

## 河川水由来ファージについて

内村 真佐子 小岩井 健司 三瓶 憲一 春日 邦子

## Bacteriophages in River Water

Masako UCHIMURA, Kenji KOIWAI, Kenichi SANBE and Kuniko KASUGA

## I はじめに

著者らは、1978年5月から1980年3月の間、東京湾に流入する数河川のコレラ菌による汚染状況について調査した。その結果、2河川からエルトルコレラ菌を分離した<sup>1)</sup>。この期間中に、コレラ菌H218株を指示菌とした際、透明な溶菌斑を形成するファージ様物質がしばしば分離された。そこで、これらのファージ様物質のうち代表的な2種について、エルトル型コレラ菌が産生するkappa型ファージを対照として、その免疫学的性状及び電子顕微鏡像の比較検討を行ったので、その結果について報告する。

## II 材料及び方法

1) 菌株；ファージ検査の指示菌として、コレラ菌H218sm<sup>F</sup>株を用いた。kappa型ファージ供与菌として、コレラ菌C5株を用いた。ファージ宿主域検索に用いたコレラ菌33株のうち、アジア型コレラ菌7株及びエルトルコレラ菌8株は、防衛医科大・神中博士より分与された菌株であり、残りのエルトルコレラ菌18株及びNAGビブリオ30株は、当研究所保存株である。なお菌の培養には、HIブロス(栄研化学k.k)及びペプトン水(1%ペプトン, 1%NaCl pH7.2)を用いた。

2) ファージの分離；河川水270mlに、10培濃厚ペプトン水30ml及びH218sm<sup>F</sup>株1夜培養液30mlを加え、ストレプトマイシンを最終濃度300 $\mu$ g/mlになるように添加した後、37°Cで1夜培養した。この培養液の数mlを試験管に移し、クロロホルムを滴下し十分振とうの後、3500~4000rpm30分間遠心した上清について、スポット法でファージ検出<sup>2)</sup>を行った。

3) 中和試験；抗Kappa型ファージ血清によるファージの中和は、梨本らのファージ実験法<sup>3)</sup>に準拠して行った。20倍及び200倍に希釈した抗血清0.9mlに、10<sup>7</sup>PFU/mlに調整したファージ液を0.1ml加え、37°C温浴中に静置し、

5分後ファージ数を測定した。なお、抗Kappa型ファージ家兎血清は、都立衛生研究所・大橋博士より分与された。

4) 電子顕微鏡の観察；約10 PFU/mlのファージ液を、1%酢酸ウラン液でネガティブ染色した後、100S透過型電子顕微鏡(日本電子社)を用いて観察及び写真撮影を行った。

## III 結果

## 1. ファージ様粒子の形態

河川水から分離された2種のファージ様粒子(これらの粒子をcu-1及びcu-2と命名する。)は、コレラ菌H218sm<sup>F</sup>株を指示菌とした時、いずれも透明な溶菌斑を形成した。電子顕微鏡で観察を行ったところ、cu-1・cu-2共にT偶数ファージに類似した形状を示し、六角形の頭部とそれに続く細長い尾を有していた(図1B, 1C)。cu-1の頭部は約60nm、尾の長さは110nm、中が22nmあり、収縮性尾鞘を有することがわかった。またcu-1は、大きさ及び形状がKappa形ファージ(図1A)に類似していた。一方cu-2は、頭部が110~133nm、尾の長さは270nm、中は27nmで、図1に示すように他の粒子に比べ大形であった(図1C)。図1Dは、アジア型コレラ菌に対してのみ溶菌作用を有するファージIVである。

## 2. 免疫学的性状

抗Kappa型ファージ血清を用いて、cu-1及びcu-2の中和試験を行った。5分後の粒子数の変化を図2に示す。Kappa型ファージ粒子数は、20倍血清添加により減少したが(P<0.05)、200倍血清添加では変化は認められなかった。一方、cu-1及びcu-2は、抗Kappa型血清によって阻害されず、むしろcu-1においては、20倍血清添加により粒子数の増加が観察された。

## 3. 宿主域

エルトルコレラ菌は、Kappa型ファージの産生性及び感受性により、3種類のプロファージ型に型別されている<sup>4)</sup>。今回、我々が分離したcu-1及びcu-2は、Kappa型ファージに感受性を有する“cured”型のエルトル型コレラ菌に対し毒性を有した。セレベス型及びウーボン

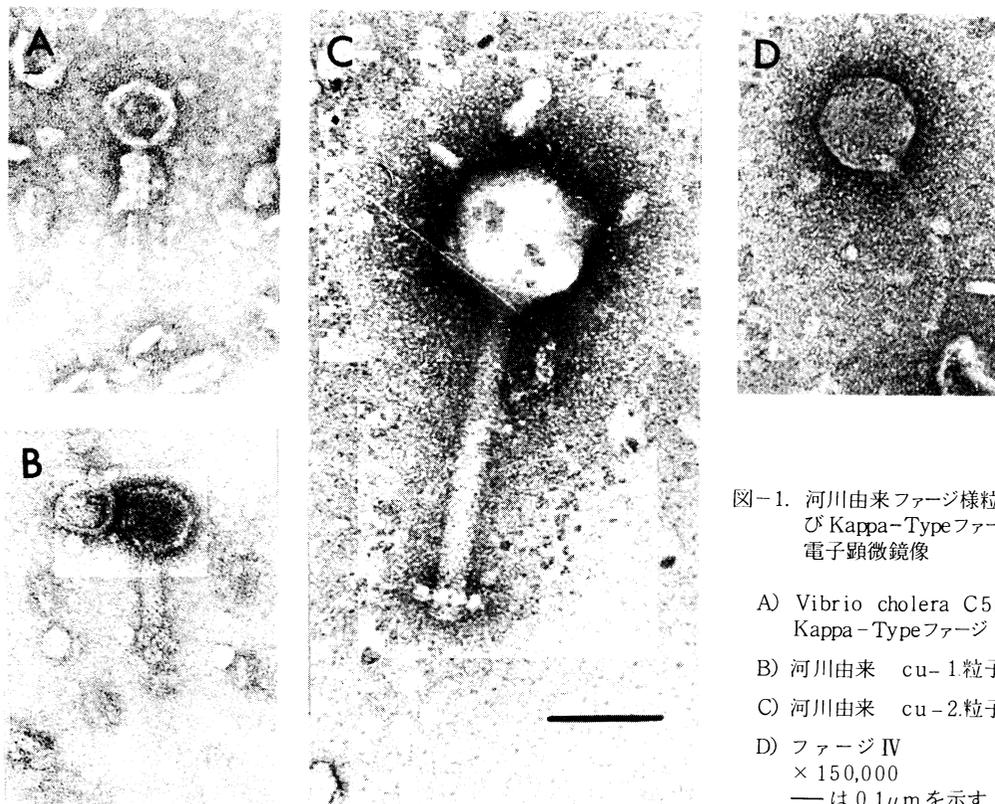


図-1. 河川由来ファージ様粒子及び Kappa-Typeファージの電子顕微鏡像

- A) *Vibrio cholera* C5由来 Kappa-Typeファージ
- B) 河川由来 cu-1粒子
- C) 河川由来 cu-2粒子
- D) ファージ IV  
× 150,000  
— は 0.1 $\mu$ mを示す

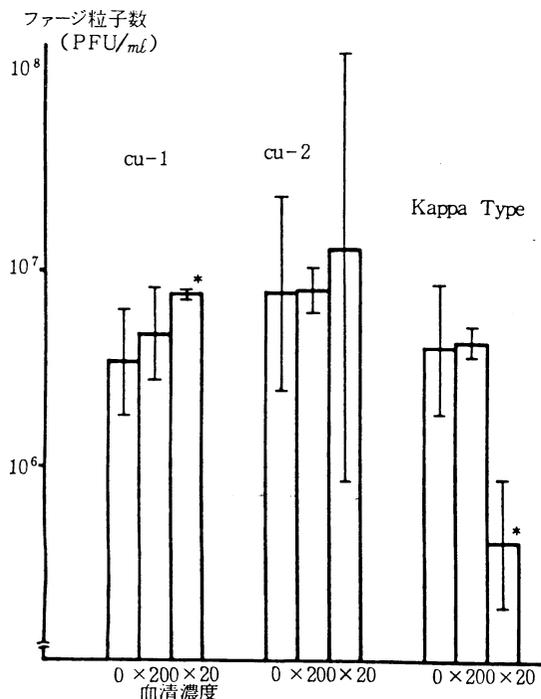


図 1. 抗 Kappa-Type ファージウサギ抗血清によるcu-1, cu-2ファージの中和 (平均値の差の検定は, t-検定で行なった)

型エルトールコレラ菌, アジア型コレラ菌に対する溶菌作用は観察されなかった。更に, 供試した30株のNAGビブリオにおいても, cu-1及びcu-2に感受性は認められなかった。

#### IV 考察

バクテリオファージは, 細菌学の分野で広く用いられている。特に分類学への応用は古くから行われ, 腸チフスにおいてはプロファージ型が疫学上重要な情報を提供している。コレラ菌においても, ファージIVは生物型別の一手段として用いられ, Kappa型ファージはエルトール菌のプロファージ型別に用いられている。

今回著者らが検討を行ったcu-1及びcu-2粒子は, Kappa型ファージと同じ宿主域を有するため, コレラ菌の分類手段としての利用価値はないことがわかった。しかし, Kappa型ファージと宿主域が同じであるにもかかわらず, 免疫学的性状及び外形が異なることは, ファージの同定に際し, 中和試験及び形態観察の重要性を示唆するものである。

近年, Torellaらは, 海水より分離したファージにつ

いて、その形態学的な検討を行っている<sup>5)</sup>。さらにこの研究グループは、海洋動物からファージを分離し、海水性ビブリオとの生態学的な関連について報告している。

今回の調査で、河川水中にコレラ菌に毒性を有し、Kappa型ファージとは異なった性状を示す粒子が見出された。Bavdleyはバクテリオファージに関する総説の中で、六角形の頭部と収縮性尾鞘を有する細長い尾部を具えたファージは、核酸として2重鎖DNAを持ち大腸菌、Pseudomonas, Bacillus, ブドウ球菌によって産生されることを指適している。本論で述べたcu-1及びcu-2の2種の粒子が、いかなる種類の細菌によって産生されるのか明確ではない。しかし、これらのファージ様粒子が、水中細菌の生態系に対してどのように関与しているのか興味を持たれる。その解明は今後の研究課題であろう。

#### 謝辞

稿を終るにあたり、コレラ菌株を御恵与下さった防衛医科大学校 神中寛博士ならびに、抗kappa型ファージ家兎血清を御恵与下さった都立衛生研究所 大橋誠博士に深謝致します。

#### V 文献

1) 小岩井健二, 三瓶憲一, 内村真佐子, 七山悠三:

市川市真間川及び千葉市葭川から分離されたコレラ菌について。日本感染症学雑誌, 54, 臨時増刊号, 50, 1980.

- 2) 神中 寛; カッパ型ファージ検査法, 臨床検査, 22, 529-596, 1978.
- 3) 梨本裕子, 内田久雄; ファージ実験法. 蛋白質・核酸・酵素 別冊, 細菌・ファージ遺伝実験法, 226-244, 1972.
- 4) 霜島翔一; コレラの細菌学的研究, 第1報 コレラ菌ファージに関する研究, 医学研究, 37, 553-572, 1967
- 5) Torella Francisco and Richard Y. Morita: Evidence by Micrographs for a High Incidence of Bacteriophage Particles in the Waters of Yaquina Bay, Oregon: Ecological and Taxonomical Implications. Appl. Environ. Microbiol., 37, 774-778, 1979.
- 6) Baross A. John, John Liston, Richard Morita: Incidence of Vibrio parahemolyticus Bacteriophages and Other Vibrio Bacteriophages in Marine Samples. Appl. Environ. Microbiol., 36, 492-499, 1978
- 7) Bradley E. David: Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31, 230-314, 1967.