26，1960。
- 2) 徳永徹・室橋豊穂：医学と生物学，57：67，1960。
- 3) 徳永徹・関又蔵・室橋豊穂：日本細菌学雑誌，16：898，1961。
- 4) 徳永徹・室橋豊穂：日本細菌学雑誌，16：960，1961。
- 5) Burnet, F. M., E. V. Keogh & D. Lush: Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 15: 241, 1937.
- 6) Kalmanson, G. M., A. D. Hershey & J. Bronfenbrenner: J. Immunol., 45: 1, 1942.
- 7) Adams, M. H.: Methods in Medical Research, 2: 1-73, Year Book Publishers, Chicago, 1950.
- 8) Sellers, M. I & H. R. Runnals: J. Bact. 81: 442, 1961.
- 9) 室橋豊穂・徳永徹：医学と生物学，56：6，210，1960。

- 10) 室橋豊穂・徳永徹・関又蔵：医学と生物学，60：7，1961.
- 11) Murohashi, T., T. Tokunaga & M. Seki : *Acta Tuberculosa Pneumologica Scandinavica*, 41 : 33, 1961.
- 12) Gardner, G. M. & R. S. Weiser : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 66 : 205, 1947.
- 13) Craigie, J. & C. H. Yen : *Canad. Publ. Hlth. J.*, 29 : 448, 1938.
- 14) Williams, R. E. O. & J. E. Rippon : *J. Hygiene*, 50 : 320, 1952.
- 15) G. Penso : *Les bacilles paratuberculeux*, Masson et cie, 99 : 1950.
- 16) Hnatoko, S. I. : *Canad. J. Med. Sci.*, 31 : 462, 1953.
- 17) 武谷健二：日本臨床結核，18：147，1959.
- 18) Froman, S. : *The 18th conference on chemotherapy of Tuberculosis*, 1959.
- 19) Bowman, B. U. : *J. Bact.*, 76 : 52, 1958.
- 20) Takeya, K., T. Yoshimura, K. Yamaura, & T. Toda : *Am. Rev. Resp. Dis.*, 80 : 543, 1959.
- 21) Heller, L. A. & C. R. Salenstedt : *Virology*, 11 : 640, 1960.
- 22) 徳永徹・水口康雄・丸山米夫・室橋豊穂：日本細菌学雑誌，1962，掲載予定.

Classification of Mycobacteriophage

Attempts have been made by many investigators for classifying mycobacteria by the use of mycobacteriophage. However, little attention was paid hitherto to the identification of the phage strains, which were isolated from soil of various places independently. To carry out phage typing of mycobacteria, it seems indispensable to make classification or identification of the phage strains to be used. In the present paper, studies on the classification of 32 mycophage strains collected from various laboratories of the world are presented.

Anti-phage sera were prepared by the repeated intravenous injections of phage suspension into rabbit. According to the neutralization rates calculated, 32 phage strains examined were classified into following 7 serological types: Y7, Y10, PP, B1, L1, D29 and X. Here,

X type phage strains did not show any sign of neutralization by the 6 kinds of anti-sera used. Further, from the standpoint of the activity to human type tubercle bacilli, these phage strains were classified into 3 lytic types, i. e. a, b and c. Thus, 32 phage strains were classified into 10 different types.

Typing phages were selected from these different types and some other strains were additionally selected in consideration of the specificity in the sensitivity to saprophytes and the plaque morphology to make up 14 typing phages. These 14 phage strains are thought to be adequate for the phage typing on mycobacteria at the present step of the mycophage studies. However, more effort should be paid, of course, for discovering much more number of adequate phage strains for the typing or adaptive phage like Vi-phage II in Salmonella.