

## コレラ菌型別用ファージの基礎的研究

—増殖用菌株由来ファージ抵抗性変異株のファージ感受性と性状—

重 野 秀 明

(長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門)

Fundamental Studies on the Bacteriophages for Typing of *Vibrio cholerae*

Hideaki SHIGENO (Department of Bacteriology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

**Abstract:** In the recent year, a controversy about the biotype of *Vibrio cholerae* is coming up. Majority of E1 Tor vibrio have lost the hemolytic activity which was the most important biological behaviour to identify the biotype of *Vibrio cholerae*. Although the sensitivities against polymixin B and cholera phage group IV are the most reliable test at present to identify the biotype, the strains of *Vibrio cholerae* which are resistant to phage IV and susceptible to polymixin B or vice versa have recently been reported. The appearance of these atypical biotype is bringing about a confusion in the viewpoint of biotype decision and an epidemiological survey. This paper describes about the appearance of atypical biotype of *Vibrio cholerae* in relation to the modified phage receptors seen in the mutant strains and the biological behaviours of them. In order to obtain the mutant strains resistant to a certain phage, mixed culture of phage and *Vibrio cholerae* in the thin layered soft agar was carried out. In this method, four groups of cholera phage (I, II, III, IV) with Asiatic vibrio (*Vibrio cholerae* biovar *cholerae*) strains C154 and H218, and five kinds of E1 Tor phage (1, 2, 3, 4, 5,) with E1 Tor vibrio (*Vibrio cholerae* biovar *eltor*) strain 757 were used. In the soft agar culture with complete bacteriolysis, a few colonies were found as the resistant mutant at times. They were identified as *Vibrio cholerae* and confirmed that they were not lysogenized. After this confirmation, the sensitivity of the mutant strains to the other phages was examined. In conclusion, all the receptors of Asiatic vibrio were markedly in common. On the contrary, each receptors of E1 Tor vibrio were relatively independent. But the receptor 1 (R1) and the receptor 5 (R5) could be so similar in behaviour. The location of the receptors were suspected to be in order from outside R1 and R5 to the inside R2, and R3 forms a branch from an axis of R2 as well as R4. When Asiatic vibrio strain H218 got resistant to a certain phage, it became resistant to all the other phage including phage IV. Besides, the strain became resistant to polymixin B, and positive in VP reaction. These phenomena suggest that E1 Tor vibrio is a mutant strain of Asiatic vibrio.

Tropical Medicine, 24(2), 55-63, June, 1982

---

Received for publication, March 18, 1982.

本研究の一部は日米医学協力研究会コレラ専門部会および九州微生物研究会からの研究費によって行われた。

長崎大学熱帯医学研究所業績第1240号。

## 緒 言

1920年 d, Herelle によってコレラ菌ファージが報告されて以来の、ファージ分離報告またはその応用に関しては武谷 (1973) および Mukerjee and Takeya (1974) の総説に詳記されている。ファージ型別に関しては Mukerjee とその共同研究者が精力的に研究し、クラシックコレラ菌型別用ファージとして I-IV の4種のファージを選択、これらに対する被験株の感受性による5ファージ型を提唱するに至った (Mukerjee, 1963; Mukerjee et al., 1963). 1961年エルトルコレラ菌の大流行が東南アジア地域に発生し、その後アジア、ヨーロッパ、アフリカへも侵入し現在に至っている。これに伴って1964年 Mukerjee はエルトルコレラ菌のファージ型別を公表したが、翌年 (1965) これをすてて5種のファージを用いた9型への型別を提唱、その後第5のファージを変更して6型に分類する方法を用いるに至った (Basu and Mukerjee, 1968)。

1981年当部門の内藤がカルカッタを訪れた際、National Institute of Cholera and Enteric Diseases において上記クラシックコレラ菌型別用ファージ4株とエルトルコレラ菌型別用ファージ5株および各ファージセットの増殖用菌株2株の分与を受けた。その後要に臨んでの型別に対応できるよう増殖・保存を行っているが、著者は型別用ファージ自体の基礎的検討の一端として増殖菌株由来ファージ抵抗性変異株を分離し、それら変異株の型別用ファージに対する感受性を検討した。

## 材 料 と 方 法

### 菌株とファージ

本研究に使用した菌株とファージは、1981年カルカッタの National Institute of Cholera and Enteric Diseases より分与を受けたもので、エルトルコレラ菌型別用ファージ5種 (I-5) とその増殖用菌株 7 5 7 (小川型) およびクラシックコレラ菌型別用ファージ4種 (I-IV) とその増殖用菌株 154 (小川型) である。クラシックコレラ菌型別用ファージについては、わが国において従来そのファージⅣの増殖用に用いられて教室にも保存されていたクラシックコレラ菌 H218 株 (稲葉型) も使用した。

### 使用培地と緩衝食塩水

緑膿菌ファージに関してファージ抵抗性変異株の分離を行い、それぞれの型別用ファージに対する感受性を試験した当教室林 (1981) と同一のものを使用した。

ポリペプトン (大五栄養), 酵母エキス (大五栄養), 塩化ナトリウムをそれぞれ 1, 0.3, 0.2% の割合に精製水に溶解, pH7.2 としたものを基礎培地 (ブイヨン) とした。固型培地および重層用軟寒天はこれに寒天末 (和光) をそれぞれ 1.5%, 0.8% 加えたものを用いた。

ファージ原液の調製または希釈に用いた緩衝食塩水は、Yamamoto and Naito (1965) と同じく、1/15M リン酸緩衝液に塩化ナトリウムを 0.1M, 硫酸マグネシウムを 1mM の割合に添加したものである。

### ファージの増殖またはブラック算定

増殖用菌株のブイヨン 37°C 1夜培養を小試験管に 0.1ml 宛分注, これにファージ原液よりの 10進希釈液列の 0.25ml ずつを加え, 37°C の温浴中に 5-10分間置き, ついで各試験管に 3ml の軟寒天を加えて混和, 寒天平板上に重層した。37°C 1夜培養後溶菌状況を観察し, semiconfluent lysis を認めた平板の軟寒天層をコンラージ棒で遠心管へかきとり, 緩衝食塩水 3.5ml を加えて室温約 1時間置き, その 3000rpm, 20分遠心上清を 0.45 $\mu$  のミリポアフィルターで濾過した。これらのファージ原液は 4°C に保存した。

上記溶菌状況の観察に際して, 適当数のブラックを認めた平板についてはブラック数を数え, 保存ファージ液の力価を知った。また新たに得たファージ原液についても上記に準じてブラック数算定を行った。

### ファージ抵抗性変異株の分離

ファージ原液およびその 10進希釈液列の 0.25ml を増殖用菌株のブイヨン 1夜培養の 0.1ml と混じ, 37°C 5-10分後軟寒天 3ml とともに寒天平板に重層, 37°C に培養した。1夜後完全溶菌を示し, しかもその中に集落形成を認めた寒天平板を選び, 個々の集落をそれぞれトリプトソイ寒天平板に分離培養した。翌日分離塗抹の先端に近く孤立した 1集落を選び, 寒天平板の 4カ所に穿刺, 37°C 4-6時間培養後その上に親株の 1夜ブイヨン培養 0.1ml

を軟寒天2.5mlで重層した。37°C 1夜培養後、穿刺部に発育した菌苔に一致しての溶菌またはブラック形成を認めたものは溶菌株としてこれを除外、無変化であったものに該当するトリプトソイ平板上の残存集落を保存に移した。また、それよりのブイヨン培養 0.1ml を軟寒天で重層した平板に該当ファージ原液の10進希釈液列 ( $10^{-1}$ – $10^{-5}$ ) を滴下して抵抗性獲得の確認も行った。

以上によって分離不能の場合、武部 (1972) の記載を参考に、増殖用菌株を100mcg/ml にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を含有する0.1Mクエン酸ソーダ緩衝液 (pH6.0) で30分処理したもののブイヨン1夜培養を用いて上記と同様に実施した。

#### ファージ液の滴下法

被験菌株を軟寒天で重層した多数の寒天平板上に各ファージの10進希釈液列を滴下するに際しては、林 (1981) と同一の同時に20試料を扱い得る多試料滴下装置を使用した。

## 実験と結果

### エルトルコレラ菌型別用ファージ抵抗性変異株の型別用ファージ感受性試験

材料と方法の項で述べたようにして、エルトルコレラ菌型別用ファージ5株に対する共通の増殖用菌株である757株から各ファージに抵抗性の変異株を分離した。それら変異株のブイヨン1夜培養0.1ml を軟寒天2.5ml とともに重層した寒天平板上に、型別用ファージの  $10^6$ PFU/ml から  $10^2$ PFU/ml に至る10進希釈液のそれぞれを滴下、1夜培養後に溶菌斑を観察した。

**菌株757由来ファージ1抵抗性変異株：**増殖用菌株とファージ1の希釈液を混和重層して完全溶菌を示した平板に発育してきた集落約40のうち溶菌化を否定できた9株を抵抗性変異株とした。この9株に対するエルトルコレラ菌型別用ファージの作用態度を示したのが表1である。目的としたファージ1に対しては、1株 (No. 2) が  $10^{-1}$  程度の感受性低下であったのを除いて、残る8株はすべて完全抵抗性であり、これはファージ5に対しても全く同様であった。検査した9株のファージ3と4に対する態度は全く親株と同じであったが、ファージ2に対しては1株 (No. 2) が  $10^{-1}$  程度、2株 (No. 3, 5)

と5株 (No. 4, 9, 14, 19, 20) が  $10^{-2}$  程度、1株 (No. 13) が  $10^{-3}$  程度の感受性低下を示した。

**菌株757由来ファージ2抵抗性変異株：**本抵抗性変異株の分離は親株とファージの混和重層では成功せず、親株をNTG処理したものととの混和によって獲得できた。表2に示すように、目的としたファージ2に対しては3株 (No. 7, 8, 15) が弱いながら感受性を残していたが、残る7株は完全抵抗性であった。ファージ1と5に対しては全10株が完全抵抗性を示した一方、ファージ3と4に対しては株による差は認められるものの親株と同程度の感受性といえる結果であった。

**菌株757由来ファージ3抵抗性変異株：**表3に示した9株はNTG処理親株由来であるが、9株に達するまでには前項より獲得頻度が低いものであった。目的としたファージ3には全株完全抵抗性を示し、ファージ1, 2, 5に対しては株によって程度の差はあるものの親株に近い感受性が認められた。

Table 1. Sensitivity of Phage 1 resistant mutants isolated from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
2	1	c	c	s	p	—
3, 4, 5		—	—	—	—	—
9, 13, 14		—	—	—	—	—
19, 20		—	—	—	—	—
Control		c	c	c	c	p
2	2	c	s	p	p	—
3, 5		<s	p	—	—	—
4, 9, 14		<s	p	p	—	—
19, 20		p	p	—	—	—
13		c	c	c	p	p
Control	c	c	c	p	p	
2-20	3	c	c	c	c	p
Control		c	c	c	c	p
2-20	4	c	c	c	c	s
Control		c	c	c	c	s
2	5	c	c	<s	p	—
3, 4, 5		—	—	—	—	—
9, 13, 14		—	—	—	—	—
19, 20		—	—	—	—	—
Control		c	c	c	<s	p

c: confluent lysis, s: semiconfluent lysis <s: sub-semiconfluent lysis, p: plaque formation  
Remarks are also effective to Tables 2–12.

Table 2. Sensitivity of Phage 2 resistant mutants isolated from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1-15 Control	1	- c	- c	- s	- < s	- p
1, 2, 3 5, 6, 12 13	2	-	-	-	-	-
7, 8, 15 Control		p c	p c	- c	- < s	-
1, 13 2, 3, 12 5, 6, 7 8	3	c c	c c	s c	< s s	p < s
15 Control		c c	c c	c c	s c	p s
1 2, 12, 13 3, 5, 6 7, 8, 15 Control	4	c c	c c	s s	p < s	p p
Control		c c	c c	c c	c c	s s
1-15 Control	5	- c	- c	- c	- c	- s

残るファージ4の場合は1株(No. 3)は完全抵抗性を示したが残る8株では $10^{-2}$ 程度の感受性低下が認められた。

**菌株757由来ファージ4抵抗性変異株:** 本抵抗性変異株もNTG処理親株の使用によって分離できたが、表4に示した10株に達するまでには最も長期間を必要とした。この場合目的ファージ4のほかファージ1, 2, 5にも全株が完全抵抗性であった。残るファージ3に対しては2株(No. 9, 16)が完全抵抗性, 3株(No. 1, 4, 20)は $10^{-2}$ 程度の感受性低下を示したが、残る5株については $10^{-1}$ の感受性低下とみるか親株に近いとみなすか、その判定は困難であった。

**菌株757由来ファージ5抵抗性変異株:** 表5に示した9株はファージ1抵抗性変異株と同様に、親株とファージの混和後に得た約40集落のうちから溶原性を否定できたものであった。目的としたファージ5に対しては2株(No. 6, 7)が弱い感受性も残っていたほかは完全抵抗性であり、ファージ1に対しては全株完全抵抗性を示した。一方ファージ3, 4に対しては親株と同程度の感受性を認めたが、フ

Table 3. Sensitivity of Phage 3 resistant mutants isolated from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1, 4, 5 9, 11, 12 3	1	c c	c s	c < s	s p	p p
6, 13 Control		c c	c c	c < s	c s	s p
1, 3 4	2	c c	c c	s c	p s	p s
5, 6 9, 13 11, 12 Control		c c c	c c c	c c s	s s < s	s p p
1-13 Control	3	- c	- c	- c	- < s	- p
1 3	4	s -	p -	- -	- -	- -
4, 5, 9 11, 12, 13 6 Control		s s	p < s	p p	- < s	- p
1, 4, 5 9, 11, 12 13	5	c c	c c	c s	s < s	p p
3 6 Control		c c	c c	c c	s < s	p p

Table 4. Sensitivity of Phage 4 resistant mutants isolated from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1-20 Control	1	- c	- c	- c	- < s	- p
1-20 Control	2	- c	- c	- c	- p	- p
1, 4 2, 3, 10 12, 15 9, 16 20 Control	3	c c	- s	- < s	- p	- -
Control		s c	< s c	p c	- < s	- p
1-20 Control	4	- c	- c	- < s	- p	- p
1-20 Control	5	- c	- c	- c	- < s	- p

Table 5. Sensitivity of Phage 5 resistant mutants isolated from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
5-19 Control	1	- c	- c	- c	- c	- p
5, 6, 10 16, 19	2	< s	p	p	-	-
7, 12, 14 17		< s	p	-	-	-
Control		c	c	c	p	p
5, 6, 7 10, 12, 14	3	c	c	c	c	s
17, 19		c	c	c	c	p
Control		c	c	c	c	s
5, 6, 7 12, 17, 19	4	c	c	c	c	s
10, 14		c	c	c	c	p
Control		c	c	c	c	p
5, 10, 12 14, 16, 17 19	5	-	-	-	-	-
6, 7		p	-	-	-	-
Control		c	c	c	< s	p

フェージ 2 の場合は  $10^{-2}$  程度に感受性が低下していた。

#### クラシックコレラ菌型別用フェージ抵抗性変異株の型別用フェージ感受性試験

クラシックコレラ菌型別用フェージ 4 株の共通増殖用菌株である 154 株, および H218 株から各フェージ抵抗性変異株の分離を試みた。分離できた株のブイヨン 1 夜培養 0.1ml を軟寒天 2.5ml とともに重層した寒天平板上に, 型別用フェージの  $10^8$ PFU/ml から  $10^4$ PFU/ml に至る 10 進希釈液のそれぞれを滴下, 1 夜培養後に溶菌斑を観察した。

菌株 154 由来フェージ I 抵抗性変異株: NTG 処理親株とフェージの混和を 3 回に分けて行い, 表 6 に示した 8 株が分離できた。目的としたフェージ I に対しては全株完全抵抗性を示し, No. 9, 11, 13, 16 の 4 株は同時にフェージ II, III, IV に対しても完全抵抗性であった。残る 4 株はフェージ III, IV に対して親株と同様の感受性を, フェージ II の場合程度の差はあるものの親株とほぼ同程度の感受性を保持していた。

菌株 154 由来フェージ II 抵抗性変異株: 前項と同様に行って分離し得た 5 株についての成績を示したのが表 7 である。目的フェージ II と同時にフェージ III, IV に対しても完全抵抗性となる一方, フェージ I に対しては親株に近い感受性を保持していた。

菌株 154 由来フェージ III または IV 抵抗性変異株: 標記 2 種の抵抗性変異株については 10 数回にわたって反復したが, 溶原化株の検出はあったものの目的

Table 6. Sensitivity of Phage I resistant mutants isolated from Strain 154 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
3-19 Control	I	- c	- c	- c	- s	- s
5 8	II	c	c	s	p	p
9, 11, 13 16		c	c	s	< s	-
12, 19 Control		c	c	s	< s	p
		c	c	c	c	s
5, 8, 12 19	III	c	c	s	< s	p
9, 11, 13 16		-	-	-	-	-
Control		c	c	s	< s	p
5, 8, 12 19	IV	c	c	c	s	< s
9, 11, 13 16		-	-	-	-	-
Control		c	c	c	s	< s

Table 7. Sensitivity of Phage II resistant mutants isolated from Strain 154 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
2 12, 17, 20 16 Control	I	c	c	s	< s	p
		c	s	< s	p	-
		c	s	< s	p	p
		c	c	s	< s	p
2-20 Control	II	-	-	-	-	-
		c	c	c	s	< s
2-20 Control	III	-	-	-	-	-
		c	c	s	< s	p
2-20 Control	IV	-	-	-	-	-
		c	c	c	s	< s

株の分離は不成功に終わった。

**菌株 H218 由来ファージ I 抵抗性変異株**：時期を異にして分離できた8株と10株の成績を表8に示した。8株 (No. 2-18) は目的ファージ I のみに完全抵抗性を示して、ファージ II, III, IV への感受性は親株と同程度に保持していた。一方10株 (No. 20-29) は全ファージに抵抗性を示した。

**菌株 H218 由来ファージ II・III・IV 抵抗性変異株**：それぞれ分離できた10株ずつを試験したが、表9-11に示したように全ファージに完全抵抗性となっていた。

#### ファージ抵抗性変異株の性状試験

上述のファージ感受性試験終了後に、菌株757由来ファージ抵抗性変異株47株とH218由来抵抗性変異株のうち38株と対照としての各親株について血清

型と生物学的性状を試験した。試験したのはクリグラー培地、SIM培地、VP半流動培地、シモンズクエン酸培地での各性状、リジン・オルニチン・アルギニンの脱炭酸、アラビノース・イノシットの分解性、カタラーゼ・オキシダーゼ試験、ポリミキシンB・ファージIVに対する感受性であった。

**菌株757 由来ファージ抵抗性変異株**：試験した性状のうちVP反応とポリミキシンBに対する態度を除いては、ファージ抵抗性変異株は親株と同じ性状を示した。VP反応が親株と異なって陰性を示したのは757/1のNo. 3, 13, 14, 19の4株、ポリミキシンに対する態度が親株と異なって感受性を示したのは757/1のNo. 3, 9, 13, 19, 757/2のNo. 1, 2, 3, 5, 757/3のNo. 3, 13, 757/4のNo. 3, 9, 12, 16であった。

**菌株 H218 由来ファージ抵抗性変異株**：血清型、VP反応、ポリミキシンBとファージIVに対する態

Table 8. Sensitivity of Phage I resistant mutants isolated from Strain H-218 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
2, 3, 4 5, 6, 12 13, 18 20-29 Control	I	-	-	-	-	-
2-18 20-29 Control	II, III	c	c	c	s < s	s < s
2-18 20-29 Control	IV	c	c	c	c < s	c < s

Table 9. Sensitivity of Phage II resistant mutants isolated from Strain H-218 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1-10 Control	I	-	-	-	-	-
1-10 Control	II, III	-	-	-	-	-
1-10 Control	IV	-	-	-	-	-

Table 10. Sensitivity of Phage III resistant mutants isolated from Strain H-218 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1-10 Control	I	c	s < s	p	p	p
1-10 Control	II, III	-	-	-	-	-
1-10 Control	IV	-	-	-	-	-

Table 11. Sensitivity of Phage IV resistant mutants isolated from Strain H-218 to classic typing phages

Strain	Phage tested	Phage dilution (-log)				
		1	2	3	4	5
1-10 Control	I	-	-	-	-	-
1-10 Control	II	-	-	-	-	-
1-10 Control	III	-	-	-	-	-
1-10 Control	IV	-	-	-	-	-

度以外は親株と同一性状であった。この場合H218/ⅠのNo. 2-18(8株)を除きすべて血清型が小川型となっていた。VP反応はH218/ⅡとH218/Ⅲの全株およびH218/ⅣのNo. 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10と大多数が陽性に変化していた。ポリミキシンB感受性はH218/ⅠのNo. 2-18(8株)とH218/ⅣのNo. 2以外は耐性化、ファージⅣ感受性はH218/Ⅰの全株を除いて耐性化していた。

## 考 察

緒言に述べたように、クラシックコレラ菌の型別用ファージ(Mukerjee, 1963; Mukerjee *et al.*, 1963)とその増殖用菌株およびエルトールコレラ菌型別用ファージ(Basu and Mukerjee, 1968)とその増殖用菌株を入手し、その分離コレラ菌への応用に対応し得る準備は終わった。この機会に、各グループのファージにはそれぞれに共通した増殖用菌株が使用されていることから、同株より各ファージ抵抗性変異株を分離、それらの型別用ファージに対する感受性を精査したのが本報である。以下各グループファージ間のレセプター面からみた異同につき考察を加える。

増殖用菌株757由来のエルトールコレラ菌型別用ファージ抵抗性変異株について得られた表1-5の成績を、各変異株の各ファージに対する成績が不一致の場合多数株の示す態度で代表させる方針で以下にまとめてみる。

表1の757/1の場合は、同時にファージ5に対しても抵抗性となるとともにファージ2への感受性低下がみられ、ファージ3と4に対する感受性は保持している。表2の757/2では、同時にファージ1と5へも抵抗性となり、ファージ3と4には無変化である。表3の757/3においてはファージ4への感受性低下があるのみで、ファージ1, 2, 5に対しては感受性を保持している。表4に示された757/4は同時にファージ1, 2, 5にも抵抗性を示すとともに、ファージ3に対する感受性低下がある。表5の757/5では、757/1と同じくファージ1に対する抵抗性化とファージ2への感受性低下がある。以上の関係をまとめると表12のようになる。これから増殖用菌株757のレセプターの状態を推論すると、図1のような配列が考えられ、757/1または757/5の場合にファージ2への感受性低下は同時に脱落するものが

Table 12. Summary for sensitivity of phage resistant mutants from Strain 757 to E1-Tor typing phages

Mutant	Phages				
	1	2	3	4	5
757/1	-	+	++	++	-
757/2	-	-	++	++	-
757/3	++	++	-	+	++
757/4	-	-	+	-	-
757/5	-	+	++	++	-

+: The same sensitivity as Strain 757, +: less sensitivity than Strain 757, -: no sensitivity.

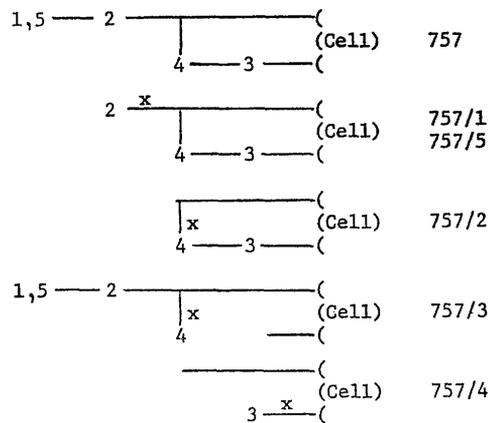


Fig. 1. Possible explanation for the receptor.  
x: Not completely cut off.

あるとすれば理解され、757/2の際にはそれがなく、757/3の場合やや複雑ながら理解されるものと考えられる。表12をファージ側からみると、ファージ1と5は同一ファージでないにしても極めて近縁でありレセプターを共通にしている可能性がうかがわれる。ファージ1または5, 2, 3, 4はそれぞれ独立性のあるファージとみられた。

増殖用菌株154由来のクラシックコレラ菌型別用ファージ抵抗性変異株については目的とする4ファージのうちファージⅠ, Ⅱについてののみ抵抗株が得られた。154/Ⅰの8株(表6)は目的ファージⅡ, Ⅲ, Ⅳに対してはそれぞれ同じ4株ずつが完全抵抗性または親株と同一またはほぼ同じ感受性を示している。表7の154/Ⅱの4株は同時にファージⅢ, Ⅳ

にも抵抗性を示し、ファージⅠに対してのみ感受性を残している。この結果はファージⅡ、Ⅲ、Ⅳに対するレセプターの共通性または3ファージの近縁性を示すものともみられる。

増殖用菌株 H218由来のクラシック コレラ菌型別用ファージ抵抗性変異株は、18株を供試したH218/Ⅰが分離時期によってファージⅠのみにまたは4種のファージに抵抗性を示したほかは、H218/Ⅱ、H218/Ⅲ、H218/Ⅳでは全株が他ファージにも抵抗性である。この成績は前記菌株154由来変異株の場合と同様に、ファージⅡ、Ⅲ、Ⅳに対するレセプターの共通性または3ファージの近縁性をうかがわせるものである。

ついで最終的に試験した血清型と生物学的性状について考察を試みる。菌株757由来エルトールコレラ菌抵抗性変異株はポリミキシンBへの感受性が14株に、VP反応の陰性化が4株にみられ、共に変化したものは1株のみで、その相互間に関係はみられず、また表1-5に示した型別用ファージ感受性との間にも関連性は認められない。一方菌株H218由来のクラシックコレラ菌型別用ファージ抵抗性変異株の場合は、表8においてファージⅡ、Ⅲ、Ⅳへの感受性を保持していた8株のみは親株と同じであったが、表9-11に示した株はすべて血清型が小川型となるとともに、ポリミキシンおよびファージⅣに抵抗性となり、3株(H218/ⅣのNo. 2, 3, 8)を除いてはVP反応も陽性化していた。この変化した結果を現在のクラシックとエルトールコレラ菌の鑑別基準にあてはめると、これらの株はエルトールコレラ菌に該当するものとなり、血清型までも変化しているものとなる。しかし親株であるH218は明らかにクラシック稲葉型であるので理解に苦しむものである。本成績からファージ耐性が同時にポリミキシンB耐性化とVP反応の陽性化を来し易いものとみられるので、若しこの様な変化が自然界で起り得るものとするれば、エルトールコレラ菌が現コレラ流行の主体をなすに至った原因の一端をうかがわせるものかともいえる。しかしその考を進めるにはクラシック、エルトール鑑別に利用されるその他の性状、さらにポリミキシンB耐性化またはVP反応の陽性化に伴うファージ抵抗性の変化を精査する必要がある。

## 結 語

エルトールコレラ菌型別用ファージ5種とクラシックコレラ菌型別用ファージ4種およびそれぞれに対する共通の増殖用菌株よりファージ抵抗性変異株を分離、それらの該当型別用ファージに対する感受性および血清型と生物学的性状を試験して以下の結果を得た。

1)エルトール系菌株757からは、ファージ1または5に対する抵抗株が親株とファージの混和でそれぞれ9株、ファージ2、3、4に対しては親株のNTG処理で10、9、10株分離できた。

2)757/1はファージ5抵抗性と対ファージ2感受性低下、757/2はファージ1と5に抵抗性とファージ2への感受性低下、757/3は対ファージ4感受性低下、757/4はファージ1、2、5への抵抗性とファージ3への感受性低下、757/5はファージ1への抵抗性と対ファージ2感受性低下があった。

3)以上の成績から菌株757のファージレセプターとファージ抵抗性と感受性低下に考察を加え、ファージ1と5の近縁性を明らかにした。

4)クラシック系では、菌株154の場合NTG処理でファージⅠまたはⅡに抵抗性のそれぞれ8株と4株が分離でき、ファージⅢまたはⅣ抵抗株は分離できなかった。

5)154/Ⅰのうち4株は残る3ファージへも抵抗性であり、残る4株は3ファージへ感受性を示し、154/ⅡはファージⅢ、Ⅳへも抵抗性であった。

6)クラシック系菌株H218では、H218/Ⅰの8株と10株は、ファージⅡ、Ⅲ、Ⅳに対してそれぞれ感受性と抵抗性を示し、10株ずつのH218/Ⅱ、H218/Ⅲ、H218/Ⅳはすべて全ファージ抵抗性となっていた。

7)菌株757由来抵抗株の生物学的性状は親株と一致する場合が多く、例外はVP反応で4株、ポリミキシンB14株にみられた。

8)菌株H218由来抵抗株の場合はH218/Ⅰの8株以外は血清型が小川と変り、VP反応はH218/Ⅰ全株とH218/Ⅳの3株を除く27株、ポリミキシンB感受性はH218/Ⅰ全株とH218/Ⅳの1株以外29株、ファージⅣ感受性はH218/Ⅰを除く30株で親株と異っていた。

9)前記H218由来株の性状変動はクラシックとエルトールの鑑別に係る性状変化であり、今後の問題点として提起した。

## 謝 辞

稿を終わるに当たり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました当部門内藤達郎教授に深甚の謝意を捧げます。また実験に際して御協力いただいた教室員各位に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Basu, S. & Mukerjee, S. (1968): Bacteriophage typing of *Vibrio eltor*. *Experientia*, 24, 299-300.
- 2) 林 敏明 (1981) : 緑膿菌型別用ファージの基礎的研究—増殖用菌株の溶原性とファージ抵抗性変異株のファージ感受性—. *熱帯医学*, 23, 119-133.
- 3) d'Herelle, F. (1922): *The bacteriophage—its role in immunity*. Baltimore, (translated by Smith, G. H.).
- 4) Mukerjee, S. (1963): Bacteriophage-typing of cholera. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 28, 337-345.
- 5) Mukerjee, S., Guha Roy, U. K. & Rudra, B. C. (1963): Studies on typing of cholera vibrios by bacteriophage. Part IV. Variations in the phage-types of *Vibrio cholerae* in the Calcutta epidemics of 1960-1962. *Exp. Med.*, 23, 201-208.
- 6) Mukerjee, S. (1964): Approaches to the problem of cholera control: An oration, *Indian J. Med. Res.*, 52, 331-354.
- 7) Mukerjee, S. (1965): Recent status of the cholera bacteriophage problem, pp. 9-16. In *Proc. Cholera Res. Symp.* (Jan. 24-29, 1965, Honolulu). Pub. Hlth. Serv. Publication No. 1328. U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- 8) Mukerjee, S. & Takeya, K. (1974): *Vibrio-phages and vibriocins, CHOLERA*. W. B. Saunders Co. Philadelphia, London and Toronto. 61-83.
- 9) 武部 啓 (1972) : 突然変異の誘導. 蛋白質・核酸・酵素 別冊 細菌ファージ遺伝実験法. 12-24, 共立出版, 東京.
- 10) 武谷健二 (1973) : コレラ菌ファージとビブリオン. *日細菌誌.*, 28, 213-223.
- 11) Yamamoto, N. & Naito, T. (1965): Inactivation by nitrogen mustard of single- and double-stranded DNA and RNA bacteriophages. *Science*, 150, 1603-1604.