

原 著

抗酸菌ファージの感染に関する研究

2. 抗酸菌ファージ B-1 株の抗酸菌 7 株への感染時間

萩原 義 郷・坂 田 美千代

福岡歯科大学口腔細菌学教室

鹿 田 喜代子・佐々木 満 子

久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座

受付 昭和 51 年 7 月 24 日

INFECTION OF MYCOBACTERIA WITH MYCOBACTERIOPHAGE

2. Adsorption-Invasion Time of Mycobacteriophage
B-1 Strain to 7 Strains of Mycobacteria

Yoshisato HAGIHARA*, Michiyo SAKATA, Kiyoko SHIKADA and Mitsuko SASAKI

(Received for publication July 24, 1976)

Six tenths per cent of Sodium hydroxide was used to estimate the time required for the adsorption-invasion of mycobacteriophage B-1 strain to 7 strains of mycobacteria which had different generation time and different latent period in infection with the same phage. Mycobacteria used were *M. smegmatis*, atypical mycobacterium P-17, P-18, P-22, P-40, P-44 and *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H₃₇Ra.

The results obtained are summarized as follows.

- 1) B-1 Phage was adsorbed on and invaded into the host cells within 30 sec after mixing the phages and the host cells.
- 2) Adsorption-invasion time was the same in all the mycobacterial phage and host systems used.
- 3) The number of plaque-formant increased logarithmically and showed the maximal value in 5 to 10 min after mixing the phages and the host cells.

先に萩原ら¹⁾は、抗酸菌の発育速度の解析を目的として抗酸菌ファージ B-1 株を分裂時間の異なる抗酸菌 7 株に感染させ、その潜伏期を測定し、分裂時間の長い菌は、B-1 ファージ産生における潜伏期も長いことを明らかにした。そこで、これらの菌株が同一ファージを産生するために要する時間の異なるのはいかなる原因によるものかを究明するために、まず感染成立時間について実験を行なった。

抗酸菌は、一般に使用されている培地では菌塊を作つ

て発育する。それゆえに、一般の細菌で行なわれているような方法で菌とファージの関係について簡単に定量的実験を行なうことは困難である。一方、菌塊のできない程度に Tween 80 を添加すると、ファージの菌への吸着が阻害されるのでこの方法は適用されない²⁾。

抗酸菌ファージの吸着に関してはいくつかの報告があるが³⁾⁻⁹⁾、吸着の時間的關係についての研究は少ない。今回われわれは、先に萩原ら³⁾が行なつた実験に基づき、苛性ソーダ (NaOH) によつて free phage を不活化す

* From the Dept. of oral Microbiology, Fukuoka Dental College, Nishi-ku, Fukuoka 814 Japan.

る方法を用いて B-1 フェージの感染成立時間を測定したので、その結果を報告する。

実験材料と方法

供試菌株：発育速度の異なる抗酸菌7株（いずれも教室保存株）を使用した。すなわち発育迅速株として *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) を、発育遅延株として *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H₃₇Ra (H₃₇Ra) を、また中間の発育速度を有する菌株として非定型抗酸菌 P-17, P-18, P-22, P-40 および P-44 の各株を使用した¹⁾。これらのうち P-17, P-40 および P-44 の3株は Runyon の分類による photochromogens に属し、P-18 および P-22 の2株は nonphotochromogens に属する菌である。

供試フェージ：教室保存の抗酸菌フェージ B-1 株 (B-1 フェージ) を使用した。B-1 フェージは4%グリセリンブイヨンに培養した *M. smegmatis* で増強し、遠沈濾過後、実験に供した。

供試培地：4%グリセリンブイヨン、4%グリセリン寒天培地、10%に牛血清アルブミンを加えたキルヒナー培地およびキルヒナー寒天培地を用いた。

実験方法：*M. smegmatis* はグリセリン寒天培地48時間培養菌を、また他の菌はキルヒナー寒天培地2~3週間培養の菌を使用した。これらの菌はガラス玉入りコルベンを用いて菌塊を磨碎し、*M. smegmatis* はグリセリンブイヨンに、その他の菌は、キルヒナー培地に浮遊後、1,000回5分遠沈し、その上清を比濁法により約 10^8 /ml に合わせたものを菌液とした。この菌液 3.5ml を 37°C に保ち、同じく 37°C に保つた 1×10^9 /ml のフェージ液 3.5ml を加えた後 (MOI 10) 経時的にその 0.5ml を取り出して、1.2%に NaOH を加えたグリセリンブイヨン (*M. smegmatis* の場合) またはキルヒナー培地 (その他の菌の場合) 0.5ml に加え、5分放置して free phage を不活化した。その後 NaOH の作用を中止するために、この混合液にグリセリンブイヨンまたはキルヒナー培地 3ml を加えてよく混和し、ブラックカウント法により、生ずるブラック数を測定した。いずれの菌株の実験においても指示菌としては *M. smegmatis* を使用した。またブラックカウント用の培地としてはテスト菌が *M. smegmatis* の場合にはグリセリン寒天培地およびグリセリン半流動培地を、その他の菌の場合にはキルヒナー寒天培地およびキルヒナー半流動培地を使用した。ブラック数はフェージ液および菌液の混合液 1ml 中の数として算出した。

実験結果

実験結果は、図1, 2, 3 および 4 に示す。いずれの実験においても菌液とフェージ液を混合した直後に NaOH

処理を行なった材料においてはブラックの形成は全く認められなかつた。このことは NaOH 処理後の混合液中には free phage が全く存在しないことを示すと同時にフェージの菌への感染が成立していないことを示すものである。菌とフェージを混合して30秒後の材料を NaOH で処理した場合には *M. smegmatis*, P-17, P-18, P-22, P-40, P-44 および H₃₇Ra のいずれの菌の場合にもフェージとの混合液 1ml 当り約 $10^1 \sim 10^2$ のブラックの出現が

Fig. 1. Increase in the Number of Plaque-formant after Mixing the Phages and the Host Cells (*M. smegmatis*)

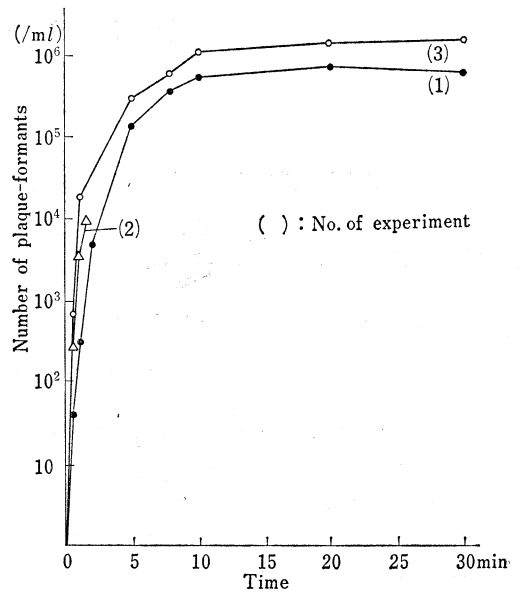


Fig. 2. Increase in the Number of Plaque-formant after Mixing the Phages and the Host Cells. (p-18, p-22)

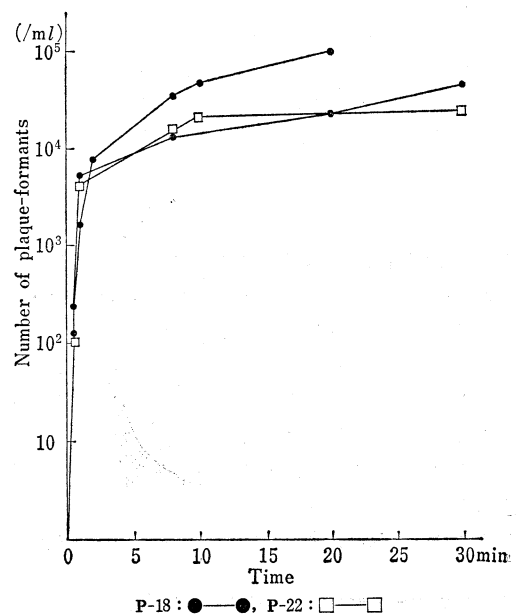


Fig. 3. Increase in the Number of Plaque-formant after Mixing the Phages and the Host Cells (p-17, p-40, p-44)

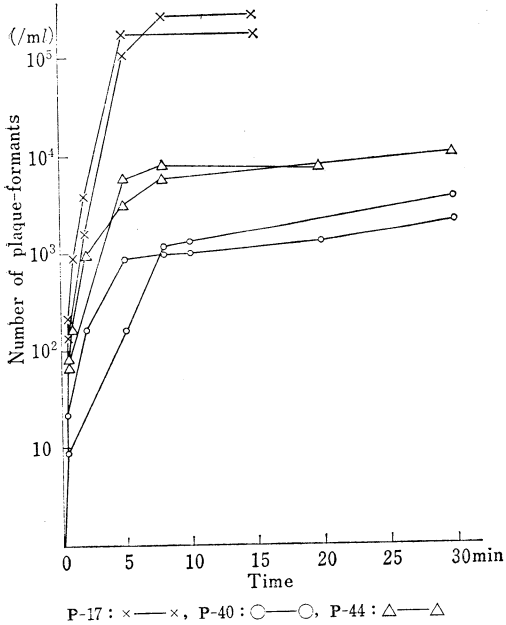
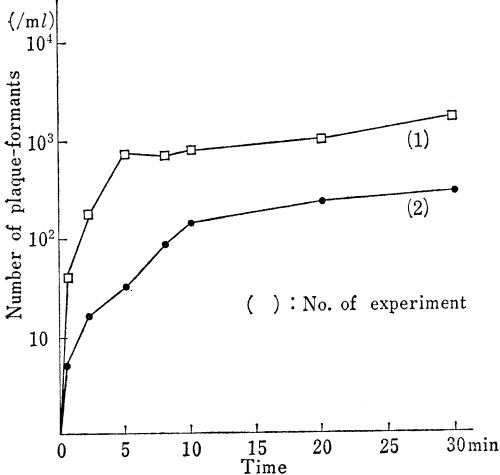


Fig. 4. Increase in the Number of Plaque-formant after Mixing the Phages and the Host Cells ($H_{37}Ra$)



認められた。すなわち少なくとも30秒以内には、これらの菌へのB-1ファージの感染が成立していることが明らかである(後述)。また使用したすべての菌に対する感染における感染時間として、同じ結果が得られたことは注目すべきことであろう。出現するブラック数は以後ほぼ対数的に増加し、約5~10分後に plateau に達した。Plateau におけるブラック数は宿主菌によつて異なっており、*M. smegmatis* においては $10^5 \sim 10^6/ml$ 、P-18 および P-22 においては $10^4 \sim 10^5/ml$ 、P-17、P-40 および P-44 においてはそれぞれ約 10^5 、 10^3 および $10^4/ml$ 、ま

た $H_{37}Ra$ においては $10^2 \sim 10^3/ml$ であつた。

考 察

萩原ら³⁾は、先に B-1 ファージが 0.6% NaOH によつて10秒以内に99.99%、30秒以内に完全に不活化されることを報告した。更に、この NaOH による不活化を調べる一方法として、NaOH で B-1 ファージを処理し、電顕で観察すると、完全な形態のファージのみならず tail の形態も全く認められないという結果が得られている(未発表)。

本実験は、この B-1 ファージのアルカリによる不活化現象と抗酸菌の抗アルカリ性とを利用して、ファージと宿主菌を混合した後、経時的にアルカリ処理を行ない、感染中心数を調べることにより、ファージと菌を混合してから感染が成立するまでの時間を測定しようとしたものである。

ファージの宿主菌への感染の第1段階は吸着であり、第2段階は核酸の侵入である。今回の実験方法では、前述のように、ファージの tail 部分が完全に破壊されるために、核酸注入前の吸着段階のファージも失活するので、測定された時間は、ファージと菌を混合したのち菌体内に侵入した核酸が NaOH の影響を受けなくなるまでの時間、すなわちファージの吸着およびそれに続くファージ核酸の侵入という二つの step に要する時間を測定したものである。

実験の結果、使用したいずれの抗酸菌においても、ファージ核酸の菌体内侵入は最も速いもので、ファージと菌の混合後30秒以内に完了したことを示唆している。また出現ブラック数は菌によつて異なるが、菌とファージ混合後約5~10分まで、対数的な増加を示し、以後ほぼ一定の値を示した。これは集団としてみたファージの菌への感染の完了を示すものと考えられる。すなわち今回の実験条件では、使用した抗酸菌への B-1 ファージの感染の最も速いものは30秒以内に完了し、遅いものでも約10分で完了した。

抗酸菌ファージの吸着に関する研究において、川原⁵⁾は *M. jucho* と B-1 ファージが接触後15分でファージの92%が、Morrellini ら⁶⁾はファージ D-28 と *M. lacticola* McLaren の系において最初の40秒でファージの98.5%が吸着することを報告した。また White ら⁷⁾は、ファージ D-29 抗酸菌607株系において30分後ファージの62%が減少したことを記載している。今回の実験で得られた値は、上述のように菌とファージを混合してから感染が成立するまでの時間を示すものであり、また実験方法も異なるので彼らが報告した吸着時間とかなりの差が見られるのは当然であろう。

われわれの用いた実験方法は抗酸菌の抗アルカリ性という特性を利用した極めて reasonable なものであり、

抗酸菌-抗酸菌フェージ系の関係を明らかにするうえで従来の実験方法に比較して新しい有効な方法であると思われる。

この実験では宿主菌として発育速度の異なる *M. smegmatis*, 非定型抗酸菌5株および *M. tuberculosis* H₃₇Ra が使用された。これらの菌は、既報¹⁾のように、B-1 フェージ感染において *M. smegmatis* で1時間、非定型抗酸菌で2~2.5時間、H₃₇Ra で約3時間とそれぞれ異なる溶菌時間を示すものである。今回の実験で、これらの抗酸菌すべてにおいて、B-1 フェージ感染成立の時間がほぼ同じであることが明らかになったが、このことから、これらの菌でみられた溶菌時間の差は、感染以後のB-1 フェージ合成に関する代謝系の速度の差、または溶菌に関する時間の差によるものと思われる。

結 論

抗酸菌の抗アルカリ性と抗酸菌フェージの NaOH による不活化を利用することにより、抗酸菌フェージ B-1 株の *M. smegmatis*, 非定型抗酸菌 P-17, P-18, P-22, P-40, P-44 およびヒト型結核菌 H₃₇Ra 計7株の異なる溶菌時間を有する抗酸菌への感染(吸着-侵入)時間を測定し、次の結果を得た。

1) 感染は、使用した7株すべての抗酸菌において、最も速い場合30秒以内に完了した。

2) 感染菌の数は対数的に増加し、5~10分で最高値を示した。

以上の結果から、これらの菌における溶菌時間の差は吸着-侵入後の時間差によるものと思われる。

稿を終わるに臨み、ご指導、ご校閲を頂いた中村教授(久留米大学医学部微生物学教室)に心から感謝いたします。また、ご助言を頂いた松下教授(福岡歯科大学微生物学教室)に感謝します。

文 献

- 1) 萩原義郷・瀬川二郎・浜田良英: 医学と生物学, 89: 423, 1974.
- 2) 武谷健二: 福岡医学雑誌, 54: 1061, 1963.
- 3) Hagihara, Y., Segawa, J. and Hamada, Y.: 福歯大誌, 3: 249, 1976.
- 4) 徳永徹・水口康雄・丸山米夫・室橋豊穂: 日本細菌学雑誌, 17: 723, 1962.
- 5) 川原弘: 日本細菌学雑誌, 17: 839, 1962.
- 6) Morellini, M., Felicetti, L. and Miggiano, V. C.: Ann. Inst. C. Forlonini, 22: 420, 1960.
- 7) White, A. and Knight, V.: Amer. Rev. Tuberc., 77: 134, 1958.
- 8) Bowman, B. V., Jr.: J. Bacteriol., 76: 52, 1958.
- 9) Redmond, W. B. and Ward, D. M.: Bull. World. Hlth. Org., 35: 563, 1966.