

F 特異大腸菌ファージの増殖に係わる諸因子

東大・工・都市工 ○神子直之
大垣眞一郎

1. はじめに

都市化の拡大に伴い、都市河川に含まれる汚濁負荷が増大し、海水浴場への汚濁の流入が潜在的な問題となっている。一方、水不足の恐れから水利用の高度化が求められており、様々な汚濁に対応する水質汚濁の制御手法の開発はますます重要になってきている。

新たな汚濁として考えなくてはならないのが、ウイルスである。すなわち、ウイルス検出技術の進歩により、多くの自然水から、飲料水中からさえ病原性ウイルスが検出され得ることが報告されている¹⁾。しかし、現行の水質規準にウイルス学的項目が含まれておらず、その管理・制御の拠り所を現在我々は持っていないのである。

ウイルスに対応する指標として、宿主菌としての大腸菌に感染し増殖するウイルスの一種、大腸菌ファージが有望視されている²⁾。しかし、その環境中での挙動、特にその発生等生態学的情報が十分に得られているとは言えず、結果としてウイルスに対応する指標としての導入には至っていない。

環境中に多く見いだすことの出来る大腸菌ファージが、その濃度をして何を表しているか、従来の論点は以下のものになる。一つには、大腸菌ファージがウイルスの一種であることから、処理操作等のウイルス除去の目安になる³⁾、という論点。もう一つには、宿主となり得る大腸菌群が存在する際に大腸菌ファージを見いだすことができ、しかも塩素等の消毒剤に対する耐性が大腸菌群よりも大きいことから、細菌に対する消毒効果の目安になる⁴⁾、という論点である。

いずれの場合も、環境での大腸菌ファージが共存する宿主となる大腸菌によって増殖する可能性があるため、明確な議論ができる段階にない。

本研究は大腸菌ファージ、その中でF特異RNAファージについて、その増殖特性を調べ、環境における指標としての有効性を高めるべく、様々な因子の影響について調べたものである。

2. 実験方法

実験に用いたF RNAファージはQ β 、宿主菌はE. coli K12 F⁺ (A/ λ) である。

細菌(宿主菌)の定量は、0.1%ペプトン液(pH6.8)を希釈液に用い、ファージ定量用下層培地を用いて混釈法で行った。ファージ(Q β)の定量は、従来の二層寒天法⁵⁾で行った。ただし、試料中にファージ検出を阻害する細菌が含まれていないと考えられるため、濾過・誘出等の前処理を行わず、直接希釈試料を上層寒天に混入する方法で行った場合もある。

培養方法は、200mLの三角フラスコに適度に希釈した液体培地を入れ、通気栓(シリコセン)をして、定温に設定したインキュベーター中で8の字攪拌する事により行った。すなわち、好気条件によるバッチ培養である。なお、培養基質として用いた液体培地は、無希釈の場合TOCで7000~10000[mgC/L]程度であった。

3. 実験結果

以下の実験で、ファージ増殖後に細菌濃度が高濃度で定常に達しているが、その生残菌がファージ感受性を持たないある種の突然変異株であると考えられることを別の実験で確かめてある。

3. 1. 基質濃度の影響

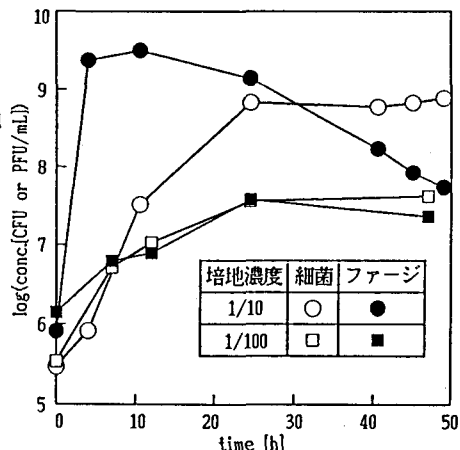


図1 ファージ増殖に対する基質濃度の影響

培養開始時の宿主菌・ファージ濃度が同様で、基質として液体培地が10倍希釈のもの100倍希釈のものの培養を行った。培養温度は35℃である。結果を図1に示す。基質濃度の高い方が細菌、ファージ共に高い濃度に達していることがわかる。

3. 2. ファージ投入時期の影響

培養開始と同時にファージを投入した系と、細菌濃度が定常に達してから同濃度のファージを投入した系の細菌、ファージ濃度の変化を調べた。培養温度は35℃である。10倍希釈の液体培地を基質として与えた。結果を図2に示す。培養開始時にファージを投入した場合はファージの増殖が見られるが、細菌が増殖を止めてからファージを投入してもファージ増殖はみられなかった。

3. 3. 初期宿主濃度、投入ファージ濃度の影響

10倍希釈の液体培地を基質として与え、培養開始時の宿主菌濃度、ファージ濃度を様々に変化させて、得られるファージ濃度の最大値を調べた。培養温度は35℃である。図3に結果を示す。縦横両軸に培養開始時の宿主菌 (Binit)、ファージ濃度 (Pinit) をとり、図中の数字が最大ファージ濃度 (Pmax) の対数を示している。この基質の条件では、細菌濃度は最終的に $10^8 \sim 10^9$ [CFU/mL]になる。実験を行った範囲では、ファージの初期値よりも宿主菌の初期値が最大ファージ濃度に対し支配的であることがわかる。そして、初期のmoi (= multiplicity of infection = [ファージ濃度/宿主濃度]) が0.1~10程度の時に最も多くのファージ濃度 (10^{10} [PFU/mL]) が得られていた。

3. 4. 水温の影響

上記の実験は全て培養温度が35℃であった。ファージ増殖に対する水温の影響を調べるため、25℃で宿主菌を一晩培養して、十分な濃度を得了後、適度に希釈してそのままの温度で培養を行い、ファージを投入した。基質は、液体培地が10倍希釈になるように与えた。時間の経過と共に試料を採取し、細菌とファージの濃度変化を調べた。結果を図4に示す。今までの35℃の培養の際にはファージの増殖がみられたが、25℃ではファージ濃度がほとんど変化せず、増殖がみられなかったことがわかる。

3. 5. 水温変化の影響

35℃で宿主菌の予備培養 (一晩以上) を行い、25℃の培養液に希釈することによって宿主菌に温度変化を与えた。温度変化後様々な時間においてファージを感染させ、ファージの増殖が見られるかどうかを調べた。温度変化時の宿主菌濃度はほぼ 10^8 [CFU/mL]、ファージの投入時の濃度はほぼ 10^5 [PFU/mL]であった。希釈による温度変化からファージが投入されるまでの時間に対し、25℃培養開始後20~24時間後のファージ濃度 (Pmax) が投入濃度 (Pinit) の何倍になったかを図5に示す。35℃で培養した際と比べると増殖の度合いが非常に小さいことがわかる。それでも、温度変化後1時間程度であれば、ファージがせいぜい10倍程度に増殖し得

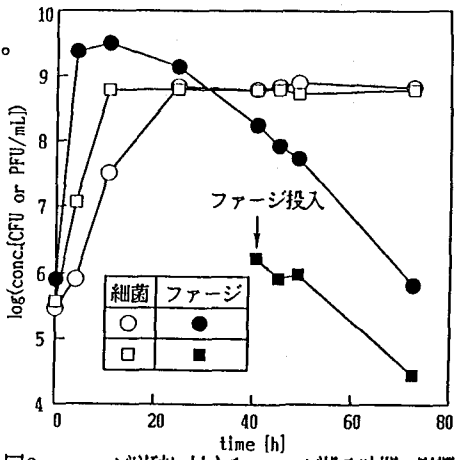


図2 ファージ増殖に対するファージ投入時期の影響

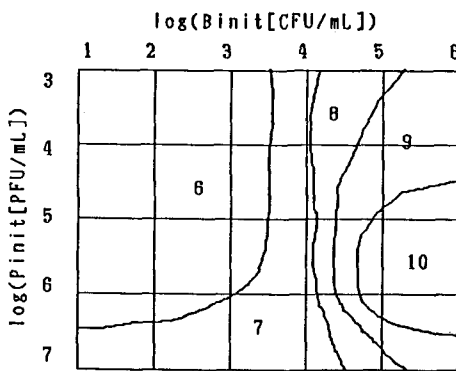


図3 ファージ濃度の最大値に及ぼす初期宿主菌・ファージ濃度の影響 (図中の数字がファージ最大値のlog(PFU/mL)を示している。)

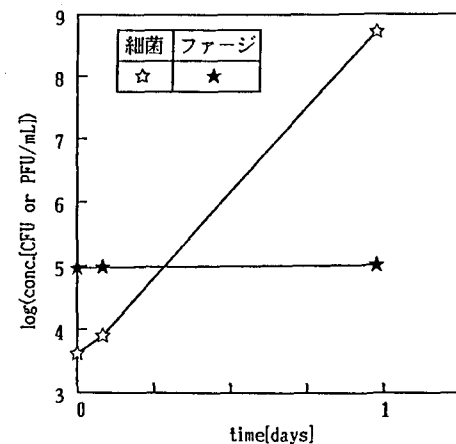


図4 25℃培養液中のファージと宿主の濃度変化

ることがわかった。

4. 考察

F特異RNA大腸菌ファージは、少ない頻度ながら温血動物（人間を含む）の糞便に含まれている場合があることが知られている。環境への排出後のその宿主ファージ間の相互作用について上で得た実験結果をもとに考察を試みる。

上述の実験結果より、F特異RNAファージの増殖にはいくつかの条件が必要であることがわかる。すなわち、宿主菌とファージがもともと十分な濃度存在した上で、

①宿主菌が良好に増殖し得る基質が充分にあること

②水温が25℃より高いか、35℃程度から25℃になって1時間以内であること

であることが必要である。その要件を環境条件と宿主菌の生理状態に関連付けて図に示すと図6のようになる。すなわち、水温がF特異ファージの吸着部位であるF纖毛を支配しており、25℃よりも高温でないといF纖毛が形成されず、高温で形成されていた場合でも低温になると速やかに菌体から脱離してしまう⁹⁾。そして、ファージ遺伝子の複製が宿主菌の遺伝子複製機構を利用している以上、ファージ増殖には、宿主菌に対する十分な基質が必要となる。これら生化学的知見が、本研究により環境工学的見地から実験的に実証できたと考えられる。

自然環境中で、基質がふんだんにあり水温が比較的高温で25℃より高いところは、非常に特殊な場に限定される。よって、F特異RNAファージの増殖の場としては、動物の体内以外ではせいぜい排出直後の下水中に限られていると考えられ、一般に環境中では増殖しにくいと結論付けることが出来る。

筆者らは先に、実地調査により、感潮域での大腸菌ファージ濃度の変化が、その増殖・減衰よりむしろ河川水の海水による希釈で説明できることを示した⁷⁾。本研究により、F特異RNAファージは環境中で増殖しにくく、トレーサーとして有効に利用できる論拠を示した。

参考文献

- 1) 例えば、G.A.Toranzos et.al., Occurrence of Enterovirus and Rotaviruses in Drinking Water in Colombia., Wat.Sci.Tech., Vol.18, No.10, p109, 1986
- 2) 例えば、A.H.Havelaar, Bacteriophages as Model Organisms in Water Treatment., Microbiol.Sci., Vol.4, No.12, 1987
- 3) 例えば、N.Kamiko and S.Ohgaki, RNA Coliphage Q β as a Bioindicator of the Ultraviolet Disinfection Efficiency. Wat.Sci.Tech., Vol.21, No.3, p227, 1989
- 4) 例えば、APHA-AWWA-WPCF, Standard Methods(17th edition). 9-39., 1989
- 5) 大垣眞一郎, 生活環境水中に存在する大腸菌ファージの定量., 浄化槽研究, Vol.1, No.1, p19, 1989
- 6) C.P.Novotny and K.Lavin, Some Effects of Temperature on the Growth of F Pili., J.of Bacteriol., Vol.107, No.3, p671, 1971
- 7) 神子直之ら, 感潮域における大腸菌ファージの挙動., 衛生工学研究論文集, 第27巻, p10, 1991

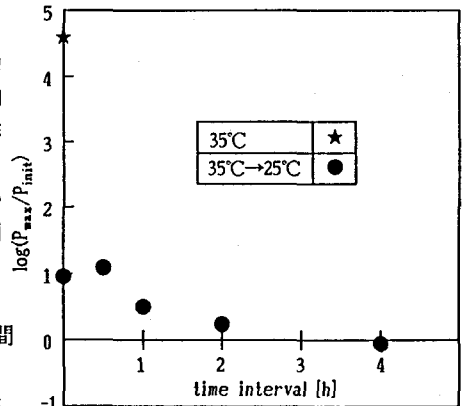


図5 水温変化の影響

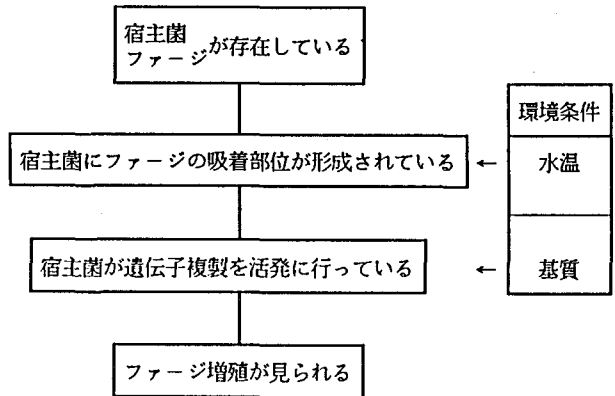


図6 F特異RNAファージの増殖の要件