

## 大腸菌 Phage に於ける溶菌と Phage 増加との関係について

千葉大学医学部衛生学教室(主任 谷川教授)

川 島 八 成      田 波 潤 一 郎  
HASSEI KAWASHIMA      JUN-ICHIRO TANAMI

## 緒      論

Phage 増加の最終段階が溶菌であることは言うまでもないが、Phage-hostcell 系内に於ける Phage の増加と溶菌とは必ずしも同一機序によるものではない。このことは Proflavine による bacterio phage 増加阻害作用に関する Foster<sup>(1)</sup> の実験に於ても Phage 増加のない溶菌を認めている。著者等は溶菌と Phage 増加との関連性を知るため、1-HCl-Cysteine<sup>(2)</sup> によつて溶菌阻害を受けつつある Phage-大腸菌系に、KCN<sup>(3)</sup>、Penicillin G<sup>(4)</sup>、Penicillin 及び Hyaluronidase の混合剤を添加して溶菌速度を早やめ、溶菌現象と活性 Phage 数増加との関係を検した。この際 Hyaluronidase の Phage 増加に対する特種の作用を認めた。本研究は一般動物性ウィルス増殖に対する抗生剤及び化学療法剤と Hyaluronidase との関係に示唆を与えるものと思う。

## 実 験 方 法

1. 培養は  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ... 0.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ... 0.1 g,  $\text{NaCl}$  ... 0.1 g,  $\text{MgSO}_4$  ... 0.1 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ... 6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ... 3 g, Glucose ... 4 g, 溜水 ... 1000 ml の組成を有する合成培地(以下 SM 8 と称す)を使用した。添加すべき薬物中 KCN, 1-HCl-Cysteine は溜水溶液とし石綿濾過を行い、その 0.5 ml を試験培養管に加えて前者は  $\frac{M}{100}$ /ml 後者は 20 r/ml となる様に SM 8 培地を用ひて希釈した。Penicillin G は結晶のものを SM 8 培地を用ひて溶解し、その 0.5 ml を試験培養管に加えて 50 U/ml となる様に希釈した。Hyaluronidase<sup>(5)</sup> は持田製薬学術課提供の Testilar extracts を使用した。濃度は粉末を試験培養管に投入溶解し 200 V. R. U./ml<sup>(5)</sup> の条件とした。

2. 宿主菌は Escherichia Coli F<sub>6</sub>, Phage は T<sub>6g</sub><sup>(6)</sup> を用ひ、F<sub>6</sub> 株を上記組成の SM 8 培地寒天斜面に累代培養し、実験時 37°C 10 時間前培養の新しい斜面培養菌を使用した。Phage は SM 8 に発育中の F<sub>6</sub> 菌に Phage 液を添加し、この溶菌液の一部を再び合成培地発育中の F<sub>6</sub> 菌に添加し、この操作を 10 代以上繰返したものの無菌濾液を用いた。培養は全て 37°C 160 rPm 振盪培養を行った。

3. 総菌数及び溶菌曲線の観察には光電管濁濁計<sup>(8)</sup>を使用した。

Plaque count 及び One Step Growth Experiment は Delbrück, Luria, Adamus 氏等の方法に準じて行い、一部培養中の Phage-host 混合管より一定時間毎にその 0.5 ml を取り出し、希釈後 Plaque count を行つた。

## 実 験 成 績

1. F<sub>6</sub> 菌並に Phage T<sub>6g</sub> に対する薬物の作用合成培地 SM 8 中に於ける Cysteine の作用に関しては先に報告<sup>(7)</sup>したが、特に Cysteine による free phage の不活化及び Phage の host cell への吸着阻害は認められなかつた。50 U/ml の Penicillin G は free phage を不活化せず、且つ Phage と同時に混合した場合は吸着阻害を示さなかつた。Hyaluronidase が Phage の Host cell への吸着を早やめるか、又は Phage の侵入を容易ならしめるかの点に関して、Phage と同時に 200 V. R. U./ml の量を加えて 5 分後の free phage 数を混合液遠心上清について検したが対照と比較して大差を認めず 90~94% 吸着の成績を示した。又 One Step Growth Experiment の結果も Hyaluronidase の特殊な作用を示さなかつた (Fig. 1)。

2. 1-HCl-Cysteine 阻害 phage-host cell 系の KCN による溶菌

発育中の F<sub>6</sub> 菌  $10^8$ /ml に phage T<sub>6g</sub>  $1.5 \times 10^8$ /ml と同時に 1-HCl-Cysteine 20 r/ml を加え、5

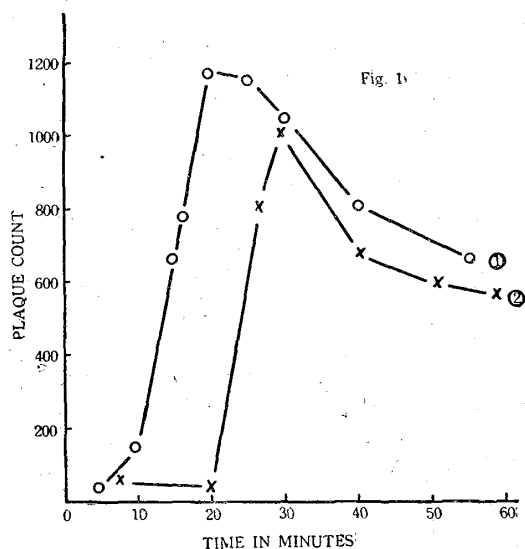


Fig. 1. When mixture tube of phage-hostcells and 20  $\gamma$ /ml l-cysteine was cultured in succession, and each 0.5 ml of this tube was taken up at adequate times, and put into the medium containing M/100/ml KCN and 20  $\gamma$ /ml l-cysteine, the multiplication of phage particles in phage infected hostcells was demonstrated as ①, ② showing the control one step growth experiment. Details in Text.

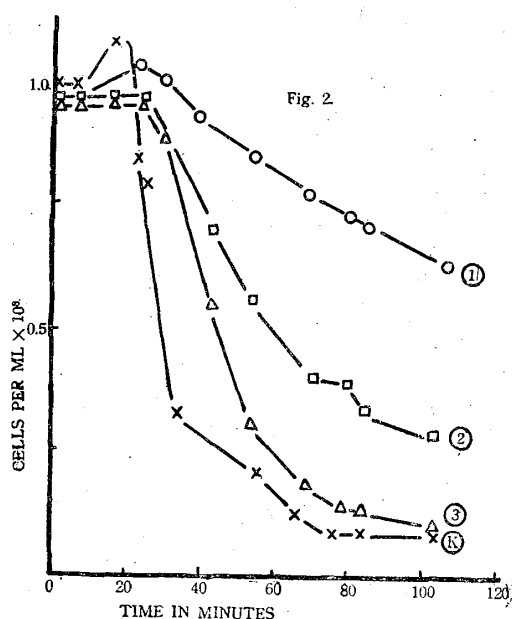


Fig. 2. The effect of 20  $\gamma$ /ml l-cysteine, 50 U/ml penicillin G and 200 V.R.U./ml hyaluronidase on the lysis curve of phage T<sub>6g</sub> infected coli F<sub>6</sub>. Drugs and phage were added to the hostcells simultaneously.

- ①: l-cysteine
- ②: l-cysteine + penicillin G
- ③: l-cysteine + penicillin G + hyaluronidase
- ④: control

分, 10分, 15分, 20分, 25分, 30分, 40分及び50分後に夫々混合管の0.5 mlを取り出し $10^{-3}$ に稀釈された状態になる様に KCN  $\frac{M}{100}$ /ml 及び 1-HCl-Cysteine 20  $\gamma$ /ml を含む SM 8 培地中に混合し, 各々 37°C, 20分を経過した後に再び $10^{-3}$ に SM 8 培地を用いて稀釈し Plaque count を行つた。その成績は Fig. 1 ①の曲線にて示す如くであり, 10分にして Plaque 数増加し, 20分にして最高値に達しその後減少を認めた。

Fig. 1 ②には 1-HCl-Cysteine 及び KCN を含まない SM 8 のみによる One Step Growth Experiment の成績を参考として示したが KCN 溶菌の場合の方が早期に Plaque 数増加し, burst size も大となつて現はれた。この原因は明かではないが, とにかく 1-HCl-Cysteine 阻害中の Phage-host cell 系内に於ては phage 増加があり, KCN によつて溶菌することにより活性 Phage が放出されることは明らかである<sup>(2)</sup> (Fig. 2)。

3. 実験2と同様の方法により Phage-host cell の混合管を作り, Phage と同時に 20  $\gamma$ /ml の 1-HCl-Cysteine を加え混合管の濁濁度変化を追跡すると ①の曲線を得る。既に23分頃より徐々に溶菌を認めた。

Phage-host cell 及び 20  $\gamma$ /ml 1-HCl-Cysteine 混合管に Phage と同時に Penicillin G 50 U/ml を添加すると ②に示した曲線の如く25分前後より ①よりも急激な溶菌を示した。

Phage-host cell 及び 20  $\gamma$ /ml 1-HCl-Cysteine 混合管に Phage と同時に Penicillin G 50 U/ml 及び Hyaluronidase 200 V.R.U./ml を添加すると ③の曲線の如く25分前後に ②よりも急激な溶菌を起してくることが認められた。曲線④は薬物添加の全くない対照溶菌曲線であり Phage 混合後18分乃至19分にして上述の何れの場合よりも急激な溶菌を起した。尙表示しなかつたが Phage 混合後7分後に $\frac{M}{100}$ /ml の KCN を添加した場合の溶菌曲線は約9分にして対照と同速度の溶菌を起した。

#### 4. 実験3に近似した実験を One Step Growth Experiment で行つた場合

前実験と同条件を以て Phage-host cell 混合管を作り Phage と同時に薬物を添加し, 混合7分後に稀釈し, 稀釈最終試験管は最初に混合した薬物を同量だけ含有する SM 8 培地として One Step Growth Experiment を行つたものである。

①は添加薬物として 1-HCl-Cysteine 20  $\gamma$ /ml

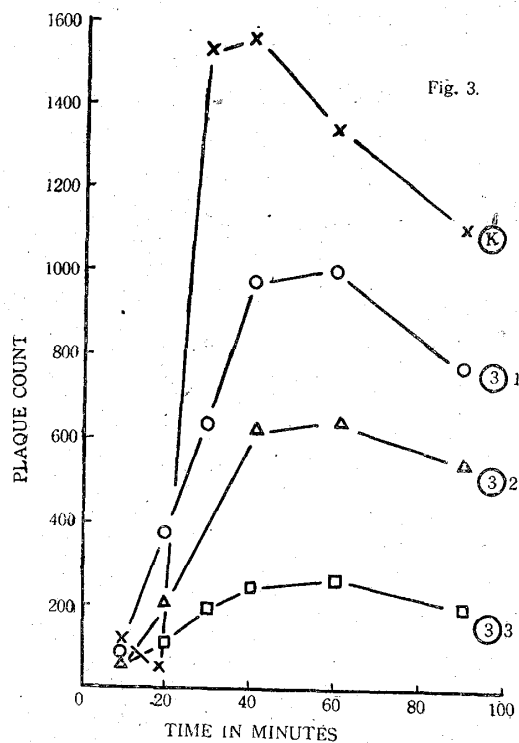


Fig. 3. The effect of 20  $\gamma$ /ml l-cysteine, 50 U/ml penicillin G and 200 V.R.U. ml hyaluronidase on the one step growth experiments of phage T<sub>6g</sub> infected coli F<sub>6</sub>. Drugs and phage were added to the hostcells simultaneously.

- ③1: l-cysteine + penicillin G + hyaluronidase, medium, pH 6.4  
 ③2: l-cysteine + penicillin G + hyaluronidase, medium pH 7.0  
 ③3: l-cysteine + penicillin G + hyaluronidase, medium pH 8.0  
 K: control one step growth experiment., medium pH 7.0

②は添加薬物として l-HCl-Cysteine 20  $\gamma$ /ml 及び Penicillin G 50 U/ml

③は添加薬物として l-HCl-Cysteine 20  $\gamma$ /ml 及び Penicillin G 50 U/ml と Hyaluronidase 200 V.R.U./ml であり混合管起始培地 pH 6.4, 7.0 及び 8.0 とし、夫々に対応する最終稀釈管培地も pH 6.4, 7.0 及び 8.0 とした3本について同時に One Step Growth Experiment を行つた。

①及び②の場合は Plaque 数の増加を認めず。

②は①よりも急激な減少を認めた。この関係を Fig. 4 ①及び②の曲線に示した。

③の場合は pH 6.4 の培地を使用した場合に最も多く Plaque 数の増加を認め pH 7.0 これに次ぎ、pH 8.0 の培地では増加が僅かであった。この関係を Fig. 3 ③の1, ③の2, ③の3に示した。曲線K

は対照の One Step Growth Experiment を示した。培地 pH の修正は組成成分である Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を変へたものを用いた。

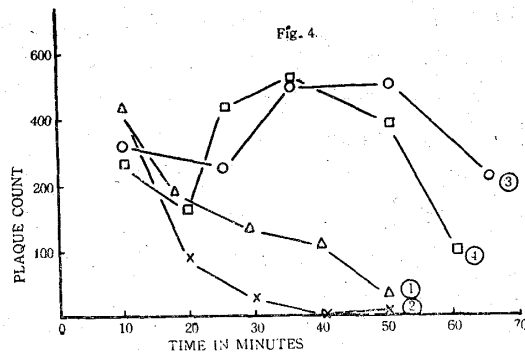


Fig. 4. The effect of 20  $\gamma$ /ml l-cysteine and 50 U/ml penicillin G on the one step growth experiments of phage T<sub>6g</sub> infected coli F<sub>6</sub>.

- ① and ③: l-cysteine  
 ② and ④: l-cysteine + penicillin G  
 ①③ and ②④ were practiced in different way. Detail in Text.

#### 5. 混合管の時間的 Plaque count

One Step Growth Experiment の場合は混合管の細菌数が 10<sup>2</sup>/ml 程度に稀釈され、同時に Phage 添加前約 1 時間の F<sub>6</sub> 菌発育による培地条件の変化も殆んど除かれる。溶菌曲線観察の場合は混合管の培養条件は Phage-host cell 数は不変であり、培地条件は殆んどそのまま持続されるから l-HCl-Cysteine の濃度は次第に減少する。この点を確認するために次の実験を行つた。

発育中の F<sub>6</sub> 菌 10<sup>8</sup>/ml に Phage T<sub>6g</sub> 1.5×10<sup>8</sup>/ml を混合し、同時に ③は 20  $\gamma$ /ml l-HCl-Cysteine, ④は 20  $\gamma$ /ml l-HCl-Cysteine 及び 50 U/ml Penicillin G を混合し、夫々の混合管より各時間毎にその 0.5 ml をとつて急速に SM 8 培地をもつて稀釈し、Plaque count を行つた。稀釈に時間がかかると稀釈による burst 回復現象が現はれてくる。③及び④の成績を Fig. 4. ③及び④の曲線に示した。この曲線は前述実験 4 の ①及び②の曲線と比較して軽度の Plaque 数増加を示しているが、これは l-HCl-Cysteine の濃度低下に依るものであらうと考えられる。

#### 考 察

この実験に於ては Phage-host cell 系の burst-size を正確に把握することが難しい。その理由は第一に SM 8 培地が free phage を徐々に不活化すること、第二に 20  $\gamma$ /ml の l-HCl-Cysteine が徐々に Phage-host cell 系を不活化することに

よる。しかし著明な burst があれば大なる Plaque 数の増加を認め得るものである。こゝで burst-size と称したのは Phage-host cell 混合時最初の Phage 数計算値の何倍にまで最高値が達したかを指したものである。対照に於ては burst-size は 20 前後であり、KCN 溶菌によるものは 23 であつた。又 pH 6.4 の場合 Penicillin G と Hyaluronidase との混合作用を与へたものは 12 であつた。

20  $\gamma$ /ml の 1-HCl-Cysteine が T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系に与へる Phage 増加阻止作用は burst の阻止であつて、一部 T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系の殺滅を伴う溶菌を示し、これに Penicillin G の溶菌作用が加はつて溶菌速度を増しても Phage 数の増加は現はれない。即ち burst せずに T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系の殺滅が速くなるだけである。Penicillin G と Hyaluronidase の協同作用は更に Phage-host cell の溶菌速度をはやめ、こゝに始めて burst を認め得る Plaque 数の増加が起る。この burst は培地 pH が酸性側に傾くにつれて大となる。Hyaluronidase の組成及び作用機序が明らかでないから、どの作用が Phage 増加に関与するかを知ることは出来ないが、Phage-host cell 系に

対する溶菌促進の因子をもつことが知られる。

恐らく Phage 放出の最終段階は特殊な酵素的機転によるもので KCN の作用はこの酵素系に作用することが出来るが、Penicillin G はこの酵素系に作用することが出来ない。しかし Penicillin G と Hyaluronidase の作用はこの酵素系に作用し得るものであると考えられる。

こゝに興味ある問題は Phage を放出しない別途の溶菌が存在することである。この場合 Phage-host cell 系 1 個当りの burst-size が極めて少くなるのか、1 個当りの burst size は不変であるが Phage-host cell 系の殺滅により Average burst-size が極めて小さく現はれるものであるかの問題がある。

1-HCl-Cysteine による溶菌並に 1-HCl-Cysteine と Penicillin G との協同作用による溶菌との際は明らかに後者によるものであることが、Phage-host cell 系に夫々の薬物を加え、SM8 培地をもつて高度に稀釈し single-burst を行つてみることによつて知られたが、その詳細は別に報告する。

## 総 括

合成培地発育中の Phage-host cell 系に諸種の薬物を添加し、溶菌現象と Phage 増加との関係を検討した。実験結果を総括すると次の如くであり、これ等の所見より Phage 増加の最終段階である溶菌は条件によつて Phage 増加を伴わない溶菌を起し得ることが知られた。

1) 大腸菌 F<sub>6</sub> とその Phage T<sub>6g</sub> は 20  $\gamma$ /ml の 1-HCl-Cysteine によつて Phage 増加を強く抑制され、徐々に溶菌を起し、Phage-host cell 系の殺滅を受けるが、残存の Phage-host cell 系は Phage 混合 10 分以後に  $\frac{M}{100}$ /ml KCN を添加することによつて Phage を放出した。

2) 同上の 1-HCl-Cysteine によつて Phage 増加抑制を受けつゝある T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系は 50 U/ml の Penicillin G 添加によつて溶菌速度は増加されたが Phage 増加は認められなかつた。

3) 同上の 1-HCl-Cysteine によつて Phage 増加抑制を受けつゝある T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系に 50 U/ml の Penicillin G 及び 200 V.R.U./ml の Hyaluronidase が添加されれば Penicillin G のみの添加の場合よりも溶菌速度が大となり、Phage の増加を認めた。

この際培地 pH が 6.4 の場合が pH 7.0 及び pH 8.0 の場合よりも burst-size が大であつた。

Hyaluronidase は 1-HCl-Cysteine により溶菌阻害を受けつゝある T<sub>6g</sub> F<sub>6</sub> 系に対し、Penicillin 溶菌促進的な作用を示し、その結果 Phage-host cell 系の burst が起つたものと考えられるが、その作用の本質は明かでない。

終始御懇篤なる御指導と御稿閲を給われました谷川教授に深謝致します。尙特別に Hyaluronidase を精製し分与下された持田製薬株式会社に対し深甚の謝意を表します。

## 文 献

1. Foster, R. A. C.: An analysis of the action of proflavine on bacteriophage growth; J. Bact., 56, 795-809, 1948.
  2. Spizizen, J., Hampil, B. & Kenney, J. C.: Biochemical studies on the phenomenon of virus reproduction. IV. The inhibition of coliphage T<sub>2</sub> multiplication by sulfhydryl compounds and its prevention by ethylenediaminetetraacetic acid and metallic ions, J. Bact., 62 (3), 331-336, 1951.
  3. Deermann, A. H.: The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T<sub>4</sub> by premature lysis with another phage or with cyanide; J. Gen. Physiol. 35, 4, 645-656, 1952.
  4. Price, W. H.: Bacteriophage formation without bacterial growth. I. Formation of staphylococcus phage in the presence of bacteria inhibit by penicillin, J. Gen. Physiol., 31, 119-126, 1947.
  5. 相沢・小川: ヒアルロニダーゼ検定法, 昭和26年度(1951)日本薬学会総会講演.
  6. Sevag, M. G.: Immuno-Catalysis, second edition, 231-249, 1951.
  7. 田波潤一郎・川島八成: 大腸菌 Phage 増殖に対する L-Cysteine hydrochloride と L-Glutamic acid との関係, ウィルス, 3, 2, 129-138, 1953.
  8. 田波潤一郎・神山一郎・川島八成: 細菌学血清学領域に利用し得る精密光電管濁濁計の作り方及びその応用, 日本衛生学雑誌, 7, 3及4, 183-186, 1953.
-