

海洋バクテリオファージの細菌濾過膜通過による損失

日 高 富 男・一 田 謙 一*

On the Undesirable Effects of Filtration through Membrane Filter on Some Marine Bacteriophages

Tomio HIDAHA and Ken-ichi ICHIDA*

Abstract

In the experiments of bacteriophage, firstly, it is necessary to remove completely the large numbers of bacteria present in the samples or the phage-lysates without affecting unduly any phage which may have been present. Sterilization of them by filtration through membrane filters (average pore diameter, 0.45μ) is most commonly used for this purpose. The authors observed the following undesirable effects of filtration through membrane filters on some marine bacteriophages.

1) The phage particles stuck to the membrane and considerable or even complete loss of phage may occur, particularly if titers are low.

2) The marine phages are inactivated by a very small amount of surface active agents contained in a membrane filter. The surfactants act differently on different phages. These undesirable effects are avoided by prewashing membrane filters with sea water broth.

バクテリオファージ (Bacteriophage) 試料の調製やファージ・ライゼイト (Phage-lysate) の作成にあたって、それらに混在する細菌細胞は、ファージ活性に影響をおよぼさない方法で、完全に除かれねばならない。それにはふつう濾過除菌法が用いられるが、時には簡単に加熱処理やクロロホルム処理がなされることもある¹⁾²⁾。ファージのなかには加熱処理やクロロホルム処理によって失活するものがあるので、事前にその点の検討が必要である。一般に海洋ファージには、かかる処理によって失活するような不安定なものが多い⁴⁾。従って、海水や海底泥などのファージ試料の無菌化には濾過除菌法が無難である。しかし、それにおいても濾過材によってはファージ粒子が吸着されることがある²⁾⁷⁾。さきに海洋ファージの分離に際し、著者らは Millipore filter (HA) による濾過で試料の無菌化を行なった³⁾⁵⁾。その際、細菌濾過膜の膜面にすらファージ粒子が吸着される現象や、また濾過膜の製品の違いによって、濾過されたファージ液中のファージ粒子の安定度に差異が現れることを観察した。それらの原因や、その防止法などについて検討したので、その知見を報告する。

実験材料および方法

供試海洋ファージ 前報³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾ で分離し、性状を調査した海洋ファージのうち、最も不安定なファージ、06 N-58 P を実験に供した。時に応じ、対照として他の分離ファージをも供試比較した。06 N-58 ファージ系は、九州南方海域から分離された海洋ファージ系である。この系の宿主菌は、

* 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

海洋性 *Pseudomonad* であって、ファージ粒子の形態は、外観六角形の頭部に短かい円錐状の尾部をもつ形である。このファージは、加熱処理やクロロホルム処理に対して極端な不安定性を示す。その他の諸性状については前報³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾に詳述してある。なお供試海洋ファージは、海水培地で増強し、遠心沈澱後その上清を濾過除菌したものを適宜海水培地で希釈して実験に供した。

ファージ実験法 供試海洋ファージの増強やライゼイトの作成、およびファージ定量法は、前報³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾で記述した方法に従った。

供試細菌濾過膜 細菌濾過膜は、Millipore filter (種類, HA WP 047 00; 平均孔径, 0.45μ ; 直径, 47 mm; 以下 HA と略記する) と Toyo membrane filter (種類, TM-2; 平均孔径, 0.45μ ; 直径, 47 mm; 以下 TM-2 と略記する) を使用した。

実験結果および考察

1. 供試海洋ファージの細菌濾過膜への吸着とその予防

海水試料を濾過除菌する際、試料中のファージ粒子が濾過膜面に吸着されることに気づいた。よって供試海洋ファージ, 06N-58P の希薄ファージ液 (100 pfu/ml) を HA で濾過し、濾液を濾出した順に 5 ml ずつに分画して、各分画液についてファージ数を測定した。その結果は Fig. 1 に示すごとくである。HA を通過したファージ液の最初の 5 ml では、原液のファージ粒子 100 pfu/ml のうち 30 pfu/ml が濾過膜を通過し、残りの 70 pfu/ml は膜面に吸着される結果であった。

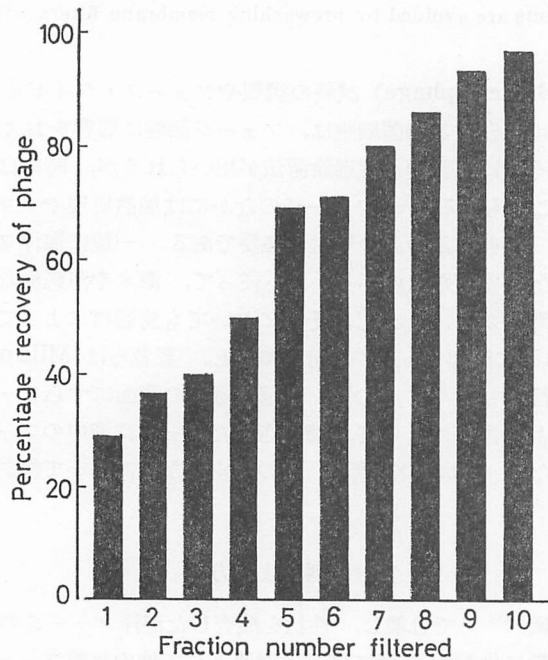


Fig. 1. Effect of volume filtered on the percentage recovery in the filtrate of 06N-58P suspended in sea water broth and filtered through Millipore filter (HA). Fractions of 5 ml were collected.

しかし、膜を通過する液量が増すに従って単位量当り吸着されるファージ数は次第に減少し、50 ml 以上を通過した後の濾液では原液とほぼ同じファージ力価を示した。高濃度ファージ液 (10^8 pfu/ml) について同様の実験をした結果では、原液および各濾液分画物の間でファージ数に実験誤差範囲以上の有意の差は見出し得なかった。これらのことから、細菌濾過膜のファージ粒子吸着量には限度があって、ファージ濃度が高い試料では吸着による損失は無視出来るが、海水試料のようにファージ数の少ないものでは、その損失率が大きいことが知られた。また、ファージ粒子は濾過初期に多く吸着され、ファージ液が 50 ml 以上も通過した後の膜面はファージ粒子を吸着しなくなり、その後の濾液においてファージ粒子の損失は見られなかった。この細菌濾過膜によるファージ粒子吸着は、膜材の静電気帯電に伴って起こる電気的引力によるものであると考えられ、その荷電が中和されるに従いその力を失っていくものと思われる。よって、この吸着を防止するには、予め膜面をファージ粒子懸濁媒である海水培地 50 ml 以上を通して洗い、膜面の荷電を中和する必要がある。かかる洗浄した膜面で試料を濾すことによって、Table 1 に示されるように、ファージ粒子の膜面への吸着による損失はほぼ完全に防ぎうることがわかった。

Table 1. Difference in phage titers in the filtrates of 06N-58P suspension (10 ml) filtered through a intact Millipore filter (HA) and a prewashed Millipore filter (HA) with 50 ml of sea water broth.

Control (no filtration)	Phage titer (pfu/ml)	
	Filtrate through	
	Intact HA	Prewashed HA
1000	470	930

2. 細菌濾過膜通過による供試海洋ファージ安定性の変化

不安定な海洋ファージ、06N-58P、のライゼイトを、細菌濾過膜を通して無菌化し低温で保存する場合、そのライゼイトは次第に失活していく⁶⁾。その失活の割合が、無菌化に使用した細菌濾過膜の製品の差異によって相違することを知った。その現象を、培養直後の供試ファージ・ライゼイト (100 ml) を折半し、一方を HA で、他方を TM-2 で濾過して無菌化し、5~8°C で保存して経時的にそれらのファージ数を測定する方法で追試した。また HA で濾過された分については、貯蔵3日後その一部を更に TM-2 で濾過し、あわせて経時的にファージ数を測定した。それらの結果は Fig. 2 に示した。Fig. 2 から明らかなように、供試ファージ・ライゼイトを HA または TM-2 で濾過した場合、濾過直後両濾液のファージ数に差がないことから、両細菌濾過膜のファージ粒子吸着量には差がないものと考えられる。一方、貯蔵経過による両ファージ液の失活程度には明らかな差がみられ、HA で濾過したものに比し、TM-2 で濾過したものの方がはるかに失活が速い。HA で濾過し3日後更に TM-2 で濾過したものも、TM-2 を通過後その濾液の失活は急速に進んだ。これらのことから、TM-2 で濾過したファージ液のファージ失活が速いことは、TM-2 に含まれる何らかの物質がファージの失活を惹起するためであろうと考えた。

上述の現象を確認する意味で、更に次の実験を行なった。海水培地 5 ml を HA と TM-2 でそれぞれ濾過し、それら濾液に 1/10 量の 06N-58P 液を加えて 8°C に放置し、経時的にファージ数を測定した。その結果は Table 2 の如くであり、供試ファージは TM-2 を通過しないまでも、TM-2 を通した海水培地を加えることによって速かに失活した。また、海水培地を TM-2 で濾過し、その濾液を通過順に 10 ml ずつに分画し、それらに 1/10 量の 06N-58P ライゼイトを加えて 8°C に放置した場合、Table 3 に示されるように、各画分でファージ力価の減少が見られた。

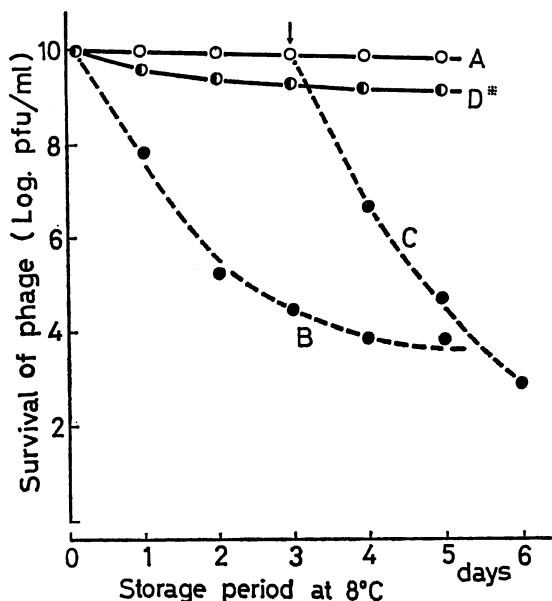


Fig. 2. Inactivation curves of 06N-58P suspension filtered through Millipore filter (HA) or Toyo membrane filter (TM-2).

A : filtered through a Millipore filter (HA)

B : filtered through a Toyo membrane filter (TM-2)

C : refiltered A through a Toyo membrane filter (TM-2) after storage for 3 days

D : filtered through a new type Toyo membrane filter (TM-2)*

Arrow indicates the time when A was refiltered.

* See Section 3, it is explained in detail there.

Table 2. Effect of suspending 06N-58P in sea water broth (5 ml) passed through a Millipore filter (HA) and Toyo membrane filter (TM-2) on the stability of the phage.

06N-58P suspended in sea water broth passed through	Phage titer (pfu/ml)			
	Storage period in hours at 8°C			
	0	8	24	48
TM-2	10^9	10^7	10^3	0
HA	10^9	10^9	10^9	10^9
Control (no passing)	10^9	10^9	10^9	10^9

しかし、TM-2 通過があとの方の分画濾液ほどファージ失活現象は弱くなり、海水培地が 50 ml も通過したあとの濾液においては、ファージへの影響はほとんど見られなくなる。これらのことは、TM-2 膜面にある物質が濾液中に溶出して、それがファージの失活を惹起するという前述の予想を裏づける結果であった。しかも、その物質の溶出は当然のことながら濾過初期の濾液に多く、海水培地を 50 ml も通せば溶出しつくすことがわかった。なお TM-2 で濾過したファージ・ライゼイトの失活が、HA 濾過のそれよりも速かであるという現象を呈するファージは多くはなく、著者らが分離した海洋ファージ数十株のうちでも数株にすぎない。そのなかで本報供試ファージ 06 N-58P は、その現象が顕著なものである。HA は TM-2 との製造法の差によりその原因物質を

Table 3. Effect of suspending 06N-58P in successive fractions of sea water broth passed through a Toyo membrane filter (TM-2) on the stability of the phage. Fractions of 10 ml were collected.

Successive fractions	Phage titer (pfu/ml)			
	Storage period in hours at 8°C			
	0	24	48	72
0 — 10ml	10 ⁸	10 ⁴	0	0
10 — 20 "	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
20 — 30 "	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
30 — 40 "	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷
40 — 50 "	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
Control (no passing)	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸

含まないか、含んでも TM-2 のそれより更に希薄なものであろう。

3. ファージ不安定化物質の検索

TM-2 の製造は、精製されたニトロセルロースと揮発性有機溶剤を主原料として使用し、濾過特性を増す目的でごく微量の界面活性剤が使われると聞く。使用される界面活性剤は、リン酸系非イオン活性剤の一種 (A) とスルホン酸系陰イオン活性剤の一種 (B) とである。前節においてファージを失活させた物質は、この薬剤であろうと考えられる。よって製造元よりそれに該当する物質の分与をうけ、それが 06N-58P やその他の分離海洋ファージにおよぼす影響を検討した。これら2つの薬剤および対照としてラウリル硫酸ナトリウム (SLS), ラウリル・ベンゼンスルホン酸ナトリウム (SLBS) およびしょ糖ラウレイト (SuL) について、これらの希釈系列を作り、それらに終濃度 10⁸ pfu/ml になるようにファージ液を加えて 8°C で1晩放置後各液のファージ数を測定した。その結果から知られた各薬剤の最少不活性濃度は Table 4 の如くである。不安定な海洋ファージ 06N-58P に対して A ではおよそ 0.01 mg/ml, B では 0.001 mg/ml, SLS では 0.1 mg/ml, SLBS では 0.1 mg/ml, SuL では 100 mg/ml でそれぞれ失活する。TM-2 の製造時に使われていた A, B は他の SLS, SLBS にまさるきびしいファージ阻害作用を有する。分離海洋ファージのうちや不安定な 06N-34P や安定な 06N-52P などについて比較すれば、それらは各自の不安定度に相応して、これら薬剤に対する感受性を示した。その後、TM-2 の製造に際し A, B の使用に代えて SuL を使用するよう改善されたが、この物質は、A, B に比して1000倍

Table 4. Minimal inactive concentration of several surface active agents to some marine bacteriophages.

Phage	Surfactant*				
	MIC (mg/ml)				
	A	B	SLS	SLBS	SuL
06N-34P	1	100	1	1	100
06N-52P	10	10	10	10	100
06N-58P	0.01	0.001	0.1	0.1	100

* A : a kind of non-ionic surfactant
 B : a kind of anionic surfactant
 SLS : Sodium Lauryl Sulfate
 SLBS : Sodium Laurylbenzenesulfonate
 SuL : Sucrose Laurate

の濃度でも供試ファージを失活させない。また、SuLを使用した新しいタイプの TM-2 によって濾過処理されたファージ液中でのファージ粒子は安定であった (Fig. 2. D 参照)。故に、古い製造の TM-2 によって濾過された 06N-58P の失活の原因物質は、その TM-2 製造時に使用された界面活性剤、A、B の影響である事が明らかである。

ファージ液を無菌化する場合、細菌濾過膜による濾過処理が無難な方法である。しかし、不安定なものが多い海洋ファージの場合、細菌濾過膜処理においてすら失活するファージがあることが明らかにされた。その原因として、細菌濾過膜に含まれる微量の界面活性剤による失活があげられた。このような極度に不安定なファージは、分離海洋ファージの中でも必ずしも多くはないが、海洋ファージの分離、検索に際して、かかる器材の使用にも細心の注意を要する。また、このことから海洋ファージは、かかる界面活性剤に対する感受性が個々によりそれぞれ大きく異なることがわかった。加熱やクロロホルム処理によって失活しやすい供試ファージ、06N-58P は、この種の界面活性剤に対しても高い感受性を示した。細菌濾過膜通過によるファージ失活を防止するための手段としては、予めその膜面をファージ懸濁媒である海水培地で洗浄する方法があげられる。かかる簡単な方法がほぼ満足な予防策となりうることを知った。天然の試料から未知のファージを分離する際、かかる器材の選択や取扱いにも十分な配慮が必要である。

要 約

ファージ液を細菌濾過膜を通して無菌化するとき、ファージ粒子が濾過膜に吸着して損失する。それは濾過初期に多く吸着され、低濃度ファージ液において損失率は高い。また、不安定な海洋ファージは、ある種の濾過膜に含まれる微量の界面活性剤の影響をうけて失活することを見出した。その界面活性剤は個々の海洋ファージに対して、それぞれ大きく異なる作用力を示す。これら細菌濾過膜通過による海洋ファージの損失を予防するには、使用する濾過膜を予めファージ懸濁媒である海水培地で洗浄するという簡単な方策をとることによって、ほぼ満足な結果が得られた。

文 献

- 1) ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", 457 p., Interscience Publishers, Inc., New York.
- 2) BILLING, E. (1969): Isolation, Growth and Preservation of Bacteriophages. in "Methods in Microbiology, Vol. 3B" (J. R. NORRIS and D. W. RIBBONS, ed.), 315-329, Academic Press, New York.
- 3) 日高富男・藤村 剛 (1971): 海洋バクテリオファージの形態について。本誌, 20(1), 141-154.
- 4) 日高富男・藤村 剛 (1971): 海洋バクテリオファージの熱およびクロロホルム耐性。本誌, 20(1), 155-158.
- 5) HIDAKA, T. (1971): Isolation of Marine Bacteriophages from Sea Water. *Bull. Jap. Soc. Sci Fish.*, 37, 1199-1206.
- 6) HIDAKA, T. (1972): On the Stability of Marine Bacteriophages. *Bull. Jap. Soc. Sci Fish.*, 38, 517-523.
- 7) SPENCER, R. (1963): Bacterial Viruses in the Sea. in "Symposium on Marine Microbiology" (C. H. OPPENHEIMER, ed.), 350-365, Charles. C. Thomas, Springfield, Illinois.