

II-451

自然水中の大腸菌ファージと宿主大腸菌の関係

東京大学 学生員 神子直之

東京大学 正会員 大垣眞一郎

1. はじめに

ウイルスに対応する新しい指標の可能性を示すものとして、大腸菌ファージが注目されている。しかし、環境中での増殖、減衰、浮遊粒子への脱吸着等、その挙動について不明な点が多く、その解明に多くの研究を必要としている。本研究は、自然環境より得られた大腸菌ファージおよび大腸菌を用い、その指標性について基礎的な検討を行ったものである。

2. 調査方法

神奈川県境川の河口付近を調査フィールドに設定し、その河川水中、底泥中の糞便性大腸菌群数、大腸菌ファージ濃度を測定した。糞便性大腸菌群数の定量はMFC寒天培地混釈法あるいはMFC培地疎水性格子付きメンブレンフィルター法、大腸菌ファージ濃度は既報¹⁾の通りの二層寒天法でそれぞれ行った。ただし、大腸菌ファージ濃度定量の際の宿主菌株は、E. coli K12 F+A/λ (F特異ファージの定量に用いられる)、E. coli B、E. coli C (Standard Methods 17th ed. (1989)で提案されている)、の3種を用いた。

2. 1. 環境中の大腸菌ファージの宿主特異性試験

大腸菌ファージ試料の調整は、1989年12月の調査の際に寒天培地上に得られた単一ファージから形成されたと見なせる孤立した溶菌斑(大きな溶菌斑に片寄らないよう注意して、K12、B、Cそれぞれより20株、計60株)を無菌的に取り出し、液体培地(2mL)に懸濁させてよく攪拌した後、0.45μmフィルター濾過することにより行った。

大腸菌ファージのE. coli K12、B、Cに対する宿主特異性は次の様に決定した。まず、各宿主菌株をファージ定量の際と同様に上層培地に混入して、下層寒天培地上に注ぐ。(E. coli K12の場合のみ、RNA分解酵素(RNase)を添加した培地も作成した。)その結果、18~24時間培養後には、培地上に宿主菌株が一面に生育した不透明な寒天培地が得られるはずである。そこで、上層培地を注ぎ30分静置して上層培地が固形化した後、あらかじめ裏に書かれた培地の区分に従って、大腸菌ファージ試料を1滴寒天培地上に滴下する。滴下した部分が溶菌により透明、あるいは他の部分より明らかに透明に近いとき、そのファージ試料がその宿主菌株で増殖できるとした。

なお、大腸菌ファージ試料は、1滴で $10^2 \sim 10^3$ 程度の感染価があり、それがもともと得られた菌株の寒天培地上において明らかに溶菌を起こしていた。

2. 2. 環境中の大腸菌のファージ感染性試験

環境中の大腸菌のファージ感染性の調査に用いた大腸菌株の調整は次のように行った。1990年3月の調査の際に疎水性格子付きメンブレンフィルター上に形成された糞便性大腸菌とみなせる濃淡青色のコロニー(50株)を釣菌し、MFC寒天培地を入れた試験管で1~2日培養(44.5℃)した。それをMFC寒天培地上に画線培養(44.5℃、1~2日)してなお濃淡青色コロニーを形成したものを、ファージ用寒天培地上で再画線培養(37℃、2日)し、得られた単一コロニーを液体培地に入れ、数時間培養後上層寒天に混入し、以下上記と同様寒天培地上に生育させ、ファージ試料を滴下した。1日培養後、溶菌が見られるならば、ファージ感染性を持つと考えられる。

3. 調査結果と考察

3. 1. 環境試料による宿主菌株の比較

対象河川の糞便性大腸菌群数は概ね 10^3 [1/mL]のオーダーであり、大腸菌ファージ濃度は検出限界以下から200[PFU/mL]程度であった。河川感潮域の3地点の試料(河川水、底泥)の全てについてE. coli K12、B、Cそれぞれによって得られた溶菌斑の総数およびその分類(大:

直径2 mm以上のもの、小・透明：直径が2 mm以下で中央あるいは全体が透明なもの、小・不透明：直径が2 mm以下で全体が不透明なもの）を表1に示す。最も多くの溶菌斑が得られたのはE. coli K12であり、Cがそれに次ぎ、Bが最も少なくなっている。また、C（54%）はK12（17%）、B（40%）に

表1 得られた溶菌斑の総数と大きさによる分類

宿主菌株	大	小・透明	小・不透明	総数 (%)
E. coli K12 F ⁺ A/λ	5 (1.6)	48 (15)	262 (83)	315 (100)
E. coli B	14 (12)	34 (28)	72 (60)	120 (100)
E. coli C	35 (13)	109 (41)	122 (46)	266 (100)

比べ、透明な溶菌斑が多く得られている。これは、溶菌斑数が実験者の数え方に左右されにくい事を示しており、多くの大腸菌ファージを検出しようことと並びE. coli Cの大きな利点と言える。しかし同時に、E. coli Cでは、FRNAファージを含むF特異ファージを検出できない。

3. 2. 宿主特異性試験の結果

大腸菌ファージの宿主特異性のパターンは表2に示すものが多かった。その内訳を、便宜的に命名した表2に示す分類にしたがって表3に示す。E. coli Bの溶菌斑の総数が少ないことを考慮にいれても、最も多いのは宿主特異性を持たない非特異ファージであり、次がE. coli Cのみで増殖可能なC特異ファージ、E. coli B、Cで増殖可能なBCファージ、そして、F繊維毛に特異的に吸着し遺伝子としてRNAあるいはDNAを持つFRNAファージ、FDNAファージがそれらに続いている。

以上より、環境中の大腸菌ファージは2つのグループに大別され、他のものは少ない事が推察される。2つのグループとはすなわち、主にE. coli Cで検出できる大腸菌体表面に吸着するものと、E. coli K12 F⁺A/λでのみ検出できるF繊維毛に特異的に吸着するものである。

また、ここに用いたどの単一の宿主菌でも大腸菌ファージ全体を検出することが不可能であるということ、また、大腸菌ファージを構成する各グループを環境中でモデルウイルスとして用いることにより、より多くの情報が得られる可能性があるということがわかる。すなわち、病原ウイルスに対応して最も小型のFRNAファージを用いる、あるいは、より大きな病原体に対して大型ファージを用いる、等である。

3. 3. ファージ感染性試験の結果

環境中の大腸菌のファージ感染性については、環境中から分離されたFDNAファージ、C特異ファージ、非特異ファージ、FRNAファージQβを用いて調べたが、植え継ぎの失敗等により途中で失われた以外の30株中ではファージ感染性を持つ株を見つけることはできなかった。これは、大腸菌の検出を排泄から時間が経たと思われる河川から行ったため、ファージ感染性をもつ株がすべて既に溶菌へ至り失われてしまったのか、あるいはファージ感染性を持つ株が元来少ないことによるのか、またその他の理由によるのか、明確な結論を出すに至らなかった。

参考文献 1)大垣ほか(1989)、浄化槽研究、Vol.1, No.1, p19

表2 多く得られた大腸菌ファージの宿主特異性のパターン

	K12	B	C	K12 + RNAse
非特異ファージ	+	+	+	+
C特異ファージ	—	—	+	—
BCファージ	—	+	+	—
FRNAファージ	+	—	—	—
FDNAファージ	+	—	—	+

※ +は増殖可能、—は不可能を表す。

表3 大腸菌ファージの宿主特異性

初代宿主	K12	B	C	計
非特異ファージ	5	11	2	18
C特異ファージ	0	0	12	12
BCファージ	0	5	1	6
FRNAファージ	4	0	0	4
FDNAファージ	4	0	0	4
その他	3	2	5	10
計	16	18	20	54