

抗酸菌ファージ Y 13 について

水口康雄・徳永 徹・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 39 年 10 月 16 日

BIOLOGICAL CHARACTERS OF MYCOBACTERIOPHAGE Y 13*

Yasuo MIZUGUCHI, Tohru TOKUNAGA and Toyoho MUROHASHI

(Received for publication October 16, 1964)

In 1959 the thirteen strains of mycobacteriophage were isolated by the present authors from the soil in Tokyo, and the biological properties of them were reported (Murohashi, T., et al. : Acta Tuberc. Pneu. Scand., XLI, 33, 1961). Recently two kinds of bacteriophage have been isolated from one of those 13 strains, Y 13, and named as Y 13 L and Y 13 S.

The Y 13 L produces a large plaque, 3 to 4 millimeter of diameter on the host bacteria, *Myc. sp. Jucho*, and the Y 13 S a smaller one, 0.7 to 1.5 millimeter of diameter. The particle sizes revealed by electron micrographs of them were as follows: The head of Y 13 L is spherical with the diameter of approximately 80 m μ and the tail is about 140 m μ long, while the head of Y 13 S is cylindrical with the size of approximately 110 \times 60 m μ , and the tail length is about 220 m μ .

The phage patterns of 117 strains of rapidly growing saprophytic mycobacteria to the above-mentioned two phages were grouped into 3: the first group is susceptible to the both phages and 9 out of 117 belong to this group, the second is susceptible only to Y 13 S and 9 strains belong to it, and the third has no susceptibility to the both phages. Both phages have no activity against slowly growing mycobacteria. However, a mutant isolated from Y 13 L phage was able to lyse human type and bovine type tubercle bacilli, and was named Y 13 A. This mutant, Y 13 A could also produce some growth-inhibiting area on the bacterial lawn of avian type and of some strains of unclassified mycobacteria, but it was concluded that this was not a real lysis, but just a growth-inhibition.

A strain of *Myc. sp. Jucho* resistant to Y 13 L was susceptible to Y 13 S, and vice versa.

Y 13 S phage was neutralized by anti-Y 13 L serum, but Y 13 L phage was not neutralized by anti-Y 13 S serum. The one-sided immunological reaction described above might be explained by assuming that Y 13 L might have antigen (s) other than that common to Y 13 S.

It was noticed that Y 13 L phage was closely related to D 4 (Froman) and A 6 (Takeya) in almost all of the biological properties, while Y 13 S resembled to Phagus *choremis* (Hauduroy) both in the antigenic properties and the particle morphology, and partially related to Y 7 in the antigenic property.

Availability of Y 13 L and S phages to the phage typing for mycobacteria was discussed; In similar way as in D 4, Y 13 L can be a key phage in the identification of *Myc. smegmatis*, and Y 13 S can also be useful to identify some group of saprophytic mycobacteria.

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku., Tokyo, Japan.

著者らはさきに東京都下の土壌より 13 株の抗酸菌ファージを分離し、Y系ファージと名付け¹⁾、その生物学的諸性状を報告した²⁾³⁾。これらファージのうち Y 13 と名付けられた 1 株は、プラークの形態、宿主溶菌域、血清学的性状などが他のファージとは著しく異なっており、かなり特殊なファージであろうと考えられたが、こ

の Y 13 の溶菌液中には 2 種類のファージが混在していることが最近見出だされ、その両者の生物学的性状も明らかとなり、国内国外の分離ファージ株との異同についても若干の知見が加えられた。したがって前報告²⁾³⁾の補遺の意味で、Y 13 からさらに分離されたこれらの 2 つのファージについて報告する。

実験方法

前報告²⁾の方法をほぼそのまま踏襲した。若干変更した点などについては実験成績中に述べる。

実験成績

1) Y 13 L と Y 13 S の分離

Y 13 ファージは 1959 年に土壌より分離されて以来¹⁾、発育の早い抗酸菌である猷調株を宿主菌とし、この菌を通して約 5 年間継代されてきた。分離当初より宿主菌上のプラークの形態に大小の 2 種が認められ、大きいものは径 3~4 mm、透明かつほぼ円型であり、小さいものは径 0.7~1.5 mm、不透明円型であると報告された²⁾。その後この 2 種のプラークはそれぞれ単離することができ、そのおのおのを猷調株を宿主菌として増強するとき、その progeny はそれぞれ大または小のプラークを

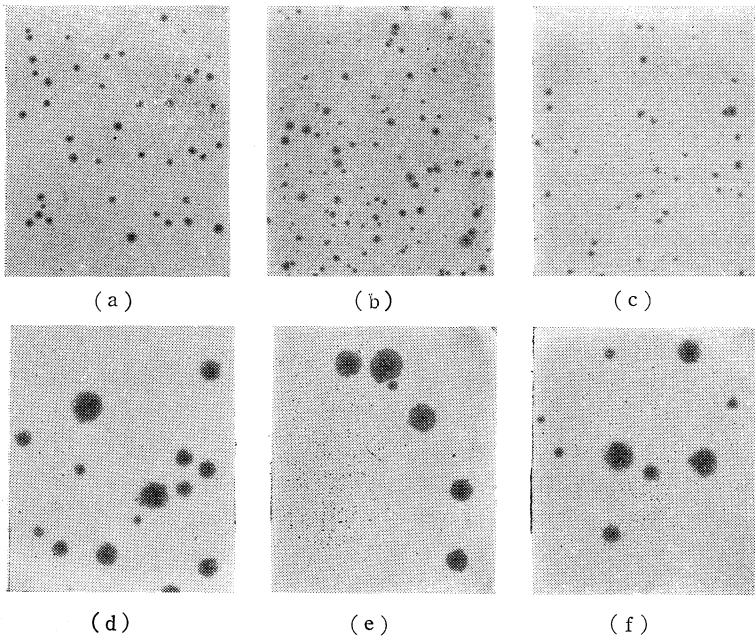


Fig. 1 Plaque morphology of 6 mycobacteriophages

- (a) Y 13 S (b) Y 7 (c) Phagus choremis
(d) Y 13 L (e) A 6 (f) D 4

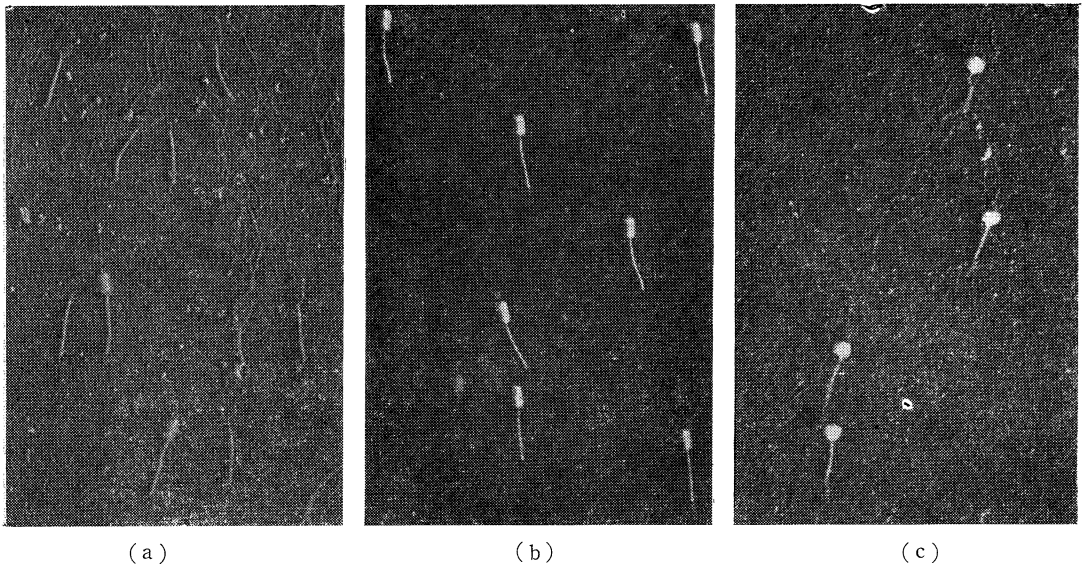


Fig. 2 Morphology of 3 mycobacteriophage particles

- (a) Y 13 S (b) Phagus choremis (c) Y 13 L

The sizes of the particles were described in the results. In (a), a lot of phage ghosts and DNA-like fibers are seen. In (b), a particular structure looking like a pin is seen at the tail tips.

Table 1. Phage Pattern of Y 13 L and Y 13 S
Phage against 117 Strains of Rapidly
Growing Mycobacteria

Representative bacterial strain	Number of bacterial strains tested	Phage pattern		
		Y 13 L	Y 13 S	Y 13 L (J ₂)*
M. smegmatis(Y)	9	5*	5	5~4
M. sp. Sekiguchi	9	0	5~4	0
M. phlei(Y)	99	0	0	0

* The numbers in this column indicate the degree of lysis: 5~4 means a strong lysis and 0 means no lysis.

** The phage released from Myc. sp. Jucho lysogenized by Y 13 L was designated as Y 13 L (J₁). The Y 13 L (J₂) means the Y 13 L phage released from the bacteria previously lysogenized by the Y 13 L (J₁).

作るにいたることが見出された。

この大きいプラークを作るファージは Y 13 L, 小さいプラークを作るファージは Y 13 S と命名された。(Fig. 1 参照)

2) Y 13 L と Y 13 S の粒子の形態 (Fig. 2 参照)

自然乾燥状態での電子顕微鏡像によると, Y 13 L は頭部は球型に近く, 影の形からおそらく二十面体であろう。その径は, 約 80 μ m で尾部の長さは約 140 μ m である。Y 13 S は円筒状の特殊な形を示し, 長径約 110 μ m, 短径約 60 μ m で, 尾部の長さは約 220 μ m である。前者は瀬川らの電顕像による分類によると 1 型に相当するが, 後者は該当する型がない。形態学的には, 著者らが報告した phagus choremis⁴⁾, および武谷らが報告した phagus polonus のそれ⁵⁾ に似ているものと思われる。

3) 発育の早い抗酸菌に対する溶菌性

予研保存の抗酸雑菌 117 株に対する Y 13 L と Y 13 S の感受性を RTD スポット法⁶⁾を用いて調べた。その成績を表 1 中にまとめた。

Y 13 L, S とともに獣調株を溶原化することができるが, その溶原化率は両者の間にやや開きがあり, 前者は 4.7%, 後者では 27% である⁷⁾。Y 13 L で溶原化した獣調株より自然放出されたファージで, 再度獣調株を溶原化し, それよりさらに自然放出されたファージを得ることができ, このファージを Y 13 L (J₂) と名付けたが, その溶菌域を表 1 中に併示した。

117 株の抗酸雑菌は, Y 13 L と Y 13 S の双方によつて強い溶菌を受ける群 (9 株) と, Y 13 S のみによつて溶菌される群 (9 株) と, L および S のいずれによつても溶菌を受けない群 (99 株) の 3 群に大別された。

このうち第 1 の群に属する菌株は, 宿主菌の獣調株のほか, Maccoy, 伝鳥, 竹内, スメグマ (予研), F 21 (Froman), ATCC 607, Ranae, 竹内 CCS の諸株である。

第 2 の群に属する菌株は, 主として横浜大穴戸らが自然界より分離した菌で, MSM 1, MM 1, PM 2, B 1027,

B 1244, A 496, 関口, 非 S 2, B 1 の諸株である。

いずれのファージによつても溶菌しない第 3 の菌群中には, Balnei や Salmonifilum などの比較的低温で発育するすべての菌が含まれ, そのほか Penso 由来の Myc. smegmatis, Myc. lacticola, Myc. rabinowitschi, Myc. phlei をはじめ, 予研保存のフレイ, プチリクム, 竹尾など 42°C で発育する多数の抗酸雑菌が含まれている。

なお Y 13 L (J₂) の溶菌パターンは, 表 1 のごとく, 溶菌の程度が原株よりもいくらか弱いものがみられたが, 宿主域の変化は認められなかつた。

4) Y 13 A の分離

著者らはさきに, 人型結核菌をまいた平板上に Y 13 ファージをスポットする場合, RTD を用いては溶菌を認めたいが, より高濃度のファージ液をスポットすると, しばしば低度の溶菌が認められることを報告した⁸⁾。このような溶菌部位をかきとり, さらに人型結核菌 H₃₇Ra を用いて増強を行なうと, 得られたファージは強く人型菌を溶菌するようになる。しかしてこのファージは Y 13 L より低率に出現する mutant であることが明らかとなつた。この mutant は Y 13 A と命名された。

5) 発育の遅い抗酸菌に対する溶菌性

人型結核菌 6 株 (H₃₇Ra, H₃₇Rv, H₂Ra, H₂Rv, 青山 B, 奄美 61), 牛型菌 2 株 (BCG, Ravenel), 鳥型菌 3 株 (Kirchberg, Flamingo, Maren Cecilie) および 15 株の unclassified mycobacteria (P 1, P 4, P 6, P 8, P 16, P 17, P 18, P 30, P 35, P 36, P 37, P 39, P 40, P 41, 121326) に対する Y 13 L, Y 13 S および Y 13 A の感受性をしらべた。方法は小川培地上の菌に各ファージの原液および 1 RTD 液のスポット法を用いた。人型菌と牛型菌に対しては Y 13 A が強い溶菌を示し, Y 13 L 原液がときに弱い溶菌を起こした。RTD では Y 13 L, S とともに感受性を示さない。鳥型菌と unclassified mycobacteria に対しては, いずれのファージも感受性を示さなかつたが, Y 13 A の高濃度液のスポットにおいては, スポットの部位に若干の発育阻止帯が認められた。

6) Y 13 L と Y 13 S との交叉耐性試験

Y 13 L と Y 13 S にそれぞれ耐性の獣調株を作り, その交叉耐性をしらべたところ Y 13 L は Y 13 S 耐性菌に対し, また Y 13 S は Y 13 L 耐性菌に対し感受性であつた。またそれぞれのファージの溶原菌を作りその感受性をしらべたが, これも互いに感受性であり, この面からも Y 13 L と Y 13 S とは別種のファージであることが知られた。

7) 血清中和反応

Y 13 L と S をそれぞれ反復してウサギに注射し抗血清を型のごとく作り, 前報告と同様な方法⁹⁾で中和試験

Table 2. Neutralization Rate (by the Anti-Phage Sera) of Mycobacteriophages Closely Related to Y 13 L or Y 13 S Phage

Antiserum	Neutralization rates of the phages					
	Y 13 L	Y 13 S	A 6	D 4	HC	Y 7
Y 13 L	96.0	81.7	95.8	84.5	10.8	5.4
Y 13 S	-7.7	100	0.7	3.6	94.9	11.8
Y 7	1.8	79.8	-7.8	9.0	86.2	92.9

Neutralization rates were calculated by $N_0 - N / N_0 \times 100$. Here, N_0 stands for the plaque number in the control plate and N that after neutralization.

を行なつた。その結果を表2に示した。

Y 13 L ファージが Y 13 L 抗血清に、Y 13 S ファージが Y 13 S 抗血清によつて中和されるのは当然であるが、Y 13 L ファージが Y 13 S 抗血清によつて中和を受けないのに反し、Y 13 S ファージは Y 13 L 抗血清によつて中和を受けた。この点に関してはのちに考察を加えたい。

8) Y 13 以外の抗酸菌ファージとの関係

プラークの形態や溶菌域などから Y 13 L は A 6 (武谷ら)¹⁰⁾および D 4 (Froman)¹¹⁾との類似性が着目された。A 6, D 4, Y 13 の3者が、著者らの報告した「抗酸菌ファージの分類表」の中でともに Xb グループに所属せしめられたのはこの理由による。一方 Y 13 S は著者らの分離した Y 7¹⁾、および Hauduroy 由来の phagus choremis (HC) とのプラークの形態の類似性、またとくに後者の場合粒子の形態の相似点が注目された (Fig. 1, Fig. 2 参照)。そこで如上の6種のファージ間の性状の比較が、溶菌域、交叉耐性テスト、血清中和反応などを用いて行なわれた。抗血清による中和率を表2中に示した。

A 6, D 4 はそれぞれ Y 13 L 抗血清により高度の中和を受け、この3者が血清学的にも近縁のものであることが明らかとなつた。またこれら3者は溶菌パターンからみても、交叉耐性試験の成績からもきわめて類似した結果を得た。ただし獣調菌に対するこれらファージの溶原化は、D 4 ではきわめて困難であり、Y 13 L および A 6 では容易であつて、ファージの virulence には大きな差がみられた。

Y 13 S ファージは Y 7 抗血清である程度中和を受けることが見出された。一方 Y 7 ファージは Y 13 S 抗血清ではほとんど中和を受けなかつた。また HC ファージは Y 13 S, Y 7 両抗血清で中和を受けた。

溶菌パターンにおいては、Y 13 S, Y 7, HC はかなり異なつた成績を示した。たとえば *Myc. lacticola* (Penso) はこの3者中 HC にのみ感受性を有し、また宍戸由来の土 30 株は Y 7 にのみ、同じく宍戸由来の MM 1, MSM 1, PM 2, B 1027, B 1244, A 496 などは Y 13 S にのみ感受性を示した。

結局 Y 13 L と D 4 と A 6 とはきわめて近縁のファージであり、Y 13 S, Y 7, HC はプラークの形において近似であり、共通抗原を有するが、溶菌パターンにおいてはかなり異なる一群である、ということができよう。

考 察

Y 13 ファージには、Y 13 L と Y 13 S という2種類の異なつたファージが混在していることが明らかとなつた。この両者が 1959 年の分離当初¹⁾より混在していたものとする、約5年間獣調株を宿主菌として継代を続けられる間、互いに独立を保ちつつ増殖してきたことになる。1960 年に撮影されたプラークの写真と現在のプラークを比較して差異が認められないことは、この可能性を強く示唆するものと考えられる。L も S もともに temperate なファージであり、この間に recombination の起こつた可能性があることは、L と S とが共通抗原をもっていることから考えられるが、その積極的な証拠はない。

ヒト型結核菌上に高濃度の Y 13 をスポットした場合、しばしばプラークの形成がみられたという従来の知見⁹⁾は、Y 13 L の中に低率に出現する Y 13 A の存在によることが明らかとなつた。トリ型菌や非定型抗酸菌に対しても高濃度の Y 13 はときに発育抑制斑を生ずるが、これは、ファージによる定型的な溶菌ではなく、別の原因、たとえば著者らが以前に報告した¹²⁾抗酸菌ファージの流産感染と宿主殺菌効果に基づくものかもしれない。

Y 13 L および Y 13 S に対する他のファージの関連性が明らかにされた。この両者に近縁なファージとしてあげられたものの中で、D 4 はアメリカで、A 6 は日本の九州で、HC はスイスでそれぞれ分離されたものであり、この事実は抗酸菌ファージの分布を考えるうえにも興味のあることである。

Y 13 L と D 4, A 6 の3者はとくに近縁なファージであり、同一の origin をもつファージかとも考えられる。これらの宿主菌はそれぞれ獣調、F 21, 607 であり、永年これらの宿主を通して増強継代されてきた。この3株の宿主菌は著者らのファージタイピング¹³⁾によると、すべて *Myc. smegmatis* のグループに属するものではあるが、しかし獣調は *Phagus rabinowitschi* (Penso) に対する感受性をもたず、F 21 と 607 とはこのファージに感受性をもっているなど、この3者は必ずしも全く同じ菌ではない。したがつて origin は同じでも、若干性状の異なる菌株で継代されるうちに、多少の性状、ことにファージの毒力に変化を来したということは十分考えられることであろう。

Y 13 S と Y 7 とはプラークの形が類似しており、また血清学的にも共通抗原を有することが知られた。しかし Y 7 ファージは Y 13 S 抗血清中で中和を受けず、

Y 13 L と Y 13 S との血清学的関係と同様に one-sided immunological reaction が認められた。同様の現象はまた B 1 と L 1 ファージの間においても認められたところである⁹⁾。この理由はおそらく Y 13 L あるいは Y 7 ファージ粒子が Y 13 S 粒子との共通抗原のほかさらに別の抗原をもつていると仮定することにより説明されよう。

Y 13 S と HC とは電子顕微鏡によつて粒子の形態が類似していることが明らかとなつた。従来抗酸菌ファージでこのように頭部が桿状あるいはカイコのマユ状を呈していると認められたものは、この Y 13 S と HC⁴⁾のほか HP⁵⁾ (Hauduroy : Phagus polonus) のみである。血清学的にも Y 13 S と HC は近縁であり、また HP も著者らにより Y 7 血清で中和を受けることが指摘されている⁹⁾。したがつてこの 3 者は、溶菌域にはかなり差はあるがかなり近縁のファージであり、分類上同一の群に入れることができよう。

抗酸菌のタイピングにとつて Y 13 L と S とはどのような意義をもちうるであろうか。Y 13 L ときわめて近縁であることが明らかにされた D 4 ファージは、Myc. smegmatis を同定するための key phage として Froman¹¹⁾および著者ら¹³⁾によつて提唱されている。したがつて Y 13 L もまた Myc. smegmatis を同定する key phage たりうるわけである。一方 Y 13 S によつてだけ溶菌を受ける一群の抗酸菌が存在することが知られた。この性状は抗酸雑菌の分類上有用であると考えられるので、著者らは Y 13 S を抗酸菌のタイピングファージのセットの中に加えようと考えている。

結 論

抗酸菌ファージ Y 13 から 2 種の異なつたファージ Y 13 L と Y 13 S とが分離された。それぞれのプラークの形態、粒子の形態、結核菌を含む種々の抗酸菌に対する溶菌域、交叉耐性、血清学的性状などが記載された。また他の抗酸菌ファージとの異同、ファージ分類学上の位置、タイピングへの有用性などが考察された。

丸山米夫技官の技術上の援助に感謝する。

文 献

- 1) 室橋豊穂他：医学と生物学，53：242，1959.
- 2) 室橋豊穂他：胸部疾患，5：1，1961.
- 3) Murohashi, T., et al. : Acta Tuberc. Pneum. Scand., XLI : 33, 1961.
- 4) Tokunaga, T., et al. : J. Bacteriol., 86 : 608, 1963.
- 5) 武谷健二：第 37 回日本細菌学会総会特別講演，1964.
- 6) 徳永徹他：日本細菌学雑誌，16：898，1961.
- 7) 水口康雄：日本細菌学雑誌，19：169，1964.
- 8) 徳永徹他：日本細菌学雑誌，16：960，1961.
- 9) 徳永徹他：結核，37：672，1962.
- 10) Takeya, K., et al. : Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 543, 1959.
- 11) Froman, S. : Transactions of the 18th Conference on the chemotherapy of Tuberculosis, V. A-Armed Force ; p. 223, 1959.
- 12) 水口康雄他：日本細菌学雑誌，17：770，1962.
- 13) 徳永徹他：日本細菌学雑誌，16：1031，1961.