

原 著

細菌ウイルスの血清学的中和反応に関する研究

第4報 T2, T4 ファージ粒子の中和反応による
抗原分析

昭和33年9月4日受付

信州大学医学部細菌学教室 (指導: 田崎忠勝教授)

宮 島 吉 広

緒 言

前報^①において私は T1, T2 及び T4 ファージの中和反応において見出された多元的反応について記載し, これらのファージ粒子の感染局面 (感染に際して本質的な役割を果すウイルスの活性表面) の抗原構造が単一のものでなく, 数種の異なる成分より構成される複雑なものであらうと思われることを述べた。

本報においては, 同じ問題をより直接的な分析方法によつて追究した成績が記載される。即ち一般細菌の抗原分析で用いられている所謂 Castellani の凝集素吸収試験に準じ, T2 及び T4 ファージ粒子の感染局面の抗原分析を試みたところこれらのファージ粒子の抗原構造が多元的であることを実証する成績がえられたのでこゝに報告する。

材料及び方法

1. 供試ファージ: T2 及び T4 ファージ (共に野生型) を用いた。T2, T4 はともに国際的標準ファージとして広く用いられているがその一般性状は次の如くである。: 電子顕微鏡による観察によれば, 約 70×85 mμ の六角型の頭部と, 約 15×115mμ の尾部より構成され (Williams and Fraser, 1953)^②, 既に触れたように, 中和反応に関与する抗原——即ち, 逆に言えば, 本ウイルスの感染の成立に直接関与する部分はその尾部であることが一般に認められている。 (Lanni and Lanni, 1953)^{③④}; 37°C のブイオン中での潜伏時間は約21分, burst size は約200~300; T2, T4, T6 ファージは血清学的に類縁であるのみならず, 遺伝的構造においても類縁で相互間に Genetic recombination (遺伝的組換) が成立する。

2. 宿主菌: T系ファージの共通宿主菌である大腸菌 B 株を用いた。

3. 抗ファージ血清の準備: ブイオン溶菌液 (10¹⁰/ml 以上の感染価を有するもの) で家兎を免疫して得られた抗血清を, 強く B 菌で吸収し, 抗 B 菌抗体 (凝集素) は充分除いておく。それらの手順は前報でのべたから省略する。

4. 中和反応の実施: その要領は前報でのべたから, こゝではごく簡単にのべるにとどめる。約 10⁶/ml の濃度にブイオンで稀釈した中和試験用ファージ液 (中和反応を行う前に 60°C, 20分加温して充分分離させておく (Sagik, 1954)^⑤) と, 同じくブイオンで適当濃度にする抗ファージ血清とを等量 (場合によつては 1:9 の割合で) 混合し, 45°C のゆぶね中で反応させる。種々の時刻にその一部をとり出し, 生理食塩水で適当 (10⁻²以下) に稀釈後, 一定量を寒天重層法で検定し, そこに生じたプラークを算えて中和反応速度を求める。指示菌としては B 菌の対数期培養 (約 3×10⁸/ml) を用いた。

中和反応速度係数 (k) は次式に従つて計算される。

$$k = \frac{2.3 \times \text{血清原倍}}{\text{作用時間 (分)}} \cdot \log \frac{\text{時刻 } t \text{ における活性ファージ量}}{\text{時刻 } t_0 \text{ における活性ファージ量}}$$

$$= \frac{2.3D}{t} \cdot \log \frac{P_0}{P} \quad (1)$$

一般にファージの中和は約99%が中和される迄はほぼ一次反応的に進行することが知られている。従つて縦軸に未中和のファージ量の対数を, 横軸に作用時間を目盛ると, 中和曲線は近似的に直線関係を示すことになる。こゝで k は他の実験条件が一定ならば理論的には中和抗体の濃度に比例する数値である。

5. 吸収用のファージ液の準備: 抗ファージ血清中の中和抗体を吸収除去する為には出来る丈高濃度のファージ液を用意する必要がある。次に記す合成培地, M9, に B 菌を増殖させ約 2×10⁸/ml の濃度に達したところ全菌にファージを感染せしめ (各菌あたりの感染ファージ数は 2~4 個とする) 完全に透明になる迄長時間振盪培養する。略々溶菌が完了したとき, 60°C, 20分, 加熱すると更に透明となり (Sagik, 1954)^⑥, これを 3,500r.p.m. 30分間遠心沈澱して菌の残渣を除くと, 水様透明のファージ液がえられる。このようにして夫々約 7×10¹⁰/ml 及び 4×10¹⁰/ml の高検定価の T2 及び T4 ファージ液がえられた。

これらのファージ液は夫々紫外線で不活化されねば

ならぬが、その為には各フアージ液を5mlあてに直径3寸の時計皿に入れマツダ殺菌灯(100volt, 15watt)で10cmの距離からT2フアージは10分間、T4フアージは60分間照射した。この条件で夫々のフアージはほぼ完全に感染力を失った。

6. UVフアージによる抗体の吸収: 紫外線不活化フアージ(UVフアージ)による抗体の吸収は次のように行う。適当な濃度の抗フアージ血清のブイオン稀釈液と吸収用のUVフアージ液とを等量混合し、45°Cのゆぶね中に2時間浸した後4°Cの水室中に一晩放置する。具体的なことがらについては夫々の項においてのべよう。この際、どの程度、中和抗体が吸収されたかは、先にのべた方法に従つて試験フアージを用いて、中和速度係数を求め、対照値と比較して推定する訳である。後で記載されるように、吸収に用いるフアージ量と抗血清量の比が適当であれば、中和抗体の約96%以上が吸収できる。

対照として、フアージで吸収しない抗フアージ血清を実験の進行に平行して処置し、これについてフアージの中和反応を行う。

7. 合成培地 M9 (Watson, 1950)^⑩

その組成は次の如くである。

| | | |
|---|-----------------------------------|---------|
| { | Glucose | 4 g |
| | NH ₄ Cl | 1 g |
| | MgSO ₄ | 0.13g |
| | Phosphate buffer M/15, pH 7.0 ... | 1,000ml |

実験成績

1. フアージ粒子によるフアージ中和抗体の吸収について

次にのべるように、抗フアージ血清から類属中和抗体を吸収する場合に、抗T2血清は約 $1/1,100$ に、抗T4血清は約 $1/220$ に稀釈して行つたが、この条件は次のような理由に基いて算出された。

Jerne 及び Avegno (1956)^⑥の推定によれば0.1Nの塩濃度(ブイオン中のNaCl濃度は約0.15Nである)において中和速度係数が約 $3,000\text{min}^{-1}$ の抗T4馬血清中には、原液に換算すると、約 $10^{15}/\text{ml}$ の中和抗体分子が含まれているという。従つて、こゝで使用する抗T2血清原液中の抗T4中和抗体分子数を概算してみると、 $k=63\text{min}^{-1}$ であるから、それは約 $2 \times 10^{13}/\text{ml}$ となる。他方同様にして、抗T4血清中の抗T2中和抗体分子数は $k=20\text{min}^{-1}$ であるから約 $7 \times 10^{12}/\text{ml}$ 程度と推定される。

Jerne 及び Avegno (1956)^⑥らによれば1個のT4フアージ粒子は20個以上の中和抗体分子を吸収できると推定されているが、安全のためには、中和抗体分子

と同数のフアージ粒子を用意すれば先ず充分であろうと思われる。

こういう条件で夫々 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ のT4フアージ液及び $3.5 \times 10^{10}/\text{ml}$ のT2フアージ液で、夫々抗T2及び抗T4血清中の類属中和抗体を吸収する場合に要求される抗血清の稀釈は次のように計算される。

$$\text{抗T2血清の場合: } \frac{2 \times 10^{10}}{2 \times 10^{13}} = \frac{1}{1,000}$$

$$\text{抗T4血清の場合: } \frac{3.5 \times 10^{10}}{7 \times 10^{12}} = \frac{1}{200}$$

以上の推定がほぼ要求された条件を満足させるものである事は次の実験結果から首肯する事ができよう。

2. T4フアージ粒子による抗T2血清中の類属抗体の吸収

実験のスケジュールの具体的な進め方は次の如くである。

抗T2血清をブイオン(pH 7.2)で1:500に稀釈したものを5ml、とM9培地によるT4溶菌液をUV照射し不活化したもの(UV照射前は $4 \times 10^{10}/\text{ml}$ の感染価のもの)5mlとを混じ、45°Cのゆぶね中に2時間作用させ、ひきつゞき4°Cの水室中に20時間放置する。

翌日、試験フアージとして約 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ の感染価をもつT2及びT4フアージ液を用意し、その各0.1mlを、吸収血清0.9mlと混じ(終末濃度は1:1,111になる)、45°Cのゆぶね中で反応させる。種々の時刻にこのフアージと抗血清の混合物から0.1mlのサンプルをとり出し、ブイオン9.9mlに混じ稀釈し(これで1:100にうすめられる)その0.2mlをB菌を指示菌として寒天重層法で検定し、中和されたフアージ量を算出する。

対照実験として未吸収の抗T2血清(1:500)を等量のM9培地と混じ、その0.9mlに対し、試験フアージ0.1mlを加えて45°Cのゆぶね中で同様に反応させ、中和フアージ量を検定する。従つて、終末血清濃度は同じく1:1,111となる。

実験結果の一例を夫々表1、図1に示そう。こゝで得られた中和曲線の最初の傾斜から(1)式に従つて計算された中和速度係数(k)はT4で吸収しない抗T2血清ではT2に対し約 844min^{-1} 、T4に対し約 63min^{-1} 、T4で吸収した抗T2血清はT2に対し約 870min^{-1} 、T4に対しては 2.5min^{-1} であつた。同様の条件下に行つた他の実験成績もほぼ同様の値を示した。

こゝで中和抗体量はkに比例すると假定して吸収された抗体量を計算してみると抗T2中和抗体量は殆んど減っていないのに対し、抗T4中和抗体は96%もの

表 1. T4 ファージで吸収した抗T2血清による中和試験成績
(試験方法及び条件は本文参照)

| 試 験 ファージ | 試 抗 血 | 驗 ファージ 清 | 作 用 時 間 (分) | | | | | | | | | |
|-------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | 0 | 3 | 6 | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 80 | 120 |
| T4 | 吸 収 | | 1142 (1.00) | - | - | - | - | 996 (0.87) | - | 910 (0.80) | 890 (0.79) | 900 (0.79) |
| | 未 吸 収 (対 照) | | 1142 (1.00) | - | - | 830 (0.73) | - | 453 (0.40) | 204 (0.18) | 114 (0.10) | - | - |
| T2 | 吸 収 | | 483 (1.00) | 40 (0.083) | 19 (0.039) | 8 (0.017) | 1.5 (0.0031) | - | - | - | - | - |
| | 未 吸 収 (対 照) | | 483 (1.00) | 46 (0.095) | 11 (0.023) | 5 (0.011) | 3 (0.0062) | - | - | - | - | - |

(注) 数字は平板あたりのプラーク数(各2枚の平板の平均値)を示す。
カッコ内の数字は血清作用前のファージ量に対する比率。

表 2. T2 ファージで吸収した抗T4血清による中和試験成績
(試験方法及び条件は本文参照)

| 試 験 ファージ | 試 抗 血 | 驗 ファージ 清 | 作 用 時 間 (分) | | | | | | | | |
|-------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | 0 | 2 | 4 | 6 | 10 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| T2 | 吸 収 | | 1297 (1.00) | - | - | - | - | 1178 (0.91) | 1068 (0.82) | 1018 (0.79) | 833 (0.64) |
| | 未 吸 収 (対 照) | | 1394 (1.00) | - | - | - | - | 298.5 (0.21) | 98 (0.071) | 32.5 (0.023) | 8.5 (0.0061) |
| T4 | 吸 収 | | 1381 (1.00) | 74 (0.054) | 12.5 (0.0091) | 1.5 (0.0011) | 0.125 (0.000091) | - | - | - | - |
| | 未 吸 収 (対 照) | | 1366.5 (1.00) | 64.5 (0.047) | 8.5 (0.0062) | 1.0 (0.00073) | 0.20 (0.00015) | - | - | - | - |

(注) 数字は平板あたりのプラーク数(各2枚の平板の平均値)を示す。
カッコ内の数字は血清作用前のファージ量に対する比率。

図 1.

a) T4で吸収しない抗T2血清による中和曲線
b) T4で吸収した抗T2血清による中和曲線

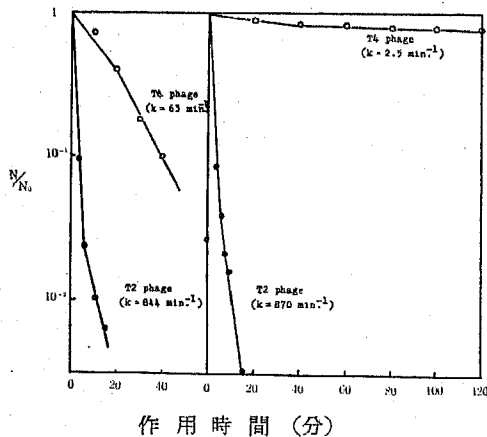
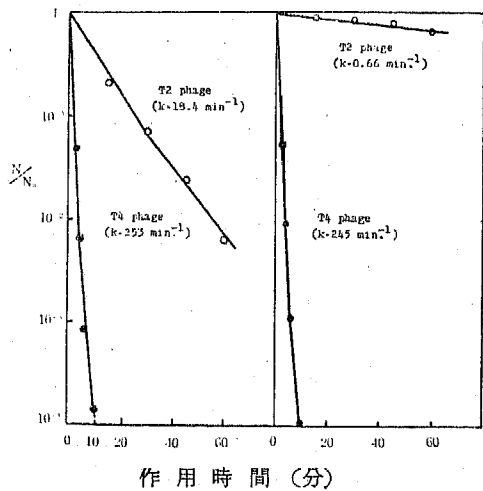


図 2.

a) T2で吸収しない抗T4血清による中和曲線
b) T2で吸収した抗T4血清による中和曲線



部分が吸収されたことになる。こうして次のような結論に導かれよう。

即ち、抗 T2 血清中の抗 T4 成分（類属中和抗体）は T4 ファージによつて略完全に吸収され、しかもこの際抗 T2 成分には殆んど影響を与えないことが認められる。

3. T2 ファージ粒子による抗 T4 血清中の類属抗体の吸収

こゝでは抗 T4 血清をピジョンで 1:100 の割に稀釈したもの 5ml と、約 7×10^{10} /ml の感染価の T2 溶菌液を UV-不活化したもの 5ml とを加え、45°C で 2 時間、4°C で 20 時間吸収したのものについて試験を行った。その他の実験条件は前項と全く同一である。従つて終末血清濃度は 1:222 である。

実験成績の一例を夫々表 2、図 2 に示すが、こゝでも前項と同様の結論がえられよう。即ち、抗 T4 血清中の抗 T2 成分は T2 ファージによつて 96.5% 迄吸収され、その際抗 T4 成分には殆んど有意の減少をおこさせないことが認められる。

考 察

図 1 及び 2 の成績から、夫々 T2 及び T4 ファージで免疫してえられた家兎血清は免疫に用いたファージを強く中和すると同時に、夫々類縁関係にある T4 及び T2 ファージをも中和しうる抗体を或程度含んでいることがわかる。類属中和反応の k はいずれも本来のファージに対する k の約 7% 程度である。

このようなファージ中和反応における類属反応はファージの分類上最も意味のあるものとされ、Burnet (1933)^⑥や Adams (1952)^②及び彼らの協同研究者たち^{③④}によつてファージの分類が確立されている。

扱、このような類属反応はどういう理由でおこるであろうか？その可能性として次のような 2 つの対立した理由が挙げられよう。

(a) T2 及び T4 ファージはその感染局面の抗原構造として共に 2 種の成分、2 及び 4、を有しているがその量的比率が互に異なるために反応速度に差が生ずるという場合。

(b) T2 及び T4 はその感染局面構造としては夫々単一成分、2 或は 4 のうちのいずれかで構成されてをりこの 2 と 4 の成分が本来互に抗原的に類縁であるという場合。

扱、以上のいずれが事実か吟味してみるに、もし後者 (b) の場合が事実だと仮定してみよう。この場合は、例えば T2 で免疫した家兎血清は単一な中和抗体成分即ち抗 T2 中和抗体のみを含む訳になる。そして図 1 に見られるような T4 ファージの類属中和反応は、

ある、より遅い速度で中和抗体分子と T4 ファージの抗原 4 との間の結合がおこるために生ずるといふ事になる。

従つて、このような場合にも T4 ファージで抗 T2 中和抗体が吸収できたとしても、その吸収血清による T2 と T4 ファージの中和速度の比率（中和速度係数 k の比率）は吸収前の血清と等しい筈である。

勿論、同様の事が抗 T4 ファージ血清と T4、T2 ファージとの関係でもいふる。

ところが、例えば図 1 の成績（右半分）に見られるように T4 ファージで吸収した抗 T2 血清はもはや殆んど T4 ファージを中和しないのに反し、T2 ファージに対しては依然としてつよい中和能力をもっていることがわかる。同様の結果は抗 T4 ファージ血清に関しても伺われる。（図 2 の右半分）

これらの事実は、T2、T4 ファージの感染局面の抗原構造としては假定 (a) の場合の方が事実であることを示していよう。

Adams (1952)^②によれば T2 ファージは T4 ファージの他 T6、C16 などのファージと夫々異なる程度の類属中和反応を示すことが明らかにされている。

従つて、これらの成績を総合すれば T2 及び T4 ファージなどはその感染局面の抗原構造として数種の成分をもっていることが推定される。

総 括

夫々 T2 或は T4 ファージで免疫してえられた抗ファージ家兎血清中には、互いに相手のファージを中和する類属中和抗体が含まれているが、これらは、該当するファージによつて殆んど完全に吸収され、その際免疫に用いた本来のファージに対する中和抗体量は殆んど有意の減少を示さなかつた。これらの成績は T2、T4 ファージ粒子がその感染局面の抗原構造として、少くとも、2 種の成分より構成されている複合的なものであることを示していると考えられる。

謝 辞

終に臨み終始御懇篤なる御指導を賜つた田崎教授並に多くの有益な御助言を与えられた田波助教授に厚く感謝の意を表する。

文 献

- ①Adams, M. H. (1950): Methods of study of bacterial viruses. In Methods in medical research. Vol. II, 1-73 Year Book Publishers, Chicago, III. ②Adams, M. H. (1952): Classification of bacterial viruses: Characteristics of the T5 species and of the T2, C16 species. J. Bacteriol., 64, 387-396. ③Adams, M. H. and Wade, E.

(1954): Classification of bacterial viruses: The relationship of two *Serratia* phages to colidysentery phages T3, T7 and D44. *J. Bacteriol.*, **68**, 320-325. ④Adams, M. H. and Wade, E. (1955): Classification of bacterial viruses: Characteristics of the T1, D20 species of colidysentery phages. *J. Bacteriol.*, **70**, 253-259. ⑤Burnet, F. M. (1933): The classification of dysentery-coli phages. III. Correlation of serological classification with certain biochemical tests. *J. Path. Bact.*, **37**, 179-184. ⑥Jerne, N. K. and Avegno, P. (1956): The development of the phage inactivating properties of serum during the course of specific immunization of an animal: Reversible and irreversible inactivation. *J. Immunol.*, **76**, 200-209. ⑦Lanni, F. and Lanni, Y. T. (1953a): Antigenic structure of bacteriophage T2. *Fed. Proc.*, **12**, 450-451. ⑧Lanni, F. and Lanni, Y. T. (1953b): Antigenic structure of bacteriophage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **18**, 159-168. ⑨Sagik, B. P. (1954): Specific reversible inhibition of bacteriophage T2. *J. Bacteriol.*, **68**, 430-436. ⑩Watson, J. D. (1950): The properties of X-ray inactivated bacteriophage. I. Inactivation by direct effect. *J. Bacteriol.*, **60**, 697-718. ⑪Williams, R. C. and Fraser, D. (1953). Morphology of the seven T-bacteriophages. *J. Bacteriol.*, **66**, 458-464. ⑫宮島吉広: 細菌ウイルスの血清学的中和反応に関する研究. (I), (II), (III), ウィルス, 投稿中.

Studies on Serological Neutralization of Bacterial Viruses (IV)

Antigenic analysis of infectious sites
of T2 and T4 bacteriophages

Yoshihiro, Miyajima

Department of Bacteriology, Faculty of
Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. Tazaki)

Antigenic structure of T2 and T4 bacteriophage particles in their infectious sites was investigated by means of serological neutralization.

A rabbit serum immunized by T2 phage lysate can also neutralize T4 phage, and *vice versa*, indicating that T2 and T4 phages possess some common antigenic component in their infectious sites.

(It is generally agreed that with T2 and T4 phages the phage neutralizing antibodies are directed against antigens in the phage tail).

When an anti-T2 serum diluted moderately into broth (pH 7.2) was mixed with UV-inactivated T4 lysate which contained about 4×10^{10} particles per ml. under suitable experimental conditions, it was found that most of the anti-T4 phage molecules in the anti-T2 serum could be removed.

Similarly, most of the anti-T2 phage molecules in an anti-T4 serum could be removed by adsorption by a UV-inactivated T2 phage lysate.

From these facts, it is concluded that the infectious sites of T2 and T4 phage particles have some common component in their antigenic structure.

It means, at the same time, that these particles have a complex serological structure in their tails.