

海洋バクテリオファージの熱および クロロホルム耐性

日 高 富 男・藤 村 剛*

On the Heat- and Chloroform-resistance of Marine Bacteriophages

Tomio HIDAHA and Tsuyoshi FUJIMURA*

Abstract

The authors dealt with the determination of heat- and chloroform-resistance of sixteen marine bacteriophages isolated from sea water. Of the sixteen phages, the six were sensitive to heating at 50°C for 30 minutes as well as treatment with chloroform, and the others were resistant to the both treatments. In the six unstable phages, two of them are phages with a long and non-contractile tail on their morphology, and the four other phages are of a short tail. On the other side, within the limited experiments, any unstable phages did not be found among phages with a tail possessing a contractile sheath. The authors found clearly a certain relation between the stability and the structure of particles of the marine bacteriophages examined.

前報¹⁾²⁾において、海洋バクテリオファージの分離とその形態について報告した。ファージの分離からその後のファージ実験において、供試ファージの安定性についての知見は、基礎的な知識として有用である。SPENCER (1960, 1963)³⁾⁴⁾は北海の海水から数株のファージを分離し、それらは55°C、1時間の加熱で失活し、また0~20°C培養で宿主溶菌能を示すが30°C以上ではその能力を現わさないことを報告している。CHAINA (1965)⁵⁾はインド洋および北海の海水から分離した10株のファージを扱い、それらの耐熱性は宿主菌のそれより高く50°C、30分間または60°C、2~3分間の加熱に耐えるが60°C、15分間の加熱で失活することを明らかにした。更に、熱帯海域から分離されたファージは、寒帯海域から分離されたファージに比し、より耐熱性であったと述べている。最近、WIEBE and LISTON (1968)⁶⁾は水深850mの海底泥から海洋性 *Aeromonas*-ファージを分離し、そのファージは5~15°Cの低温域で最大の溶菌を示し、また90気圧の加圧下で増殖しうることを明らかにした。これら幾つかの知見は、海洋ファージが陸棲ファージと異なる性状をもつことを示唆するものであり、その性状はそれらの生息環境条件を反映している。

著者らは、前報²⁾で供試した海洋バクテリオファージについて、引き続きそれらファージ粒子の耐熱性や、ファージ実験法でしばしば有効に使われるクロロホルムに対する耐性など安定性の一部を検討した。その結果、かかる試験に対して不安定なファージが一部に見出されたが、その性状を海洋ファージの特性に結びつけるには至らなかった。一方、それら性状とファージ粒子の形態との間に関連性を見出し得たので、それらの知見を報告する。

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

実験材料および方法

供試海洋バクテリオファージ 前報²⁾ で述べられた 06N-ファージ 8 株と 0XN-ファージ 8 株、計 16 株を供試した。

使用培地 本報で使用する海水培地 (Sea Water Broth, SWB), 海水寒天培地 (Sea Water Agar, SWA), 軟寒天培地 (soft Sea Water Agar, sSWA), はいずれも前報²⁾ のものと同じ組成である。

ファージ定量法 ファージの定量は ADAMS (1959)⁷⁾ の寒天重層法に準じておこなった。その方法は次のごとく予備吸着法を取り入れて修正された。SWB で適宜 10^{-n} 希釈を行なったファージ液 1 ml を宿主菌新鮮培養物 (10^8 cell/ml) 1 ml と混じり、室温に 5~10 分間放置して宿主細胞にファージ粒子を吸着させる。その吸着液 0.2 ml を、予め溶融し 45°C に保温した sSWA 3 ml に注加し手早く混和した後、そのすべてを SWA 平板上に流込み重層する。重層寒天の固化するをまって 25°C にて 1 晩培養した。この方法で 1 枚の平板に形成された溶菌斑数は、[plaque-forming unit (pfu)/供試希釈ファージ液 0.1 ml] を表わす。この測定値を 10 倍し希釈倍数を乗じて pfu/ml に換算した。

実験結果

供試海洋バクテリオファージの耐熱性 海水培地に 10^8 pfu/ml 濃度に懸濁した供試ファージ液を 50°C, 30 分間加熱処理した後、生残ファージを計数した。その結果は Fig. 1-A に示す。Fig. 1-A に見られるごとく、供試ファージのうち 11 株は 50°C, 30 分間の加熱に耐える。しかし 06N-58P は完全に失活し、06N-34P は 1/1000 程度に、06N-12P は 50% に、0XN-36P は 70% に、0XN-85P は 25% に失活していた。これらのうち失活の甚だしい 06N-58P については、更に 45°C で 10 分間まで加熱し、その減衰曲線を Fig. 2 に示した。Fig. 2 から明らかなように、

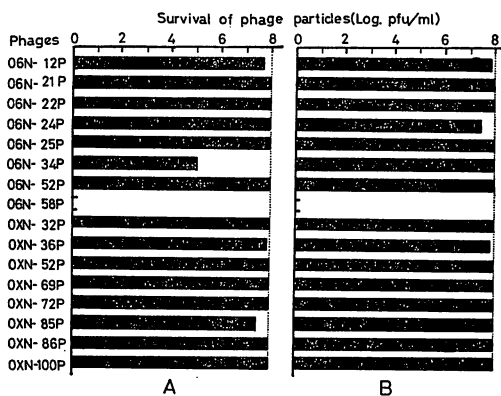


Fig. 1. The stability of marine bacteriophages heated at 50°C for 30 min, and treated with chloroform. The initial concentration of the phage suspensions in sea water broth is a titer of 10^8 pfu/ml.

A: heated at 50°C for 30 min.
B: treated with chloroform

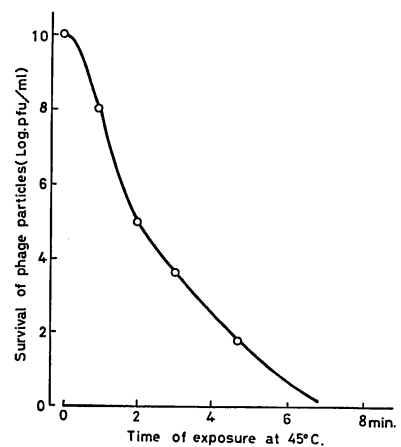


Fig. 2. The thermal inactivation curve of phage 06N-58P suspended in sea water broth, at 45°C.

06N-58P は非常に耐熱性の低い海洋ファージで、45°C、数分間の加熱でほとんど失活した。

供試海洋バクテリオファージのクロロホルム耐性 海水培地に懸濁した各供試ファージ液 (10^8 pfu/ml) に 1/10 量のクロロホルムを添加し、1 分間ほど強く振盪し、25°C で 1 時間放置する。その後かるく遠沈し、上清液について生残ファージを計数した。その結果は Fig. 1-B に示した。クロロホルム処理によって 06N-58P は完全失活し、06N-24P は 30% に 06N-12P, 0XN-36P は 70~80% に失活している。その他の供試ファージはクロロホルムに対して耐性であった。

考 察

一般にバクテリオファージの分離・増強過程または調製されたファージ培養液 (lysate) の保存には、無菌化処理が欠かせない操作の一つである。その無菌化には細菌濾過器または濾過膜を通す方法がとられるが、多数の純系ファージ分離の際、濾過操作は煩雑かつ相当の労力を要する。従ってこれに代えて 60°C、30 分加熱殺菌を行なうか、あるいはもっと簡単にクロロホルム処理をして無菌ファージ液を得ることがある。また無菌化されたファージ液の雑菌再汚染の防止や、その他ファージ実験、例えばファージ粒子の宿主細胞への吸着率 (adsorption rate) の測定や、ファージの増殖過程で潜伏期 (latent period) における菌体内ファージ生成数を測定する実験などにおいて、しばしば有効な手段としてクロロホルム処理が行なわれる。その際当該ファージのクロロホルム耐性が必要条件となるが、ファージによってはこれらの処理で不活化されるものがある。このような点を考慮して、前報²⁾ で分離、形態検査された海洋バクテリオファージ 16 株について、耐熱性とクロロホルム耐性とを検討した。

ファージの耐熱性についてはいくつかの報告があり、一般に陸棲ファージは 60°C にさらしても失活されないことが知られている。事実 *E. coli*-ファージのあるものは 60°C に 1 時間さらしても失活されなかった。供試海洋ファージ 16 株のうち 11 株は 50°C、30 分間の加熱で何ら影響をうけなかった。これらファージの宿主菌は海洋細菌で耐熱性低く、おおよそ 50°C、5 分間の加熱で完全滅菌出来る。従ってそれらファージ培養液は加熱処理による無菌化も可能である。加熱によって影響をうけた 5 株の耐熱性度合は個々に異なる。なかでも 06N-58P は加熱により最も鋭敏に失活する。一般に、宿主細胞に比しファージ粒子の方が耐熱性高いのが普通であるが、06N-58P は非常に耐熱性低く宿主細胞のそれにほぼ等しい。また九州南方海域という亜熱帯海域から分離された海洋ファージでもこの程度の熱感受性ファージが存在することがわかる。これら耐熱性の低い 5 株は、前報²⁾ の結果から、06N-12P が非収縮性の長い尾部をもつファージであるのを除いて、他の 4 株、06N-34P, 06N-58P, 0XN-36P, 0XN-85P はともに短い尾部をもつファージであることは興味深い。海洋ファージ粒子の耐熱性とその形態との間に関連性がうかがえる。

クロロホルム処理に対しては、供試海洋バクテリオファージ 16 株のうち 12 株が安定で、他の 4 株が何らかの影響をうけている。これらクロロホルム感受性ファージ 4 株のうち 06N-12P, 06N-24P が非収縮性の長い尾部をもつファージで、06N-58P と 0XN-36P がこん跡の尾部をもつファージであり、熱に対すると同様これらの形態のものにクロロホルム耐性の低いものが見出された。クロロホルムに対しても 06N-58P は極端に感受性が高かった。クロロホルム感受性ファージに対して、SPENCER (1963) は四塩化炭素あるいはトルオールによる無菌化法を試みているが、06N-58P については、それらによっても完全に失活した。

熱、クロロホルム処理を通じて、両作用に対する感受性株はほぼ共通していて、それらは不安定

ファージ株と考えられる。またこの実験の範囲内で、形態の違いにより熱、クロロホルム処理に対する耐性に差があることが明らかにされた。それは収縮性尾鞘をつけた尾部をもつファージは熱、クロロホルム処理に対して安定で、非収縮性の長い尾部をもつファージや短いまたはこん跡の尾部をもつファージに不安定なものが含まれる。

供試海洋バクテリオファージ 16 株のうち、熱、クロロホルム処理によって何らかの失活を被るものが 6 株程度含まれることが知られた。新しいファージの分離、増強操作などそのファージの性状が未だつまびらかでないものを扱う段階では、その無菌化処理は細菌濾過膜を通す方法が無難である。細菌濾過膜の使用に際しても、膜面へのファージの吸着など若干の問題がひそむが、この点については別報で詳報する。

要 約

海洋バクテリオファージ 16 株の熱およびクロロホルム耐性を検討した。それらのうち 10 株は 50°C, 30 分間以内の加熱またはクロロホルム処理に対して安定であった。他方 6 株は両処理に対して耐性が低い。熱に感受性のファージはまたクロロホルムにも感受性で、両作用間で感受性株はほぼ共通しており、それらは不安定ファージ株と考えられる。その不安定度合には各株で差がある。また本研究の範囲内で不安定株は、短いまたはこん跡の尾部をもつファージに多く、次いで非収縮性の長い尾部をもつファージに見られ、収縮性尾鞘をつけた尾部をもつファージには見られなかった。このことによりファージ粒子の不安定性と形態との関連性が知られた。

文 献

- 1) HIDAKA, T. (1971): Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **37** (12), (in press).
- 2) 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.
- 3) SPENCER, R. (1960): Indigenous marine bacteriophages. *J. Bacteriol.*, **79**, 614.
- 4) SPENCER, R. (1963): Bacterial viruses in the sea. in "Symposium on Marine Microbiology" (C. H. OPPENHEIMER, ed.), 350-365, Charles. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 5) CHAINA, P. N. (1965): Some recent studies on marine bacteriophages. *J. gen. Microbiol.*, **41**, Proceedings xxv.
- 6) WIEBE, W. J. and J. LISTON (1968): Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Marine Biol.*, **1**, 244-249.
- 7) ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.