

バクテリオファージの取扱法

永井 利郎・山崎 福容

農研機構 遺伝資源センター

1. はじめに

バクテリオファージ（以下、ファージと省略する）とは、細菌を宿主とする一群のウイルスのことであり、インフルエンザウイルスがヒトなどの宿主細胞内で増殖するのと同じように、ファージも宿主となる細菌細胞内で増殖する。ファージは宿主細胞に吸着すると、ファージ粒子内にあるゲノム DNA を宿主細胞内に注入し、宿主の複製系を利用してファージ DNA を複製すると同時に、宿主の翻訳系を利用してファージ DNA からファージ粒子タンパク質などを合成し、その複製された DNA を粒子内に包み込む。そして細胞内で増殖した粒子は最終的に細胞外に放出（バースト）され、次の宿主に吸着する。この吸着 - 増殖 - 放出のサイクルが繰り返され、ファージ粒子は爆発的に増加する。そのため、ファージと共に宿主細胞（この場合、宿主細胞のことを指示菌 [indicator] と呼ぶ）を軟寒天培地中で培養すると、ファージに感染した細菌細胞を中心に細菌の増殖が見られない「穴」（プラーク [plaque] または溶菌斑と呼ぶ）が形成される（p.3, 図 2）。肉眼や光学顕微鏡では見ることでないファージの存在はプラークとして簡単に知ることができる。同じ種の細菌でもファージが感染できない系統がある。そのような系統は宿主としては使用できない。宿主になりうる系統には幅があるが、これを宿主域（host range）と呼んでいる。

ファージの増殖は、宿主である細菌とともに軟寒天を混ぜて宿主が増殖できる寒天平板培地上で行う場合と、宿主に感染させた後、液体培地の中で行う場合がある。軟寒天と混ぜる場合、適当な濃度のファージを用いると、軟寒天中に増殖した細菌叢に、溶菌したプラークとしてファージの存在を確認できる。この方法はファージの濃度を計測し、ファージを増殖するのに便利である。液体培地を用いる方法では、宿主とファージ

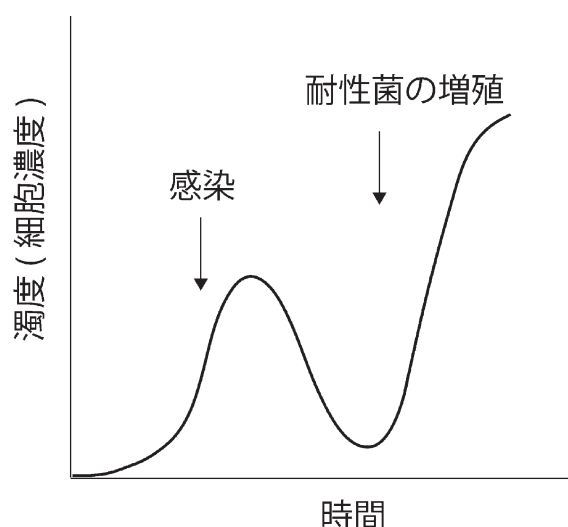


図 1. ファージと宿主細胞の増殖

宿主細胞の対数増殖期にファージを感染させた場合の細菌の増殖の経過を示した。

の濃度を調整することで、感染後しばらくは細菌が増殖を続け、ファージの増殖が優勢になった時点から清澄化するという過程を経て、高濃度のファージ懸濁液を得ることができる。さらに培養を続けると、ファージに耐性のある宿主の変異体が増殖し始め、培地は再び混濁していく（図 1）。

本マニュアルは、一般的なファージの取り扱いについて、特に、研究室レベルでのファージ株の維持管理に役立つように配慮したものである。ファージは細菌に比べ、大きさが格段に小さく、光学顕微鏡で観察することは不可能である。日常ではプラークを頼りに取り扱うことになるが、同じようなプラークを形成するファージは多数存在し、それゆえファージ株間のコンタミネーションには格段の注意が必要となる。その反面、ファージの取扱いは、クリーンベンチで作業する必要はほとんどなく、実験台で点火したガスバーナーの上昇気流の中で作業するだけで通常は十分である。

本マニュアルでは映像資料も用意した (https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph)。本文の該当箇所には、**映像** マークを表示したので活用していただきたい(巻末にダイジェストも掲載した)。なお、ファージを用いた研究例として、著者らの論文(Nagai and Yamasaki, 2009)も参考にいただけると幸いである。

まず、一般的な操作方法(準備, 増殖, 回収, 保存)について述べ、その後にその他の手法を記述する。なお、ここに紹介する操作方法の条件は、あくまでも一例であるので、実際にファージを取り扱う場合には、それらファージの性質を見極めたうえで、条件を調整する必要がある。

2. 使用する器具・試薬

1) 一般的な器具・機械

微生物実験に一般に用いられる機械・器具が必要になる。例えば以下のものがある：

滅菌プラスチックシャーレ、パストールピペット^{*}、駒込ピペット^{*}、フィルター(水溶液用、0.2 μ m、滅菌済み)、シリンジ(滅菌済み)、小試験管とアルミキャップ^{*}、バイアル(またはマイクロチューブ)^{**}、マイクロピペット用チップ^{**}、マイクロピペット、メディウム瓶、振とう培養器、オートクレーブ、乾熱器、クリーンベンチ、インキュベータ、ブロックヒーターなどの小型保温装置(溶かした軟寒天を保温しておくために使用する)、ガスバーナー、数取器(またはコロニーカウンター。プラークやコロニーの計数に使用する)、遠心機(必須ではない)、冷蔵庫。

^{*} あらかじめ乾熱滅菌(160-180℃ 3時間)しておく。^{**} あらかじめオートクレーブ滅菌(121℃ 15分)し、乾燥しておく。

2) 試薬類

液体培地：宿主の増殖に適した培地を用いる。メディウム瓶に入れてその培地に適した方法で滅菌しておく(例えば、オートクレーブ滅菌)。

上層寒天培地：0.6% 寒天培地をオートクレーブにより滅菌して使用する。保温して使用するのでガラス瓶に入れたままにしておく。使用する2時間ほど前に電子レンジで溶かし、滅菌小試験管に分注し、55℃くらいで保温する。筆者らはファージDNAを調製するために0.6% アガロース(超純水のみで溶かしている)を使用することもある。通常、寒天培地は1.5~1.8%のものを使用するのに対し、寒天含量の少ないこの培地を軟寒天培地ともいう。

寒天培地：宿主の増殖用及び下層寒天培地用に利用する。例えば標準寒天培地などを使用する。メディウム瓶に入れてその培地に適した方法で滅菌する(例えば、オートクレーブ滅菌)。

SM バッファ：0.58% NaCl, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01% ゼラチン(Sambrook et al., 1989) ファージ懸濁液作製に使用する。液体培地でも代用可能である。例えば田部井(1990)は、ペプトン水溶液を納豆菌ファージの懸濁液に使用している。

クロロホルム：ファージ懸濁液作製に、特級試薬のものを原液のまま使用する。クロロホルムは毒物及び劇物取締法(劇物)、労働安全衛生法(特定化学物質)他、種々の規則の制限を受けており、法律を遵守した取り扱いが必要である(ドラフト内で取り扱うなど防護処置をする)。

15% グリセリン：オートクレーブした30% グリセリンに等量のファージ懸濁液を加える。凍結保存の保護剤に使用する。

10% スキムミルク・1.5% グルタミン酸ナトリウム一水和物：115℃で15分間オートクレーブし、終了後もふたをあげずに一晩置く。更に110℃で10分間オートクレーブする。真空凍結乾燥・凍結保存の保護剤に使用する。

7% ジメチルスルホキシド：0.2 μ m フィルター(メーカーの仕様書を確認したうえで適切なものを選択する。まずは水溶液用で試してみるとよい)でろ過滅菌しておく。凍結保存の保護剤に使用する。

3. 下層寒天培地の準備（通風乾燥）

ファージの種類によってはさほど下層寒天培地を乾燥しなくても、きれいにプラークを形成するものもあり、乾燥する・しない、その乾燥の程度はファージによるところが大きい。筆者が扱っている納豆菌のファージはプレートの乾燥は必須である。また、上層寒天培地を加えた後も数分、表面を通風乾燥させたほうがきれいなプラークが形成される。*Xanthomonas campestris* のファージの中には特に乾燥が必要ないものもあるが、スポットテスト（p. 7）の場合は、スポットしたファージ懸濁液が広がることもあるので、そういう場合には乾燥が必要である。

乾燥も実験室の環境や、クリーンベンチによって条件は異なるが、下層寒天培地は 30 分程度の通風乾燥は必要であり、条件を決めるにしても、そのあたりを基準にして、いろいろ条件を変えるとよいだろう。また、乾燥するとき上ぶたをずらして乾燥すると乾燥のむらが生じることがあるので、完全にふたを取ってしまっ

て乾燥するのがよい。乾燥時間が短いと表面の凝結水によりプラークが広がり、プラーク同士が結合してしまう。また、乾燥しすぎると、プラークが極端に小さくなってしまう（図 2）。



図 2. 下層寒天培地の乾燥

左から乾燥時間 0, 40, 90 分の培地でのプラークの形態を示した。0 分（乾燥しない）の場合には、凝結水のためプラークが流れてしまっている。上ぶたを右にずらして乾燥させているため、90 分においては左の部分のプラークが乾燥しすぎのために極端に小さくなっている。

4. 宿主の増殖

宿主菌体は液体培養したものを用いるのが便利である。液体培地への接種に使用する菌体はスラント培地で培養したもの、プレートで培養したものなど生存していればいずれでも構わない。寒天培地上に生育している宿主に適当な液体（液体培地など）を加え、懸濁液として回収したものも使用可能である。ただし古い菌体の場合、細胞へのファージの吸着が極端に悪くなる場合があるので、自分の用いるファージや宿主細菌の組み合わせでよりよい条件を把握しておくといよい（例えば宿主細菌の対数増殖後期の菌体を使用するなどが考えられる）。

1. クリーンベンチ内にアルミキャップ付き小試験管や液体培地を入れた瓶など必要なものを、UV ライト点灯のもと少なくとも 15 分間は入れておく。
2. 小試験管に 2 ml の液体培地を分注する（あらかじめ小試験管に液体培地を分注しオートクレーブ滅菌したものでもよい）。
3. 宿主を培養したスラントやプレート容器をアルコールで殺菌し、クリーンベンチに入れる。液体培地に 1 白金耳（白金耳でコロニー表面を触る程度でよい。液体培養物でも同様に白金耳で接種が可能である）接種し、宿主の増殖条件で振とう培養する。

プラークが形成される数は、用いた宿主の成育のステージにより異なり、宿主の対数増殖期の菌体を使うとよく形成される。特に、ファージの数の比較をする場合には宿主の培養時間をそろえておく必要がある（一晚培養した宿主を 1/100 倍に培地で希釈して 5 時間後の菌体を使用するなどが考えられる）。定常期に入った宿主でも計数は可能だが、プラークを形成する効率は下がる。

5. 二重平板法によるファージの計数

諸言でも述べたように肉眼では観察できないファージは、溶かした上層寒天中で宿主と混合し、それを別途用意した平板培地に重層し、それを培養することでプラークとして観察できるようになる。ここではファージ懸濁液を出発点としてプラークを形成させ、ファージ濃度（タイター [titer] とという）を求めるまでの方法を述べる。ファージ懸濁液を作るにはファージを分離し、それを増殖して濃厚液にする必要があるが、それは後述する。ファージには金属イオン（例えばマグネシウムイオン）を要求するものがあるので、必ず培地にはファージが要求する物質も加えておく。

 URL: https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph

1. 下層平板培地と宿主を準備しておく。
2. 滅菌した上層寒天培地を溶かして滅菌小試験管に分注し、保温器であらかじめ温めておく。または、小試験管に上層寒天培地を分注したのち、それをオートクレーブ滅菌し保温しておく。
3. ファージ原液を 1/10 または 1/100 段階希釈する。例えば、1/100 段階希釈の場合、ファージ原液 10 μ l を 990 μ l の SM に希釈し、その希釈を繰り返す。
4. ファージ希釈液から適量を取り、それを宿主の培養液と小試験管内で混ぜる。例えば、10 μ l のファージ希釈液と 30 μ l の培養液を小試験管の底にとる。なお、加えるファージ希釈液の量を多くしすぎない。100 μ l 以下に抑える。
5. ファージを宿主細胞に吸着させるために、適温中で適当時間保温する。例えば、宿主の生育適温で 15 分間置く。あまりに長時間置くと、ファージが細胞内で増殖し、細胞外に放出され始め、ファージ濃度が高く算出される。
6. 保温後に 4 ml の上層寒天培地を加え、軽く攪拌したのち、下層平板培地に注ぎ、軽くプレートを傾けつつ、回して軟寒天がプレート全面に行き渡るようにする。なお、攪拌する際にあまり強くすると、泡が立つのでそれは避ける。
7. 上層寒天培地が固化した（更に必要であれば、表面を風乾する）後、上向きにしてインキュベータに置く。
8. 培養後プラークの数を数える。

プラークの大きさにもよるが、プレートあたり 150 個から 200 個程度プラークが形成されているものが計数しやすい。あまりにも数が多いと、プラークが重なる確率が高くなり、複数のプラークを一つのプラークとして計数してしまうという誤差が生じる。少なすぎても統計誤差が生じる。

$$\text{ファージ濃度 (タイター, PFU/ml)} = \text{プラークの数} \times \frac{\text{希釈倍数} \times 1,000 (\mu\text{l})}{\text{ファージ希釈液の容量} (\mu\text{l})}$$

PFU (Plaque Forming Unit) : プラークを形成することのできたファージ粒子の数を表す。

操作 5 について、どの程度の時間吸着させるのがよいかは、あらかじめファージの一段増殖実験を行い、確認しておくといよい（「13. 一段増殖実験」を参照のこと）。

操作 6 については、溶かして保温したボトル入りの上層寒天培地を滅菌駒込ピペットで直接、小試験管に注いでもよいが、ピペット先端を小試験管の器壁につけないようにして、コンタミネーション（汚染）には十

分に気をつける。特に、複数種のファージを扱う際には要注意である。

余ったバッファや上層寒天培地は実験終了後、意図せず混入したファージや雑菌を死滅させるために電子レンジで1回沸騰させておくといよい。

6. 二重平板法によるファージの増殖（ファージ懸濁液の調製）

ファージを連続希釈してそれぞれを上記の方法で宿主とともに培養すると、濃度が薄いところでは、プラークがまばらに観察されるが、濃度が高くなるにつれて、平板の全面を覆うくらいにまでプラークが密集して形成されるようになる。プラークがかろうじて観察されるくらいまでに溶菌した状態を **confluent** (朝プレートを確認して、まだプラークがかろうじて確認できているが、数時間の後にはプレート全体が溶菌している、というのがベストという方もいる) という。そういう状態の平板を選択し、そこからファージ懸濁液を回収する。宿主に対してファージの初発量が多いために宿主が完全に溶け切っているよりも、少しくらいプラークが観察できている方が収量はよいようである。収量は、用いるファージにもよるが $10^9 \sim 10^{11}$ PFU/ml のオーダーである。あまりに低い場合には作成しなおすか、条件を見直す。

1. **confluent** な状態になるようなファージ濃度で、5の方法で平板を作製する。または、いくつか濃度の異なるファージを宿主に感染させて二重平板を作成し、培養後にその中から **confluent** な平板を選択する (図3)。
2. 培養液に 4ml の SM を軟寒天が壊れないようにして、駒込ピペットでそそぐ (複数株のファージを扱う、または操作に慣れていない場合などには、一旦 SM を別の滅菌済み試験管に入れ、それを寒天培地に注ぐとよい [後述の「補足」を参考されたい]) 。
3. 指示菌の増殖を抑えるため、また、溶菌させるためにクロロホルムを 2, 3 滴滴下する。ファージがクロロホルムで失活する場合 (Ackermann et al., 2004) や、クロロホルムに対する耐性が不明の場合にはこの操作を省く。
4. 室温で 8 時間、または冷蔵庫で一晩程度置く (クロロホルムを添加しない場合は冷蔵庫に置くのがよい)。
5. 平板から SM をパスツールピペットで回収する。
6. 回収した懸濁液を $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター (水溶液用) に通し、バイアルに入れる。懸濁液に宿主細胞が多数含まれている場合、遠心分離 (8,000 rpm, 5 分程度行う) をしてある程度菌体を取り除いたのちに、フィルターに通す。
7. 懸濁液は冷蔵庫で保管する。ファージによっては不安定であり長期間冷蔵庫に置くことができないものもあるので、可能であれば凍結乾燥または凍結その他による長期保存を検討する。

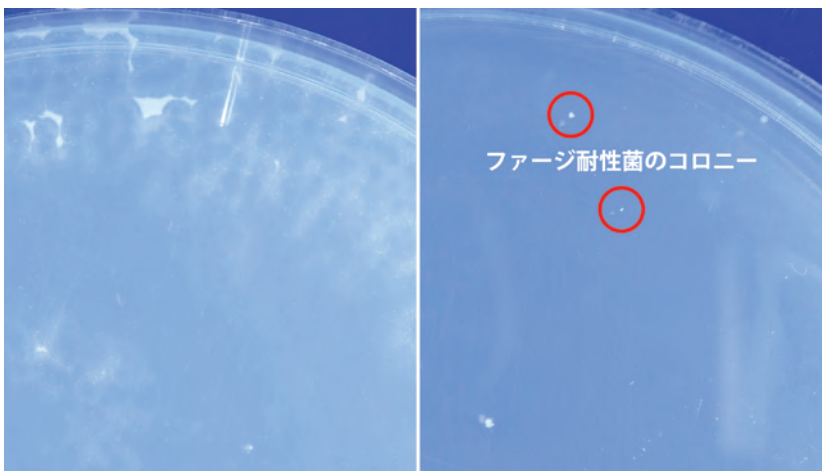


図3. Confluent な状態(左)と溶菌しすぎの状態(右)

Confluent の場合、指示菌の溶け残りがもやのように確認できる (写真上部)。溶菌しすぎた場合、全面が完全に溶菌し、点状のファージ耐性菌のコロニーが観察できる (図中の赤丸)。

補足 : SM, クロロホルムの添加 (操作 2, 3) について

映像 URL: https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph

ファージの操作で注意すべき点は、ファージ同士のコンタミネーションである。特に、同時に複数種のファージを取り扱う際には気をつけるべきである。コンタミネーションはいたるところで生じる可能性がある。ピペッティングその他でファージ溶液がエアロゾルや水滴となって飛散する可能性がある操作には特に注意を要する (図 4)。例えば、ファージのプレートに SM やクロロホルムを加える操作がこれに当たる。この場合には、あらかじめ滅菌した小試験管に必要な量の SM とクロロホルム数滴を入れておいて、プレート 1 枚に付きそれぞれ 1 本からプレートに注ぎ込むのが確実である。1 本のピペットを使って、複数種のファージのプレートに試薬を注ぎ込むのは避けたほうがよい。

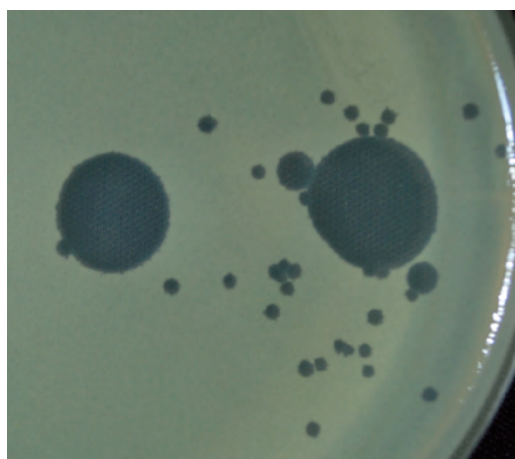


図 4. ファージのコンタミネーション

ファージ懸濁液を宿主入りの上層寒天培地表面にスポットした。右のスポットではわざとチップの先に風船を作り、そのままスポットしてみた。左のスポットの中にも飛沫が飛び込んでいるのが分かる。

7. ファージの保存

実験室内での保存は上記 SM 懸濁液をスクリーブバイアルに回収したものをそのまま冷蔵庫で保管するのが便利である。この方法でもファージによっては、数年は保存できるが、死滅しやすいものもあるので、凍結保存などでも保存しておくほうがよい。凍結保存は、ファージ懸濁液に凍結保護剤を加え、ディープフリーザーで凍結保存するのが便利である。

凍結乾燥機が使用できる研究室では、凍結乾燥や L-乾燥による保存も可能である。ファージ懸濁液を凍結保護剤と混ぜ (例えば 1:9 に混ぜる)、凍結乾燥用のガラスアンプルに分注し、凍結する。その後、真空凍結乾燥を行いアンプルを熔封する (熔封の具体的な操作は成書 [永井利郎・飯田元子, 2004] に記載されている)。L-乾燥法による保存については、NARO ジーンバンクでは採用していないので、文献を参照されたい (藤田, 2010)。それでも死滅しやすいものは継代培養により維持するしか方法がないが、継代培養では変異株の発生が問題となる場合がある。また、ファージに感染させた宿主を凍結乾燥または凍結する方法も効果がある (Golec et al., 2011; 井上・畔上, 2013)。凍結保存・凍結乾燥用の保護剤の種類とその調製法については p.2[2] 試薬類] に記載した。

8. 凍結品・凍結乾燥品からのファージの復元

バクテリオファージは凍結乾燥標品として、封入されたアンプルの形で NARO ジーンバンクから送られてくる。復元の方法は、凍結乾燥された細菌の方法と全く同じである (永井利郎・飯田元子, 2004)。ただし、ファージだけでは増殖しないので、宿主と共に培養する必要がある。例えば、凍結乾燥品を開封し、滅菌した液体培地で段階希釈し、二重平板培養法でプラークを形成させる。後述するスポットテストでもよい。また、細菌の復元と同じで、まず下層寒天培地にファージの懸濁液を画線し、その上に宿主入りの上層寒天培地を添加してもよい (p.8, 図 6)。

凍結品から復元する場合は、解凍しないで、滅菌した白金耳で凍ったファージ懸濁液の表面から氷をかき取

り、それを上記の方法でプラークを形成させるとよい。

以上までが、ファージの取扱法である。以下では、ファージの野外からの単離法などを解説する。

9. サンプルからのファージの分離

野外や食品からのサンプルの懸濁液を作成し、遠心分離で不要物を取り除いたのち、フィルターに通したものを段階希釈し、宿主細胞とともに「5. 二重平板法によるファージの計数」と同じ要領でプラークを形成させる。

サンプルに含まれるファージの数が少ない場合には、サンプル懸濁液をフィルターに通したのち、宿主とともに液体培養し、ファージを増殖して分離するとよい。サンプルの懸濁液から直接分離したい場合は、宿主以外の微生物が増殖しない条件下で操作を行うことになる。例えば、宿主の薬剤耐性変異株を取得し、その薬剤の存在下でファージを分離するのが有効な方法となるであろう。

10. プラークからのファージの回収

映像 URL: https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph

まばらにプラークが形成された平板培地に、パスツールピペット（または、マイクロピペットのチップの先端を切り落としたものを利用する）をプラークの中心に垂直に立て、プラークを寒天ごとくりぬくような感じで回収する。回収したプラークは、適当に希釈して二重平板法でプラークを形成させる。この単離操作を3回繰り返し、純化を行う。

プラーク表面に滅菌した竹串（または白金耳）の先端を接触させた後、小試験管に入れた宿主に接種し、二重平板法でプラークを形成させてもよい。白金耳の場合、そのまま画線培養に進めてもよい。

11. スポットテスト

映像 URL: https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph

ファージ懸濁液中のファージの生残や宿主域を調べるのにはスポットテストが簡単でよい。

1. 指示菌のみを上層寒天培地に混ぜ、平板培地に重層し、固化させる。
2. 表面を軽く乾燥させて、ファージ懸濁液を 5 μ l 滴下する。表面を乾燥しないで使用した場合、滴下したファージ懸濁液が広がってしまう可能性が高くなる。特に、一枚のプレートにいくつものファージ懸濁液を滴下する場合（例えば、プレートを 16 区画に分けて滴下する場合）は隣のスポットと混じってしまう可能性がある。それを避けるためには上層寒天培地表面の乾燥は欠かせない。滴下はチップの先に水滴を作らせ、それを上層寒天に接触させることで可能だが、チップが宿主細胞に汚染される可能性があるため、チップを使いまわすのを避けるか、小分けしたファージ懸濁液を使用するなどして汚染に備えたほうがよい。
3. 培養後プラークの形成を観察する。

また、ファージ懸濁液の段階希釈を作っておき、それらを指示菌入りの上層寒天に滴下し、生じたプラーク数を数えることで、おおよそのファージの濃度を知ることができる。

宿主域を調べる際の注意点としては、ファージの増殖に用いた宿主の抗菌物質生産である。抗菌物質も対象菌の生育を抑制する可能性があるため、それを指示菌にスポットすると、見かけ上プラークと同じ溶菌斑を形成する。それを簡単に区別するには、上記の段階希釈をそれぞれスポットして希釈倍率の高いところでプラークが形成されるかどうかを見ればよい。抗菌物質の場合は希釈を進めると、高濃度のところでは溶菌斑が作られるが、希釈に伴い抗菌活性が低下して濁った溶菌斑を形成するだけで、個々のプラークを観察するまでには至らない（図 5）。

なお、複数種のファージを同一プレートにてスポットテストを行い、形成されたプラークからファージを回収することは、コンタミネーションの観点から避けるべきである (p.6, 図 4)。

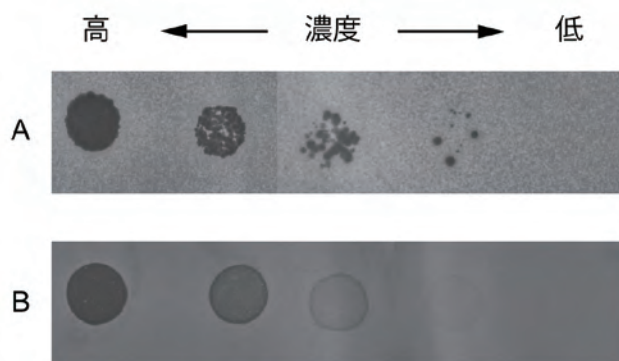


図 5. スポットテストの結果

A. バクテリオファージ希釈液のスポット.

B. 抗菌物質希釈液のスポット.

いずれも左から右へ段階希釈したものをスポットした.

12. ファージの画線培養

細菌の単一コロニーを単離する場合に、白金耳で細菌菌叢を取り、それを平板培地上に画線し、さらにその白金耳を火炎殺菌し、冷却後、画線したところを一部横切るような形で、別の部分を画線していくことで単離する方法がよく用いられる. それと同様に、ファージ懸濁液をマイクロピペットか白金耳でとり、平板培地に画線し、その上に宿主を混合した上層寒天培地を重層することで、単一のプラークを形成させることができる (図 6). 重層するときには、最後に画線したところから寒天を流し込み、軽く平板を縦方向と横方向に一回ずつ傾けて、上層寒天培地を平板に行き渡らせて固化するとよい. あまり、上層寒天培地をまんべんなく行き渡せることにこだわると、最初に画線したところから多量のファージが周りに拡散していき、単一プラークが得られなくなる.

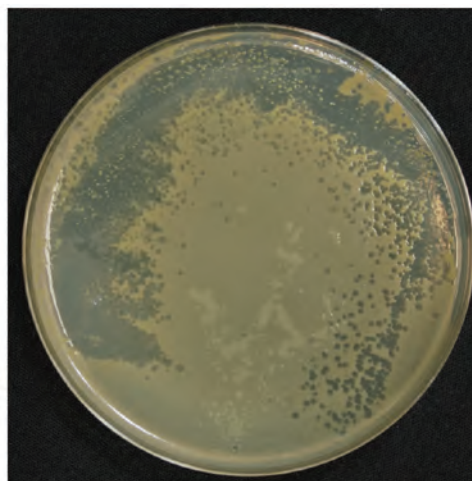


図 6. ファージの画線

左の順番のように、ファージ懸濁液を火炎滅菌した白金耳で画線する. 画線後は白金耳を火炎滅菌して次の画線を行う. 宿主の入った上層寒天をファージが一番希釈された区域から注ぐ. 右図は実際例を示す.

13. 一段増殖実験

低濃度のファージを宿主細胞に感染させ、遊離のファージを遠心分離などで取り除いた後に、細胞を培養すると、しばらくはその培養液のファージ濃度 (正確には二重平板法で求めたプラーク数) は増加しないが、ある時点から増加し始め、しばらくたつと増加がストップする (図 7). しかし、更に細胞の培養を続けると再びファージ濃度が増加し始める. この様子を観察するための実験が一段増殖実験である. ファージが細胞に感染し、その細胞内でファージが複製される間は、ファージ濃度は増加しない (一つの細胞にファージが複数

個存在したとしても、二重平板法で生じるプラークは一個だけである)。細胞内で増加したファージが菌体内から飛び出すと、ファージ濃度も増加する。ファージを宿主に感染させ、ファージ濃度が増加するまでの時間は、ファージ濃度測定のためのファージと宿主との接触時間について適切な時間を見極めるのにいろいろと示唆を与えてくれる。また、1段階の増殖でファージ濃度の増加からはファージのバーストサイズ(宿主細胞の中で何個のファージが複製されるか)が分かる。

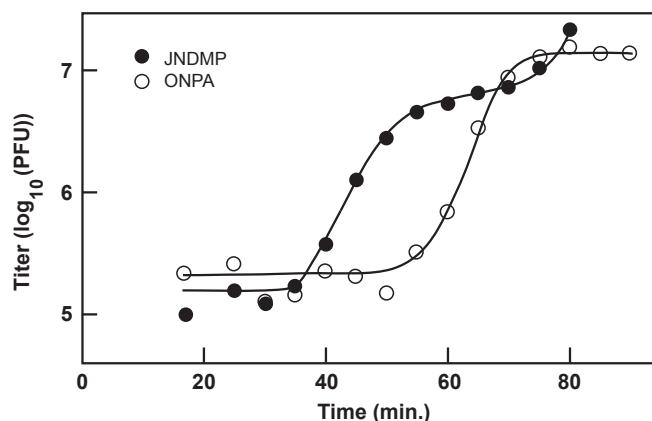


図7. ファージの一段増殖実験

縦軸にファージ数、横軸に時間をとった。2種類のファージの結果が描かれているが、ファージ数が増加するまでの時間がそれぞれ異なっている。(Nagai and Yamasaki, 2009. 日本食品科学工学会の許可を得て転載している)

14. 宿主のファージ耐性菌とトラブルシューティング

宿主を培養または保存している間にファージ耐性菌が生じてくることがある。多量のファージと宿主を二重平板で培養すると、耐性菌のコロニーが多数確認できることがある(p.5, 図3)。また、宿主を液体培養し、対数増殖期の途中でファージに感染させると、しばらくは菌体が増殖するが、その後、ファージに感染した細菌が溶菌し濁度は急激に低下する。しかし、その後、少数の生き残ったファージ耐性菌が増殖するため濁度は再び上昇するため、図1(p.1)のような増殖曲線を描く。

宿主に耐性菌が無視できない割合で存在すると、いつもはクリアなプラークを形成するはずのファージが、濁った(turbid)プラークを形成する(最悪の場合には、ある日突然プラークを形成しなくなるということもありうる)という現象として問題が発覚する。その問題の対処のためには、実験開始の前に宿主の単コロニー分離を行い、確実にプラークを形成した宿主を保存(凍結保存が一般的である)しておくことが必須である。実験中は継代培養で宿主を維持するのが便利だが、異常が見られた場合には凍結保存の宿主を復元して、それを使用するようにする。ファージ耐性菌が優勢になってしまった状態で、そこからファージ感受性菌を選択するのは困難である。

15. カルチャーコレクションへの寄託

研究者が分離したファージをカルチャーコレクション(微生物の保存機関をそのように総称する。https://www.jsmrs.jp/ja/member_collection/)に寄託する際には、そのカルチャーコレクションに宿主となる細菌と合わせて寄託することを強く勧める。また、プラークが生じているプレートもあわせて送ると、カルチャーコレクション側でプラークの状態が確認できるので、その後の増殖や保存がスムーズに進められる。

16. ファージを取り扱う上でのポイント

最適の条件を設定するには、条件の数が多いので、ある程度割り切って条件を決めた方がよい。ただし、宿主の生育条件、要求栄養素、宿主、ファージ安定性は最悪プラークが生じないことになるので条件の確認は必須である。誤差も考えると有効数字を必要以上に高くする必要は無い。結局のところ、最適近くの実行しやすい条件で、実験中はその条件は動かさない、というのが肝要である。

ファージの取り扱い中は、他のファージとのクロスコンタミネーションには気をつける。特に、器具や培地の使い回しには格段の注意を要する。微生物全般に言えることだが、継代培養を繰り返してファージや宿主細胞を維持することは、変異やコンタミネーションの観点から極力避けるべきである。

17. 映像資料サマリー

本マニュアルの幾つかの手法については web サイト (https://www.gene.affrc.go.jp/?manu_mc_ph) よりその映像を見ることができるが、本文におけるその箇所にはマーク **映像** で表示した。その映像のダイジェストを参考までに以下に掲載した。

1) 上層寒天培地の重層 (p.4)



1. 溶かした上層寒天培地を保温しておく。



2. ファージと宿主の培養液に上層寒天培地を加える。



3. 指で試験管の底を軽くはじいて攪拌する。



4. 下層寒天培地に注ぐ。

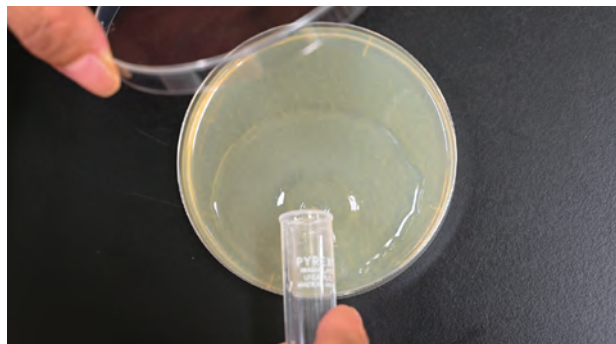


5. 混合液がプレート全面に行き渡るように傾けながら回す。

2) SM, クロロホルムの添加 (p.6)



1. ドラフト内で、試験管に分注した SM にクロロホルムを滴下する.



2. 上層寒天培地に注ぐ.



3. パスツールピペットで SM をフィルター付きのシリンジに回収する.



4. フィルターでろ過する.

3) パスツールピペットを用いたプラークからのファージの回収 (p.7)



1. プラークに垂直にパスツールピペットをたて立てる.

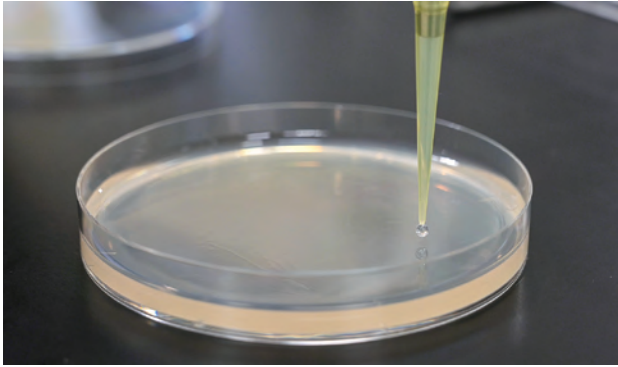


2. 寒天をくりぬく.

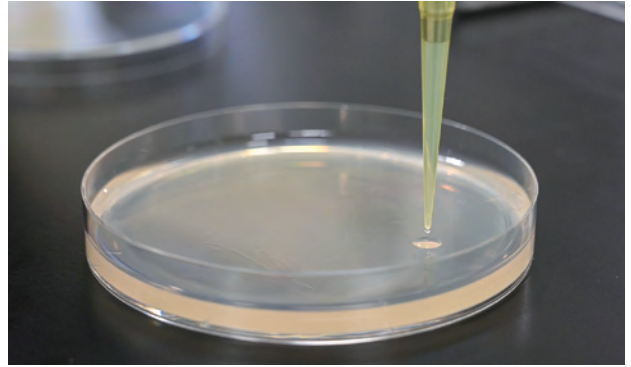


3. SM に寒天を回収する.

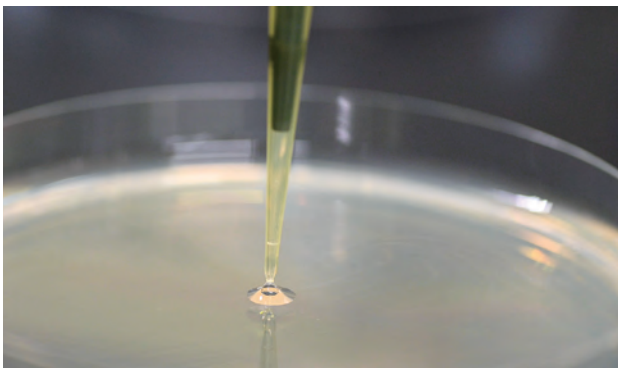
4) スポットテスト (p.7)



1. チップの先にファージ懸濁液を押し出す.



2. 上層寒天培地にスポットする.



3. 泡が入ると汚染の元になる.

18. おわりに

本マニュアルを作成するに当たり、実務の面で協力いただいたジーンバンク微生物部門 井垣善美氏、金澤智恵子氏をはじめとするスタッフの皆様に厚く御礼を申し上げます。

ジーンバンクで現在保存されているファージについては下記の web サイトで検索していただきたい。

https://www.gene.affrc.go.jp/?db_mc

19. 参考文献

- Ackermann, H.-W. et al., (2004). Long-term bacteriophage preservation. WFCN Newslett. 38: 35-40.
- 藤田克利 (2010). バクテリオファージの保存方法について. 日本微生物資源学会誌 26 : 97- 101.
- Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M.S., Gozdek, A., Łoś, J.M., Węgrzyn, G., Łobocka, M.B., and Łoś, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. J. Microbiol. Methods 84: 486-489.
- 井上康宏・畔上耕児 (2013). アブラナ科黒腐病菌とそのファージ. 微生物遺伝資源利用マニュアル 34 : 1-11 .
- 永井利郎・飯田元子 (2004). 植物病原細菌の保存法. 微生物遺伝資源利用マニュアル 17 : 33-40.
- Nagai, T. and Yamasaki, F. (2009). *Bacillus subtilis* (natto) bacteriophages isolated in Japan. Food Sci. Technol. Res. 15: 293-298.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 田部井英夫 (1990). ファージ試験法. (納豆試験法研究会編) 納豆試験法, 光琳, 東京, pp.70-73.

遺伝資源センター資料

令和元年 12 月

December, 2019

微生物遺伝資源利用マニュアル（42）

2019 年 12 月 24 日 印刷

2019 年 12 月 25 日 発行

編 集 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
遺伝資源センター

発行者 加藤 浩

Genetic Resources Center
National Agriculture and Food Research Organization

〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

<https://www.gene.affrc.go.jp/>

バクテリオファージの取扱法

永井 利郎・山崎 福容
農研機構 遺伝資源センター

目 次

1. はじめに	1
2. 使用する器具・試薬	2
3. 下層寒天培地の準備（通風乾燥）	3
4. 宿主の増殖	3
5. 二重平板法によるファージの計数	4
6. 二重平板法によるファージの増殖（ファージ懸濁液の調製）	5
7. ファージの保存	6
8. 凍結品・凍結乾燥品からのファージの復元	6
9. サンプルからのファージの分離	7
10. プラークからのファージの回収	7
11. スポットテスト	7
12. ファージの画線培養	8
13. 一段増殖実験	8
14. 宿主のファージ耐性菌とトラブルシューティング	9
15. カルチャーコレクションへの寄託	9
16. ファージを取り扱う上でのポイント	9
17. 映像資料サマリー	10
18. おわりに	12
19. 引用文献	12

2019 年 12 月

編 集 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター
発行者 加藤 浩

