

Bacteriophage によるBacteria の定量

脇本, 哲
九州大学農学部植物病理学教室

吉井, 甫
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/21356>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 15 (2), pp.161-169, 1955-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

Bacteriophage による Bacteria の定量*

脇本 哲・吉井 甫

Quantitative determination of the population of a bacteria by the phage technique

Satoshi Wakimoto and Hazime Yoshii

緒 言

一般に活性を有する phage と、これに susceptible な bacteria との接触は phage の bacteria への吸着を起し、一定の latent period を経て、bacteria は破壊され、増殖した活性ある phage が放出される。この吸着侵入から latent period を経て再び phage を放出する迄の一連の現象は、Delbrück³⁾らを嚆矢として、一般に広く phage の増殖現象追求の手段として利用されて来た one-step growth experiment (一段増殖実験)により定量的に究明される。而して bacteria の生理状態、培養基の栄養状態及び温度等 phage の増殖に直接影響する環境条件を一定にすると、特定の susceptible bacteria と特定の virulent phage での one-step growth experiment で明らかにされ得る latent period, rise period は大体一定であり、更に個々の bacteria から放出される phage particle の平均数、即ち average burst size は略一定である。

OP₁ phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage)^{11,13)}は *X. oryzae* の大部分の系統に親和性を有し、而も他の種の bacteria には作用し得ない。而して OP₁ phage の特定条件下に於ける特定の bacteria の系統を用いて行つた one-step growth experiment により明らかにされた latent period, rise period, average burst size は既に報告した¹⁴⁾ 即ち 30°C の恒温下で *X. oryzae* No. 49¹³⁾を使用すると、CaVfCh 培養基 (塩化加里加用無ビタミン・カゼイン加水分解物培養基) 中に於ける OP₁ phage の latent period は約 40 分であり、rise period はそれに続く約 20 分である。而して average burst size は multiple infection (多感染) の場合も single infection (単感染) の場合も共に同一で約 12 を示す。即ち OP₁ phage が *X. oryzae* No. 49 の population に上記の様な条件下で感染した場合、約 40 分の latent period を経て bacteria は破壊され始め、同時に phage を放出し始め、それより約 20 分の後、個々の bacteria は完全に、或は population は完全に破壊され、感染した bacteria の数の約 12 倍の free phage を放出し終る。この結果に基づき one-step growth experiment の手法を適当に応用すれば、試料中に於て雑菌と混在している状態下に在る *X. oryzae* No. 49 をも容易に定量し得る筈である。

* 九州大学農学部植物病理学教室業績。

材料及び方法

材料は *X. oryzae* No. 49 と OP₁ phage を用い、試料は *X. oryzae* No. 49 の suspension, 接種後一定期間を経た白葉枯病罹病稲葉及びこの病原 bacteria を添加して一定期間を経た土壌を使用した。

先ず試料中に含まれる *X. oryzae* No. 49 がすべて OP₁ phage 添加の際感染される様に bacteria を露出の状態に置かねばならない。その為に一定量の試料に一定量の蒸溜殺菌水を加えて homogenize する (試料が単に bacteria の suspension の場合はこの必要はない)。而して phage 増殖時の培養基の栄養条件を均一化する為に蒸溜殺菌水により適当に増量し、6000 rpm, 10 分間遠心洗滌し、上澄除去、これを更に一回反復し試料中に存在している可溶性物質を上澄として完全に取除く。Bacteria はすべてこの沈澱中に含まれている筈である。これに CaVfCh 培養基の一定量を加え再び浮遊させる。この suspension に対し、この中に存在すると予想される bacteria の数に相対して充分多量の phage particle を加え (実際には試料は濃縮、稀釈共に可能であるから、適当な菌予想濃度の試料 1 ml. に 10⁸ per ml. 位の phage particle を加えるようにする)、試料中のすべての *X. oryzae* No. 49 に OP₁ phage が感染し得る様にする。この phage 添加以後の操作はすべて 30°C 下で行う。5 分間に感染させた後、free の状態に残つた phage を 5 分間に完全に不活性化するに充分な anti-phage serum を添加し (量は抗原抗体反応速度恒数の等式*から演繹的に計算出来、その理論値の数倍乃至数十倍を加えればよい)、bacteria-phage complex の状態以外に存するすべての OP₁ phage を不活性化する。Anti-phage serum 添加後予め 30°C に保つておいた CaVfCh 培養基約 5 ml. を加え振盪して 6000 rpm, 5 分間遠心洗滌し、上澄を捨てる。この際上澄中に free phage がないことを plaque count で確める (check)。この洗滌の 2 回の反復により anti-phage serum の作用を完全に除く。然る後、一定量の CaVfCh 培養基を加えて恒温槽に放置する。Phage 添加から恒温槽への放置に至る迄に要する時間は約 30 分であり、*X. oryzae*-OP₁ phage complex の latent period は約 40 分であるから、この全操作は bacteria の phage 放出前に完全に終了するわけである。Rise period の終了後、即ち感染後 60 分以後は stationary period といい、multiple infection の場合は更に吸着すべき bacteria が存在しない為、又 single infection の場合も、次の段階に於ける phage の放出迄、phage の力価の変化しない一定期間がある。この stationary period に 6000 rpm, 10 分間遠沈して新生された phage の suspension を得る。而して、*X. oryzae* No. 49 を indicator strain として plaque count method により上澄の一定量中に含まれる phage の粒子数を知る。これから逆算すれば試料中に含まれていた *X. oryzae* No. 49 より生産された phage の総粒子数が判る。故にこの場合目的の

$$* K=2.3 D/t \times \log P_0/p$$

P₀ : t = 0 の時の活性 phage 粒子数

P : t 分後の serum 混液中の活性 phage 粒子数

D : phage-serum mixture に於ける serum の最終稀釈倍率

K : phage の不活性化反応速度恒数

bacteria の数 N は

$$N = \frac{\text{Number of phage particles produced}}{\text{Average burst size}}$$

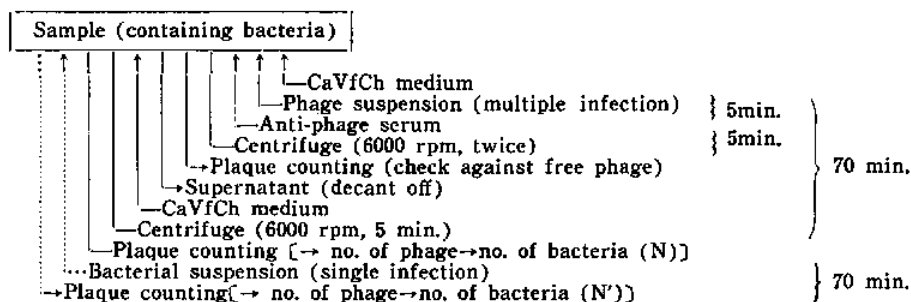
から算出し得る。而して *X. oryzae* No. 49 と OP₁ phage との combination に於ける CaVfCh 培養基中での average burst size は約 12 であるから、この combination に於ては分母に 12 を代入すればよいが、bacteria と phage の系統が異なるに従いこの値も当然異ると思われるから、夫々の系統の場合の実験結果からの average burst size に適当に代える必要がある。

試料中の bacteria の数が極めて少い時でも、average burst size が数百である様な bacteria と phage の combination に於ては上記の如き 1 回の one-step growth experiment の適用で定量出来ると思われるが、*X. oryzae* No. 49 と OP₁ phage の如く average burst size の小さいものにあつては、更に single infection によるもう 1 回の適用も必要な場合がある。即ち 1 回の増殖で得られた stationary period の時の phage suspension 中にある個々の free phage particle が更に今 1 回新しい bacteria 1 個に対して 1 個ずつ吸着し得る様に充分多量の bacteria を加え、即ち single infection の状態にし、前と同様 30°C 下に於て増殖させ stationary period に到つて、plaque count method により、生産された phage の粒子数を決定する。この場合の bacteria の数 N' は

$$N' = \frac{\text{Number of phage particles produced}}{(\text{Average burst size})^2}$$

で示される。ここに (Average burst size)² は、bacteria の average burst size は multiple infection に於ても single infection に於ても共に同一であることに基くものである。この phage technique の順序を図示すれば fig. 1 の通りである。

Fig. 1. The phage technique to assay the number of bacterial cells.



実 験

使用した OP₁ phage suspension の原液の力価は 5×10^8 per ml. であり、free phage の不活性化に使用した anti-phage serum は phage による bacterial lysate から遠沈により bacteria を除き、上澄 ($10^8 \sim 10^9$ per ml. の phage suspension) を毎週 4 ml.

ずつ連続的に家兎へ静脈注射することにより得られた anti-phage serum であり、これは bacteria の破片に対する antibody を当然含み bacteria にも強く反応する為、これに予め bacteria を作用させて bacterial antibody のみは除去した。この操作により phage antibody の力価に変化はない。この anti-serum の phage 不活性化反応速度恒数は 9.2 であり、これを通常 5 倍に稀釈して用いた。

Phage の力価の最終検定は *X. oryzae* No. 49 を indicator strain とした plaque count method により、plating には次の組成の培養基を使用して行つた。

Potato	300 gr 煎汁
Ca(NO ₃) ₂	0.5
Na ₂ HPO ₄	2.0
Peptone	5.0
Sucrose	15.0
Agar	20.0
Water	1 l
pH	7

I. Phago の増殖段階の 1 回の適用による bacteria の定量

1. 異物を混入しない場合の *X. oryzae* No. 49 の定量

Table 1. Number of *X. oryzae* No. 49 cells in pure suspension assayed by the phage technique.

Bacterial suspension (ml.)	Number of free phage particles before multiplication	Number of plaques produced	Total number of phage particles produced	Total number of bacteria
0.01	0	22	5.5×10^5	4.6×10^4
0.05	0	13	3.25×10^5	2.7×10^4

Table 2. Comparison of the number of *X. oryzae* No. 49 cells obtained by the phage technique with those obtained by other methods.

Bacterial suspension (ml.)	Number of free phage particles before multiplication	Number of plaques produced	Total number of phage particles produced	Number of bacterial cells obtained by phage method	Number of bacterial cells obtained by plating method	Number of bacterial cells obtained by direct counting method
0.05	0	335	1.675×10^6	1.4×10^5	5.1×10^4	—
0.02	0	134	6.7×10^5	5.6×10^4	8.2×10^3	5.85×10^4

Tables 1, 2 中の number of free phage particles before multiplication は anti-phage serum の添加後、phage の latent period の期間内に遠沈により bacterio-phage complex を落とし上澄を plaque count し、anti-phage serum の free phage の不活性化が完全に行われているか否かを検べたものであり、number of plaques は

phage の増殖後 Table 1 の場合は 250 倍に, Table 2 の場合は 500 倍に稀釈し, その稀釈液 0.1 ml. の現わした plaque の数を示した.

即ち Table 1 より明らかなように, この bacterial suspension 中には 0.1 ml. 当り 4.6×10^4 の bacteria が存在する. 0.05 ml. をとつて行つた結果ではそれより稍々増加した数値 ($2.7 \times 10^4/0.05$ ml.) が得られた.

Table 2 によれば, 従来 bacteria の定量の常法として用いられている plating method は少くも稲白葉枯病菌に於ては非常に不安定で, bacteria の実数よりも非常に少く現われることが明らかになつた. 而して phage による定量方法により示される bacteria の数は haemocytometer により直接的に観察して得られる計数によく一致し, 而も最初 sample として用いた bacterial suspension の量によく比例した結果が得られることから, この方法は極めて正確な方法と断じ得る.

2. 稲葉中の bacteria の定量

前報¹⁴⁾で明らかなように, *X. oryzae* No. 49-OP₁ phage complex は稲葉搾汁中に於て次第に不活性化される. 従つて phage の正常な増殖は行われていない. 故に稲葉中の bacteria の定量に際しては phage 添加前の洗滌を必ず完全に行わねばならない.

圃場に育てた稲白葉枯病に抵抗性の品種黄玉と罹病性の品種旭に夫々9月19日向式多針式接種法⁶⁾で止葉の中央部に 48 時間馬鈴薯寒天培養基斜面培養の *X. oryzae* No. 49 の suspension を接種し, 19 日後に葉の接種部中の bacteria を定量した.

Table 3. Number of *X. oryzae* No. 49 cells within the lesions of *oryzae* leaves 19 days after inoculation assayed by the phage technique.

Variety of rice plant	Degree of disease	Number of phage particles added	Serum volum added (ml.)	Number of free phage particles befor multi- plication	Number of plaques	Total number of phage particles produced	Total number of the bacteria
Kidama	1	1.8×10^8	0.3	0	100	4.0×10^5	3.3×10^4
Asahi	2	1.8×10^8	0.3	0	690	2.76×10^6	2.3×10^5

即ち *X. oryzae* No. 49 は抵抗性品種黄玉中に於ても可成り増殖しているが, 罹病性品種旭中に於けるよりも極めて緩慢である.

3. 土壌中の bacteria の定量

土壌中には培養中に培養基の pH 値を急激に酸性側に移行させる雑菌が多く, その為に土壌中に於ける *X. oryzae* の存在の phage による確認が困難なことは前報で述べた. 然し乍ら, ここに用いた one-step growth experiment の応用による bacteria の定量方法は, bacteria の増殖期間を不必要とし, 数十分乃至数百分の phage の増殖時間を必要とするだけである為に, 雑菌による pH 値の変化は無視でき, phage はこの雑菌により何等作用を受けない利点がある.

成熟稲の育つた5万分の1 Wagner pot 2個に対し、馬鈴薯半合成培養基⁽³⁾斜面に72時間培養した3本宛の bacteria を殺菌水に suspend した濃厚な suspension を10月5日にそれぞれ加え、以後一方は常に湛水状態に保ち、他は水を全く与えず、共に硝子室に放置した。数日後には水を与えない方は完全に乾燥状態になった。Bacteria の定量は10月29日に行つた。

Table 4. Number of *X. oryzae* No.49 cells in the soil 24 days after injection assayed by the phage technique.

Sample	Weight of sample (gr.)	Number of phage particles added	Serum volium added (ml.)	Number of free phage particles before multiplication	Total number of phage particles produced	Total number of the bacteria
Dry soil	1	6.0×10^7	0.3	0	3.03×10^5	2.5×10^4
Wet soil	1	6.0×10^7	0.3	0	2.25×10^5	1.9×10^4

即ち乾燥土壌中に於ても *X. oryzae* No. 49 は少くとも十数日は生存している。

II. Phage の増殖段階の2回の適用による bacteria の定量

One-step growth experiment の1回の適用で増殖した phage の粒子数に相対して多数の bacteria を遠心上澄 phage suspension に添加し、個々の phage がそれぞれ別個に bacteria に吸着する様にする。而して、改めて1回の phage の増殖期間を置いた後、即ち60~65分後、plaque counting により生産された phage の総粒子数を算出し、bacteria 数 (N') を計算す。Table 5 に *X. oryzae* No. 49 の極度に稀釈した suspension を sample とした場合の実験結果を示す。

Table 5. Number of *X. oryzae* No. 49 cells in a pure, dilute suspension assayed by twice application of the phage technique.

Bacterial suspension (ml.)	Phage suspension added (ml.)	Anti-phage serum added (ml.)	CaVfCh medium added (ml.)	Number of free phage particles before multiplication	Bacterial suspension added	Total number of phage particles produced	Total number of bacteria
0.1	0.1	0.8	1.5	0	0.45	24,263	168

Table 5 には示されなかつたが、第1回の phage の増殖過程で増殖した直後の plaque count は 1000 per ml. を示し、これからその時の phage の総粒子数は 2000 と計算される。従つてそれから算出される bacteria の総数は 166 となり2回の適用により得られた数値とよく一致する。

考 察

Bacteriophage の one-step growth experiment の応用による bacteria の定量方法は、結局、従来の bacteria の定量方法である plating による colony count を phage

なる因子を挿入することにより plaque count に置換えた新しい方法である。蓋し、*Xanthomonas oryzae* の plate 上に於ける colony の形成は極めて不安定で、栄養的には現在の処最良と思われる培養基上に於ても発育は緩慢であり、又、個々の菌の生理状態、さらされる環境により colony の拡大に遅速があり、colony 計数の時期も考慮する必要があると思われる。更に又 suspension 中に於ける bacteria の凝集も予想され plating による定量には著しい不正確さを伴うことは否定出来ない。これは Table 2 の結果から明らかである。更に目的菌が雑菌と混在している場合に於ては、目的菌の発育が遅いと、扁平状大型の colony を作る様な雑菌には完全に抑圧され、又目的菌に対し antagonistic action を有する雑菌の存在する場合には、その周辺に目的菌は存在していても可視 colony に発展し得ない。雑菌と共存する場合の目的菌の定量にはこれ等の点に大きな困難が存在する。

ここに報告した phage による bacteria の定量方法は phage なる因子が入るだけ操作が稍、複雑にはなるが、従来の colony count method に伴うと考えられる、これ等のあらゆる欠点を除き得る方法である。然し尙問題は存在している。即ち phage を感染させる場合の bacteria の生理状態である。Bacteria の存在していた夫々の環境によりその生理状態に当然差異が考えられ、その差異により latent period, rise period, average burst size に多少差異の予想されることである。特に吟味を要するのは乾燥土壌中の bacteria である。乾燥状態で生存している bacteria が対数増殖期にある bacteria と同一の経過と結果を phage の増殖にもたらすとは到底考えられず、latent period, rise period, average burst size も当然異なると思われるがこの点は尙明らかでない。然し乍ら、Table 4 から、この乾燥土壌中の bacteria の実験値が正確かどうかは判断出来ないが、少くとも乾燥状態にあつた bacteria にも phage は吸着現象を起し、70 分後には相当数の phage を放出していることは明らかである。或は乾燥状態で所謂休眠状態にある bacteria も培養基中に移せば速やかに正常に近い、従つて phage の侵入を受けた場合 phage を再生し得る生理活動を営み得るのかも知れず、或は又、phage の増殖に必要な要素と bacteria の分裂に必要な要素とは異つている為に休眠状態即ち分裂休止の状態下に於ても phage の生産は可能なのかも知れない。

この定量方法は適温に於ける latent period の非常に短い bacteria と phage の combination に於ては、その温度での適用には困難を伴うが、一般に phage の latent period は低温に於ては延長されるから、この低温下に於ける latent period, rise period, average burst size を定めて、その低温下で適用すれば host range の特異的なあらゆる phage に適用し得る。

要 約

一定条件下に於て、特定の phage が特定の bacteria に感染して引起す増殖現象は、一定の経過と一定の結果を生ずる事実に基づき、その増殖現象究明に屢々応用せられる one-step growth experiment の手法を利用して phage による bacteria の定量方法を考案した。

Bacteria の数 N は

$$N = \frac{\text{Total number of phage particles produced}}{\text{Average burst size}}$$

で計算される。Bacteria 数の極めて少い場合、而も average burst size の極めて少い bacteria には、更に今 1 回 single infection による phage の増殖の 1 cycle を経過させればよく、その時の bacteria の数 N' は

$$N' = \frac{\text{Total number of phage particles produced}}{(\text{Average burst size})^2}$$

で示される。

この方法は目的菌が雑菌と混在している場合にも有利に利用され、その応用例も *X. oryzae* No. 49 と OP₁ phage を使用して 2, 3 報告した。

参 考 文 献

1. Adams, Method in Medical Research Vol. 2, The Yearbook Publishers, Chicago, 1950.
2. Delbrück, M. J. Bact., Vol. 50, 131~135, 1945.
3. Ellis, E.L., and M. Delbrück J. Gen. Physiol., Vol. 22, 365~384, 1939.
4. 松井千秋 九大農学芸誌, Vol. 13, 36~39, 1951.
5. 松井千秋 九大農学芸誌, Vol. 14, 43~49, 1953.
6. 向 秀夫 その他 農技研中間報告, Vols. 6, 7, 1953, 1954.
7. 岡部徳夫, 後藤正夫 静岡大研究報告, Vol. 3, 52~80, 1953.
8. Price, W. H. J. Gen. Physiol., Vol. 31, 119~126, 1947.
9. 田波潤一郎 日本細菌学雑誌, Vol. 6, 137~140, 1951.
10. Tnison, M. W., and G. P. Wadwarth J. Bact., Vol. 39, 389~397, 1940.
11. 富永時任 その他 農技研中間報告, Vol. 4, 1951.
12. 脇本 哲 九大農学芸誌, Vol. 14, 485~493, 1954.
13. 脇本 哲 九大農学芸誌, Vol. 14, 494~498, 1954.
14. 脇本 哲 九大農学芸誌, Vol. 15, 151~160, 1955.

S u m m a r y

The multiplication of a specific bacteriophage combined with the host bacterium under a certain environmental condition has a definite passway. Namely, a specific phage-bacterium complex gives always a constant latent period, rise period and average burst size under a certain environmental condition.

Based upon these facts, a method was newly devised to determine the number of the living cells of a certain phytopathogenic bacterium within soil and other materials.

The method is as follows:

- 1) The latent period, the rise period and the burst size of the phage-bacterium combination, in question, have at first to be determined.

- 2) One-step growth experiment of the phage is then given with the material containing the bacterium in question under multiple infection.
- 3) Then the number of the living cells of the bacterium (N) will be obtained by the following formula:

$$N = \frac{\text{Total number of phage particles produced}}{\text{Average burst size}}$$

- 4) When the number of the living bacterium is too small to obtain satisfactory results, the second application of the infection of the phage is required, adding the bacterial suspension into the centrifuged supernatant fluid of the phage of stationary period so that the single-infection of the phage is obtained.
- 5) In the latter case the calculation of the number of the living cells of the bacterium (N') is as follows:

$$N' = \frac{\text{Total number of phage particles produced}}{(\text{Average burst size})^2}$$

- 6) The outline of the whole procedure is given in figure 1. Some examples with the application of this method were shown being used *Xanthomonas oryzae* No. 49 and its phage (OP₁ phage).

From the results, it was found that *X. oryzae* could survive in the drought soil for a certain period, and that the multiplication within the leaves of rice plants of resistant variety was inferior to that of the susceptible ones.

Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University