

百日咳菌に関する研究

第1報：新鮮分離株と陳旧培養株の代謝について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷友次教授)

高 橋 啓

(昭和30年11月21日受附)

本論文の要旨は昭和27年9月21日新潟における第6回日本細菌学会北陸地方支部会及び昭和28年5月15日新潟における第26回日本細菌学会の席上これを報告した。

Studies on Haemophilus Pertussis

1. On the Metabolism of Freshly Isolated Strains and Laboratory Strains of *H. pertussis*

Hiraku Takahashi

*Microbiological Department, Medical School,
Kanazawa University.
(Prof. Tomoji Tani)*

緒 言

百日咳菌の代謝の問題に関しては、近年多数の業績が発表された。液体培地における百日咳菌の栄養要求の問題については、Hornibrook¹⁾の研究に始まり、Verwey²⁾, Cohen & Wheeler³⁾等の研究が相次いで発表され、本邦においても、桑原⁴⁾, 関⁵⁾, 今村⁷⁾、善養寺⁸⁾⁻¹¹⁾, 新井¹²⁾⁻¹⁶⁾, 浅野¹⁷⁾, 福見¹⁸⁾等の報告があつて、それぞれ百日咳菌の発育に有効な数種のアミノ酸及び発育因子が挙げられている。阿部¹⁹⁾は Warburg 検圧法により、アミノ酸、糖及び糖中間代謝産物について実験し、それらの利用度を判定して報告した。しかしこれらを通観すると、現在迄になされて来た報告は殆んど Leslie & Gardner

²⁰⁾の所謂 Phase I に相当する菌株を以て実験したものである。

著者は百日咳菌の代謝様式を研究する方法として、今迄用いられて来た新鮮分離株と共に、陳旧培養株の代謝様式をも追求し、百日咳菌が exacting な性質の菌から nonexacting な菌へと変異する時に、その代謝の上に如何ような変化が現われるかを検討し、こうした観点から百日咳菌の代謝形態を把握しようと試みた。又、同時に液体培地に発育した百日咳菌の代謝様式についても検討を加え、これと固形培地発育菌との關聯性などについて検べたので、此処ではこれらのことを述べて見たいと思う。

供試菌株及び実験方法

本実験に使用した菌株は、新鮮分離株(以下新鮮株と略記する)としては、群馬大学医学部微生物学教室より分与を受けた、百日咳菌22490株, 18323株, 40103株及び41405株の Bordet-Gengou 培地継代25代以内のものを使用し、陳旧培養株(以下陳旧株と略記する)としては、当教室において10年以上に亘つて保存継代されている伝研株、コイ株及び烏森株を使用した。こ

れらの陳旧株のうち、伝研株、コイ株は共に *H. pertussis* であつて、現在では普通寒天培地上でも 35°C, 24時間培養で充分発育可能になつている菌株で、その生物学的性状はすべて Leslie & Gardner の所謂 Phase IV に相当するものである。亦、烏森株は、先に山川²¹⁾が使用発表したように、*B. bronchisepticus* であつて、百日咳菌と比較の意味で実験に供した。

本実験に使用した培地は、新旧兩種菌株共、すべて Bordet-Gengou 培地変法（原法に 1% に照内ペプトンを加え、血液は 0.4% クエン酸ソーダ加牛全血液を 20% の割合に加えたもの、以下これを BG 培地と略記する）を使用した。亦、炭末加半合成培地は、善養寺¹³⁾の組成に従つて調製した。

陳旧株においては、BG 培地の他に、これと比較の意味で血液を抜いた馬鈴薯グリセリン寒天培地をも使用した。

培養条件は、35°C、72時間培養（陳旧株においては 48時間）を基準とし、以上の条件下に発育した菌を下記のように集菌し、菌液として使用した。

実験方法は、Warburg 検圧法によつて、菌の各種基質に対する酸素吸収量を測定し、これによつて菌の各基質に対する利用度を判定した。実験に使用した菌浮游液は、上記の培地に所定時間培養した菌を大形渦巻

白金耳で以て集菌して蒸溜水に浮游させ、これを 6000 r.p.m. 30分遠沈して菌体を集め、同様の手技で更に 1 回蒸溜水で菌体を水洗して後、これを蒸溜水に再浮游させ、光電管比色計を用いて、2.5mg N/ml の菌浮游液として使用した。各種基質は $\frac{1}{10}$ -M 溶液或いは $\frac{1}{50}$ -M 溶液を用い、次のような割合に検圧計内に混合して実験に供した。即ち、検圧計 Cell 容器の側室には 2.5mg N/ml の菌浮游液 0.4ml を入れ、主室には基質 0.5ml、 $\frac{1}{5}$ -M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml 中心室には 20% KOH 0.2 ml を入れ、主室に蒸溜水を加えて全量を 2.0ml とする。振盪水浴の温度は 37.5°C 振盪数 120回/分、振幅 5cm とし、測定前、15分間水浴中で振盪し、検圧計内外の温度平衡を待つて、側室の菌浮游液を主室に混合して測定を開始した。その他の検圧法術式は、すべて Umbreit et al²⁰⁾ の示す所に従つた。

実験成績

I. アミノ酸について。

本実験に使用したアミノ酸の種類及びその結果は第 1 表にこれを示した。

第 1 表中、陳旧株においては新鮮株と比較して、各アミノ酸に対する酸化能が全般的に増大しているのが認められるが、兩種菌株間にはアミノ酸利用の点では特に意義のあるような質的差異は認め難い。

しかし乍ら、以上の実験から、兩種菌株を通じて最も力源として利用されるアミノ酸はグルタミン酸であることが窺われ、プロリン、アスパラギン、アスパラギン酸及びセリンなどもかなり力源として利用されるものと考えられる。

II. 糖について。

本実験に使用した糖は第 2 表に示したように、ブドウ糖以下 9 種類を用いたが、表に見るように、陳旧株においても糖は酸化分解されないことを認めた。元来、百日咳菌は糖を分解せずとされているが、この性質は菌が全く変異して nonextracting な菌株となつてもやはり保持されていることを認めた。

第 1 表 新鮮分離株及び陳旧培養株におけるアミノ酸 α 化の比較

菌 株	酸 素 吸 收 量	
	新 鮮 株 18323株10代	陳 旧 株 伝 研 株
基 質	QO ₂	QO ₂
d-グルタミン酸	172	424
l-アスパラギン酸	50	96
l-アスパラギン	130	138
l-プロリン	76	196
dl-セリン	32	94
8-アラニン	20	26
グリシン	32	90
α -アミノ酪酸	26	44
l-アルギニン	66	50
l-リジン	16	20
dl-バリン	20	20
l-ロイシン	0	4
dl-イソロイシン	0	6
β -フェニールアラニン	4	26
dl-メチオニン	4	4
dl-ヒスチジン	2	10
タウリン	0	20
dl-スレオニン	12	64
dl-ノルバリン	6	10

菌浮游液 : 1mgN 基 質 : 10 μ M

第2表 陳旧培養株の糖酸化
(伝研株及びコイ株)

基質	酸素吸収量
	QO ₂
グルコース	0
ラクトース	0
ガラクトース	0
シュークロース	0
マルトース	0
アラビノース	0
ラムノース	0
トレハロース	0
キシロース	0

菌浮游液 : 1mgN
基 質 : 50μM

Ⅲ. 糖中間代謝産物 (有機酸) について.

以上の実験から, アミノ酸及び糖においては, 百日咳菌新鮮株と陳旧株との間には殆んど

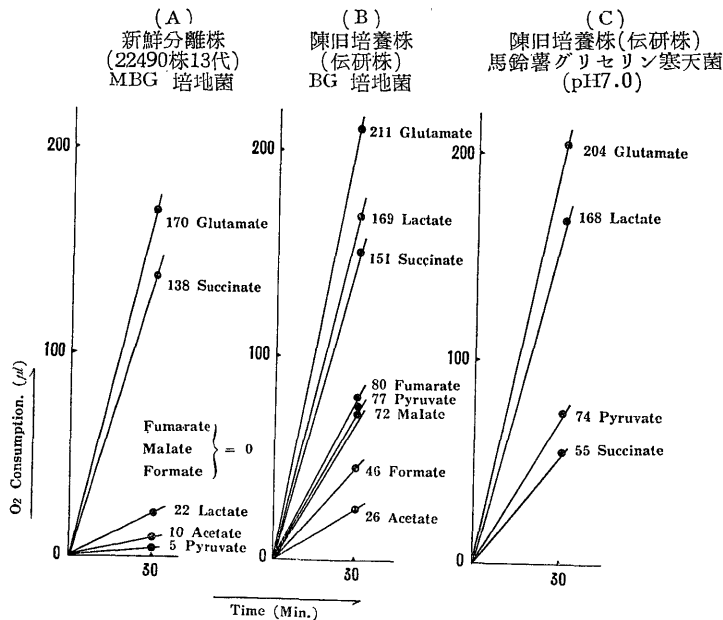
代謝上の質的差異を認め得ないのであるが, 以下述べる有機酸の酸化においては兩種菌株間はかなり明瞭な差異が認められる. 即ち第1図(A)に示すように, 新鮮株においては, 特異的に酸素吸収量の大きい基質はコハク酸であつて, 他のマリック酸, フマル酸, 焦性ブドウ酸, 醋酸, 蟻酸及び乳酸などはコハク酸に較べて遙かに少ない酸素吸収を示す. この成績は阿部¹⁹⁾の成績に略々一致しているが, 陳旧株においては第1図(B)に示すように, 新鮮株に比して, 全般的に各基質に対する酸化能が増大しているが, 就中, 乳酸の場合の酸化能の増大は特に著明であるのを認めた.

陳旧株におけるこの乳酸酸化能の増大は特に著明な兩種菌株間の相違であつて, 著者が実験に使用した陳旧株3株(B, bronchisepticusにおいては乳酸の他に蟻酸酸化が著明である.)において常に安定して認められた現象である.

第1図 新旧兩種菌株における有機酸々化

(いずれも endogenous respiration 値を差引く)

菌浮游液 : 1mgN. 基質 : 50μ



陳旧株について同じ菌株を馬鈴薯グリセリン寒天平板上及び普通寒天平板上より集菌した場合について見ると、第1図(C)に示すように、乳酸に対する酸素吸収はBG培地同様に大きい、コハク酸の場合の酸素吸収量は著明に減少する成績を得た。この点陳旧株の乳酸酸化能の増大は培地の種類如何によらず安定なものであると考えられる。

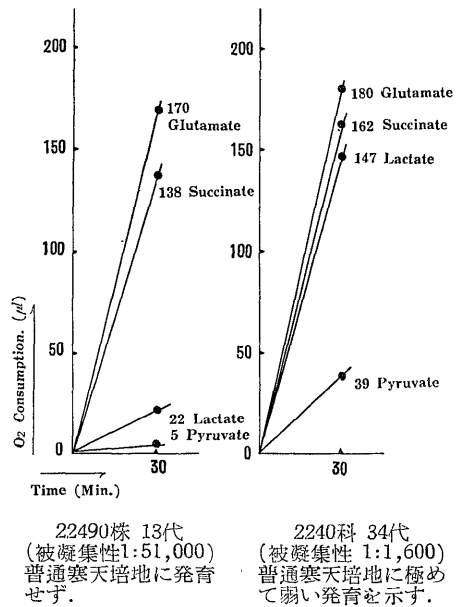
IV. 同一菌株における乳酸酸化能の増大について。

実験Ⅲにおいて、陳旧株では乳酸酸化能が新鮮株に較べて著明に増大していることを認めたのであるが、この現象が同一百日咳菌菌株の継代陳旧化に伴って起るであろうかを試験することは必要である。

この実験には予め乳酸酸化能の低いことを確めた新鮮株22490株-13代をとり、その被凝集性を新鮮株標準免疫血清を以て測定し、この菌株をBG培地に継代して、その被凝集性が当初の凝集価1:51000より1:1600(BG培地34代)に低下したとき、再びその乳酸酸化能を検べた。同一菌株における乳酸酸化能の変化と、被凝集性及び継代数との関係は第2図にこれを示した。

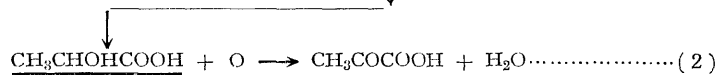
即ち継代数が13代より34代となる間に被凝集性は1:51000から1:1600と低下し、逆に乳酸酸化能は著明に増大する成績を得た。

第2図 同一菌株における乳酸酸化能の変化と継代数及び被凝集性との関係

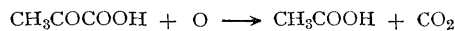


そこで著者はこの乳酸酸化能の増大を百日咳菌菌株の陳旧化を明瞭に標示する一現象と見做して、その mechanism について次のような検討を加えた。

V. Pyruvic acid dismutation の有無について
先に Krebs³³⁾ は Gonococcus, Staphylococcus について、次に示すような酵素反応が成り立つことを発表した。



(1) (2) 式より。



即ち焦性ブドウ酸が酸化され、結果としてC O₂を出して醋酸になる途中に(1)式及び(2)式のように乳酸を経過する反応(所謂 Krebs の Pyruvic acid dismutation)である。著者はこの酵素反応の途中に出来る乳酸に着目した。今、百日咳菌がグルタミン酸を酸化する途中に焦性ブドウ酸を経過すると思われるので、陳旧株に

おいて、或いはこの Pyruvic acid dismutation の経路が拓けており、その途中に出来る乳酸のために、適応的に乳酸酸化酵素が増大しているのではなかろうかと考え、Krebs の実験方式に従い、先ず(1)式について実験した。

(1)式は嫌氣的に進行する酵素反応であるから、検圧計内の空気をN₂ガスで置換した。検圧

計 Cellの副室に4%クエン酸をとり、反応終了後これを主室に注ぎ発生するCO₂総量を測定した。しかし乍ら、その結果は、CO₂の発生が零であり、百日咳菌陳旧株の乳酸酸化能の増大は Pyruvic acid dismutation の経路の開拓によるものでないことが判つた。

VI. 液体培地における百日咳菌の酵素形態について。

液体培地における百日咳菌新鮮株の酵素形態については阿部¹⁹⁾の報告があるが、著者は阿部の成績中、炭末加半合成培地発育菌のグルタミン酸酸化能が低い点に疑問を持ち、且つ亦、新鮮株を液体培地に継代するときは、その被凝集性がBG培地におけるよりも早期に低下する²⁴⁾と考えられる所から、液体培地に発育した新鮮株の酵素形態を、BG培地に発育した新鮮株、陳旧株のそれと比較検討するために次の実験を行った。

この実験に使用した百日咳菌菌株は22490株、18323株の2株であり、22490株はBG培地15代、18323株は10代より炭末加半合成培地に移植継代して実験に供した。

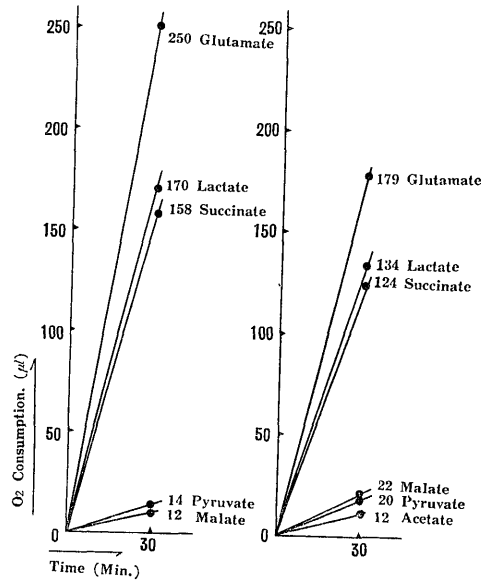
炭末加半合成培地は善養寺²⁵⁾の培地組成に準じて調製し、115°C、15分加熱滅菌したものを使用した。

今これらの菌株を炭末加半合成培地に移植継代5~10代で充分この培地に適応したと思われる頃を目標とし、35°C、5日培養(1日1回培地を振盪)の培養液をよく振盪混和して後、5,000 r.p.m. 10分間遠心沈澱して沈渣の炭末を除去し、上部の菌浮遊液をとって、6000 r.p.m. 30分間遠沈して菌体を集め、更に蒸留水で菌体水洗2回の後、これを蒸留水に再浮遊して2.5mgN/mlの菌浮遊液として実験に用いた。

今、炭末加半合成培地継代8代目の22490株と10代目の18323株について実験した結果を第3図に示したが、図に示すように、この場合両株共にグルタミン酸、乳酸及びコハク酸の酸化能が著明に大きく、フマル酸、マリク酸、焦性ブドウ酸等に対する酸化能も少ない乍ら稍

増大する傾向が認められる。

第3図 炭末加半合成培地発育菌の酵素形態
基質：50μM. 菌浮遊液 1mgN.



22490株 (炭末加半合成培地8代) 培養：35°C, 5日間
18323株 (炭末加半合成培地10代) 培養：35°C, 5日間

BG培地上発育菌に較べて特に著明なこの乳酸酸化能の増大は、炭末加半合成培地に継代3代目の菌においても既に著明に認められた。

この成績中、グルタミン酸、コハク酸及び焦性ブドウ酸に関する成績は阿部¹⁹⁾によるそれとは著しく異なっている。即ち阿部の成績を著者のそれと比較すれば第3表の通りである。

第3表

	阿部◎	著者*
	菌液 0.73mgN/ml	菌液 2.5mgN/ml
	酸素吸収量(μl)	酸素吸収量(μl)
	30分値	30分値
コハク酸	14	158
マリク酸	4	12
焦性ブドウ酸	57	14
d-グルタミン酸	14	250

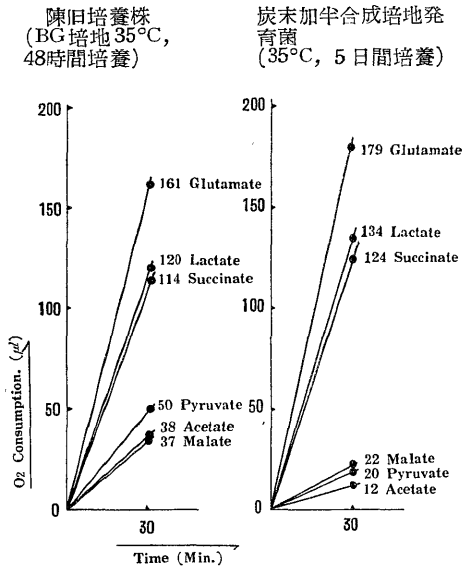
◎ 37°C, 8日間培養, 文献19)による。

* 22490株 (炭末加半合成培地8代) 35°C, 5日間培養。

阿部と著者との実験方法上の大きな差異は、その培養時間にあると思われ。著者も阿部のように培養7日或いは8日の菌をとつて実験した結果は、培養がこれら長時間に亘るものでは、しばしばグルタミン酸及びコハク酸に対する酸化能が著明に低下する場合に遭遇した所から、炭末加半合成培地においても、若し適当な培養条件のもとに菌をとるならば、そのグルタミン酸及びコハク酸酸化能はBG培地同様大きいと考えられる。焦性ブドウ酸については、純度89%のものを使用して実験を反復したが、数回の実験において常に低い酸化能を示し、これは基質濃度及び菌株によらず不変であつた。しかし乍ら、この実験において著者が最も興味深く思うことは、この炭末加半合成培地発育5日目の菌の酵素形態を、培地上に発育した新旧兩種菌株のそれと比較するとき、炭末加半合成培地に発育した新鮮株の酵素形態がBG培地上に発育した陳旧株のそれに全く相似していることである。(第4図) 即ち、新鮮株をBG培地より炭末加半合成培地に移植するときは、その酵素形態が速かに新鮮株の酵素形態から陳旧株の酵素形態へと移行するという事実である。此処で

はこの事実を指摘するに留め、この事の意義に關しては改めて考察の項で言及したいと思う。

第4図 炭末加半合成培地発育菌(新鮮株)と培地発育陳旧株との酵素形態比較
(菌浮液: 1mgN, 基質 50 μ M)



考 察

著者は百日咳菌新旧兩種菌株の代謝を比較することにより、そこに基質代謝の上で質、量的差異を見出すことが出来るならば、この菌の特性である exacting \rightarrow nonexacting の変化における代謝上の変異過程を知り得る可能性があり、これより逆のぼつて百日咳菌(新鮮株)の代謝そのものを窺い知ることも亦可能と考える所から以上のような実験を行つた。実験Iにおけるアミノ酸に関するものはすべて多少の量的差異に留まるものであつたが、実験IIIの糖中間代謝産物において認められた陳旧株における乳酸酸化能の増大という事実は兩種菌株間における注目すべき差異であるといえよう。而もこの事実は同一菌株の百日咳菌の陳旧化に伴つて、その

発育能の増大、標準血清による被凝集性の低下と相俟つて出現するという事実から、著者は乳酸酸化能の増大を百日咳菌菌株の陳旧化を知る上の指標の一つとして考えている。しかし乍ら、その増大の mechanism に関しては、著者が先に考えていたような Pyruvic acid dismutation の経路の開拓によるものではあるまいかという予想は否定された。これによつて全く別な次のような考えも現在予想している。

即ち著者の実験は intact cell を使用しているのであるから、実際に細菌体内の酵素活性では新旧兩種菌株間にはさして差異がなくて、寧ろ各種基質が酵素に到達する迄の菌体被膜の permeability の相違がこれを大きく支配している

と考へた方が好都合なように見える。即ち1相菌に見る被凝集性は capsule と密接な関係があり、この capsule が permeability に関係してはすまいかと想像される。第2図はこの関係を裏書きするものと考えられ、この場合 BG 培地中に豊富に存在するコハク酸のような基質では両株間に余り差はなく、capsule と permeability との間の関係を最も明らかに指示するものが乳酸酸化能の大小ではあるまいかと考えられる。

著者が実験Ⅶにおいて示したように、炭末加半合成培地に移植した新鮮株の酵素形態が速かに陳旧株の酵素形態に移行するという事実も、新鮮株の permeability を制約している荚膜様物質が液体培地中では溶失するために起る現象ではなからうかと考えられる。

結 論

本実験の結果を総括して次の結論を得た。

(1) アミノ酸酸化酵素については新旧両種菌株の間には質的差異は認められず、量的に陳旧株において各アミノ酸酸化能の増大が認められ、又、両種菌株を通じて力源として最も利用されると考えられるアミノ酸はグルタミン酸であり、プロリン、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン等もかなり力源として利用されるものと考えられる。

(2) 糖類は新旧両種菌株共、全くこれらを酸化分解しない。

(3) 糖中間代謝産物については、陳旧株において、乳酸酸化能の著しい増大が認められ、この乳酸酸化能の増大は同一菌株の百日咳菌の陳旧化と、標準血清に対する抗原性の低下に関係があり、百日咳菌菌株の陳旧化を知る上の酵素学的な一指標であると考えられる。

文 献

- 1) J. W. Hornibrook : Pub. Health Reports, 54 : (1939).
2) J. W. Hornibrook : Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 45 : 598, (1940).

百日咳菌を取扱う者にとつて、常に配慮を要することの一つに菌株の陳旧化防止という問題がある。殊に百日咳ワクチン製造上この問題はワクチンの効果良否の問題にも直結して極めて重要であろう。近時、百日咳ワクチンは従来の Bordet-Gengou 培地が高価且つ製法繁雑な所から、次第に液体培養ワクチンの線に切り変えられる傾向にあり、現に米国においては既にこの製法に切り変えられている現状である。今、ワクチン製造上における液体培地の適否はさておき、此処に示したように、液体培地に発育した菌では、少なくとも酵素学的に菌株の陳旧化が早期に起るといふことは大いに考慮すべきことではなからうかと思われる。

(4) 陳旧株におけるこの乳酸酸化能の増大の mechanism について検討を加え、これが所謂 pyruvic acid dismutation によるものでないことを確かめ、増大の mechanism について更に考察を加えた。

(5) 炭末加半合成培地に発育した新鮮株の酵素形態は速かに陳旧株の酵素形態に移行すること、即ち液体培地に百日咳菌を移植継代する時は酵素学的に菌株の陳旧化が早期から認められ、この事は乳酸酸化能の増大を指標として認知されることを指摘し、この意義について考察を加えた。

稿を終るに当り、終況御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師、谷友次教授に深甚の感謝を捧げますと共に、実験に当り、種々御懇切な御指導御教示を頂いた西田助教授に深く謝意を表します。

- 3) W. F. Verwey & D. N. Sage : J. Bact., 49 : 520 (1945).
4) S. M. Cohen & M. W. Wheeler : Am. J. Pub. H., 36 : 371 (19

- 46). 5) 桑原章吾 : 最新医学, 3 : 337, (昭23). 6) 関悌四郎 : 日本衛生学雑誌, 4 : 28, (1945). 7) 今村晋 : 医学通信, 5年, 222号, (1950). 8) 今村晋 : 医学通信, 6年 : 238号, (1951). 9) 善養寺浩 : 総合医学, 5 : 1067, (1948). 10) 善養寺浩 : 総合医学, 6 : 912, (1949). 11) 善養寺浩 : 総合医学, 6 : 1176, (1949). 12) 新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 7 : 343, (1952). 13) 新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 7 : 481, (1952). 14) 新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 7 : 557, (1952). 15) 新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 8 : 13, (1953). 16) 新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 8 : 175, (1953). 17) 浅野浅雄 : 日本細菌学雑誌, 7 : 400, (1952). (学会報告). 18) H. Fukumi, E. Sayama, J. Tomizawa and T. Uchida : Jap. J. Med. Sci. Biol., 6 : 587, (1953). 19) 阿部貞太郎 : 日本細菌学雑誌, 7 : 81, (1952). 20) Leslie & Gardner : J. Hyg., 31 : 423, (1931). 21) 山川匡男 : 十全会雑誌, 45 : 2650, (昭15). 22) W. W. Umbreit., R. H. Burris & J. F. Stauffer : Manometric Techniques and Tissue Metabolism, (1951) Burgess Publishing Co., Minneapolis, America. 23) Krebs H. A. : Bioch. J., 31 : 661, (1937). 24) 善養寺浩・新井俊一 : 日本細菌学雑誌, 7 : 629, (1952). 25) 善養寺浩一 : 総合医学, 8 : 337, (1951).