

百日咳菌に関する研究(補遺)

百日咳菌発育に対する活性炭末の作用機序に関する検討

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)

この論文の内容は、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の席上報告した。

Studies on Haemophilus pertussis. (Supplement)

On the Mechanism of Enhanced Growth of
H. pertussis by Activated Charcoal.

Hiraku Takahashi

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

緒 論

百日咳菌の培養基としては、固形培養基では Bordet-Gengou 培地が一般に用いられ、継代培地、集菌用培地として、種々の実験又はワクチン製造上大きな役割を果している。

しかし乍ら、Bordet-Gengou 培地は、培地製造過程の上に種々複雑な手技を要し、就中、生の無菌血液を必要とする点において、特にワクチン製造上与える制約は大きく、これがこのワクチンの比較的高価な所以ともなっている。この故に、若し血液に代る簡便な物質を以て用を足し得るならば、これによつて生ずる利点は極めて大とせねばならぬ。

これに関して、本邦において、関りは百日咳菌を血液又は血清の代りに各種炭末を加えた固形又は液体培地に培養して、その増殖の可能なことを認め、善養寺等²⁾はカゼイン水解物に数種の塩を加えた液体培地を基礎培地とし、これに活性炭末を加えることにより、始めて百日咳

菌の旺盛な発育が認められ、而もこの場合の活性炭末は、同じ基礎培地に可溶性澱粉を加えた場合よりも菌発育促進作用が遙かに強いことを報告した。これらについては著者も追試確認したことである。

又、炭末の作用機序については、Pollock³⁾は液体培地中における活性炭末の作用を、菌増殖の過程中、培地に出される発育抑制的な不飽和脂肪酸の吸着不活化にありとし、阿部⁴⁾は百日咳菌菌体酵素に Citric Cycle 系の存在を想定して、活性炭末はこの Cycle 中の比較的酵素活性の弱い C₄-dicarboxylic acid 系酵素の活性を増殖する作用ありと報告した。しかし乍ら、これらの諸説を以てしても、なお炭末の特異な作用を説明するには不充分と考えられる所から、著者はここに炭末の百日咳菌発育に及ぼす作用機序につき些かの検討を試み、先人の成績に鑑みて、著者の得た実験成績を報告する。

供試菌株及び実験方法

実験に使用した百日咳菌は第1相と同定される百日咳菌, 18323株, 22490株, 40103株 及び田島株の継代数25代以内の菌を使用した。

本実験に使用した培地は, Bordet-Gengou 培地変法 (原法に1%に照内ペプトンを加え, 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) であり, この培地に35°C 72時間培養した菌体を大形渦巻白金耳で集菌して, こけを蒸溜水に浮遊させ, これを4,500 r.p.m. 30分遠心沈澱して菌体を集め, 更に同様の手技により, 1回

蒸溜水で菌体を洗滌して後, これを蒸溜水に再浮遊させ, 光電管比色計を用いて, 2.5mgN/mlの再浮遊液として実験に使用した。

実験方法は Warburg 検圧法を以て, 菌の各種基質に対する酸素吸収量を測定し, これと活性炭末添加の各種関係について検討を加えた。

検圧法の手技については, Umbreit et al¹⁾ の示す所に従つた。検圧計 Cell 内のメジウムの混合条件については各実験毎に記述する。

実験成績

実験1.

阿部²⁾が活性炭末には Krebs の Citric Cycle 中の C₄-dicarbonic acid 系酵素の補強作用ありと報告したのに基づき, 著者は先ずこの追試を試みた。

炭末添加による影響を検べるに先だち, Citric Cycle 系の存否は別として, その一環をなす酵素系列について, 百日咳菌1相菌の酵素活性度を測定した。検圧計 Cell 内のメジウムは主室に $\frac{M}{10}$ 基質 0.5ml, $\frac{M}{5}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml を入れ, 側室に菌浮遊液 0.4ml (1mgN), 中心室には 20% KOH 0.2ml を入れ, 更に主室

に蒸溜水を加えて全量を 2.5ml とし, 各種基質について百日咳菌の酸素消費を測定した。使用した基質は, コハク酸, フマル酸, マリク酸, 醋酸及び焦性ブドウ酸であり, その結果は第1表に示した。

この成績は, 阿部の成績と略々一致しているが, 焦性ブドウ酸に対する百日咳菌の酸化能は, いずれの1相菌においても常に極めて低いか, 時には全く零であり, 炭末加半合成培地発育菌について実験した結果も亦常に低い値を示したことは阿部の成績と著しく異なる所である。(焦性ブドウ酸の純度は89%である。)

第 1 表

	著 者		阿 部*	
	22490株-23代 BG培地発育菌	22490株-23代** 炭末加半合成培 地発育菌	BG培地発育菌	炭末加半合成培 地発育菌
コハク酸	276	171	298	33
フマル酸	0	0	83	22
マリク酸	0	13	41	11
焦性ブドウ酸	10§	11	36	156
醋酸	16	63	16	164
蟻酸	0	4	0	99
乳酸	44	185	—	—

* 文献 4)より. ** 文献 2)の培地による.

§ Q₀₂=0 を示すことも稀ならず.

以上の成績から, 百日咳菌菌体酵素活性度が比較的弱いと考えられるフマル酸, マリク酸

焦性ブドウ酸を中心として, 活性炭末添加による酵素補強作用の有無について検討を加えた。

実験方式は前述した方法に従い、活性炭末は蒸留水 10% 浮游液として、その 0.2ml 或いは 0.4ml を主室に添加した。その結果は第 2 表に示すように、これらの菌体酵素は活性炭末の添加によつては全くその酵素活性度は増強されない。

第 2 表

	炭末非添加	炭末添加	炭末添加
	—	炭末量10%液 0.2ml	炭末量10%液 0.4ml
	Q _{O₂}	Q _{O₂}	Q _{O₂}
コハク酸	270 μ l	272 μ l	268 μ l
フマル酸	0	0	0
マリック酸	7	6	7
焦性ノド-酸	2	2	2
乳 酸	36	38	36

22490株-24代, BG 培地発育菌。

この成績は加えた炭末の量を増減することによつても変わらず、これを確認すべく同様な実験を数回繰り返した中では、却つて炭末添加により CO₂ が低く出たような場合にもしばしば遭遇した。又、活性炭末の代りに活性炭末も使用したが、その結果は第 2 表に示すものと何ら異なる所なく、又、著者が実験に使用した菌株 4 株についても略々同様な結果を得た。

以上の成績から、著者は活性炭末が百日咳菌発育に及ぼす特異な作用を他に求め、以下 Warburg 検圧法によつて行い得る 2-3 の実験を試みた。

実験 2.

活性炭末のコハク酸脱水素酵素を増殖させるような作用の有無について、次のように実験した。一般にコハク酸脱水素酵素は Thunberg 管を以て測定されるが、定量的でない憾みがあるので、著者は Slater⁶⁾ が組織 Homogenate に使用した術式を使用して測定した。

実験方法は、検圧計 Cell の主室にメチレン青 0.01M, 酸緩衝液 0.04M, KCN 4×10^{-8} M, 基質 (コハク酸) 0.025 M を入れ、側室に菌液 1mgN を入れ、活性炭末は蒸留水 10% 浮游液と

して、その 0.7ml を主室に加えた。その他の測定条件は前実験に準じた。結果は第 3 表に示すように活性炭末の添加により、この酵素の作用増殖は全く認められない。又、この結果は炭末の添加量を増減することによつても全く変化も認めなかつた。

第 3 表

Succinic Dehydrogenase Activity.

	炭末非添加	炭末添加
18323株-10代	116 μ l	110 μ l
40103株-12代	128	126

菌液 : 1mgN. 1 時間値。

実験 3.

静止菌として長時間これを放置し、一旦酵素活性の低下した菌浮游液に活性炭末を添加することにより、その酵素活性が復活する傾向が認められはしないか。この事について検討すべく次のように実験した。

百日咳菌 22490 株-24 代の 2.5mgN/ml 濃度の菌浮游液 4°C をの氷室に 5 日間保存し、その間雑菌の増殖なきことを確かめた後、この菌のコハク酸酸化酵素能を検べたところ、菌浮游液調製直後においてコハク酸に対する CO₂ が 250 μ l であつたものが、氷室保存 5 日目の菌では 180 μ l に低下していることを認めた。この酵素活性の低下した菌浮游液 1mgN を用い、基質は $\frac{M}{10}$ 溶液のコハク酸 0.5ml として、これに活性炭末蒸留水 10% 浮游液の稍々大量 0.9ml を添加して、その酵素活性復活の有無を検べた。

結果は第 4 表に示すように、炭末の添加によ

第 4 表

	菌液調製直 後の Q _{O₂}	氷室 5 日間 放置後の Q _{O₂}	氷室 5 日目の 菌液+炭 末* Q _{O₂}
コハク酸	250 μ l	180 μ l	184 μ l
乳 酸	48	40	40
焦性ノド-酸	5	2	2

* 蒸留水 10% 浮游液 0.9ml 添加
菌液 : 22490 株-25 代 1mgN.

る酵素活性の復活は全く認められない。又、この他に、乳酸及び焦性ブドウ酸についても同様に実験したが、この場合も酵素活性の復活は全く認め得なかつた。

実験4.

この実験においては、炭末中に含まれる微量の鉄イオンがこれらの菌体酵素系を賦活するような作用を示しはしないかについて検討を加えた。

即ち実験1の条件に準じ、活性炭末浮游液の代りに2価鉄(FeSO₄·7H₂O)の0.3M及び0.03M溶液(弱酸性とす。)夫々0.2mlを加え、対照群との間にコハク酸、フマル酸、マリック酸及び焦性ブドウ酸酸化酵素の活性増強の有無を検べたが、第5表に示すように、Fe⁺⁺も特に発育促進的に意義ありと思われるような酵素活性の増強は認められなかつた。

第5表

	Fe ⁺⁺ (-)	Fe ⁺⁺ 6×10 ⁻⁵ M
コハク酸	198	176 μl
フマル酸	20	18
マリック酸	42	48
焦性ブドウ酸	0	0

18323株-10代, 1mgN.

著者は以上の実験成績から判断して、活性炭末が百日咳菌発育に及ぼす作用は、菌体酵素の増強という問題よりも寧ろ他の物理的作用に意義があるように考える。

先に Foster et al¹⁷⁾ は Baccillus larvae の培養実験において、一定濃度の活性炭末を以て培地を吸着処理することにより、培地中に既存するこの菌の発育抑制物質が吸着除去され、その結果この菌の発育が良好となることを報告している。著者はこの例に鑑み、百日咳菌においても、吸着相としての炭末の意義に着目し、これについて実験した。

先に善養寺等²⁾ は同氏の創製した炭末加半合成培地について炭末の意義を検討し、同氏の基礎培地に各種濃度に炭末を加え、これより炭末

を濾紙により濾別した濾液には百日咳菌発育は認められず、一定濃度の炭末の存在下に初めてこの菌の発育が認められることを報告した。著者が実験5において示す成績は善養寺等の成績を追試したものであるが、著者は濾紙による炭末分離法はなお極めて微細炭末の混入を防ぎ得ない所から、更に炭末の分離を完全ならしめる目的で行つた遠心分離法、ザイツ濾過板による濾別の成績についても附加報告する。

実験5.

基礎培地 : Casein hydrolyzate 100ml (1000 mgN), NaCl 2.5g, CaCl₂·2H₂O (1% Solution) 1ml, MgCl₂·6H₂O (1% Solut.) 1ml, KH₂PO₄ 0.5g, Cystein-HCl 0.01g, FeSO₄·7H₂O (1% Solut.) 1ml, CuSO₄·5H₂O (0.5% Solut.) 0.1 ml, Yeast dialyzate 50ml, これに蒸留水を加えて全量を1lとし、これを基礎培地とする。

Yeast dialyzate はエビオスを用い、Cohen & Wheeler⁸⁾ の方法に従い dialyzate を作製した。

Casein hydrolyzate はミルクカゼインをH₂SO₄加水分解したもの、これを常法に従い、Ba(OH)₂で処理して濾液をpH4.5として、1000mgN/dlに濃縮保存したものである。

活性炭末濃度 : 以上の基礎培地(pH7.2)に活性炭末を0%より始め、0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%の各種濃度に加え、これを次に示す4種の条件に従つて処理したものにつき、百日咳菌1相菌、18323株-13代、22490株-24代、田島株-5代の発育増殖の有無を検べた。

実験方法 :

第1群 中試験管に基礎培地を10mlずつ分注し、これに各々上記の濃度に活性炭末を加えた試験管系列を作り、各々をpH7.2に再修正して、115°C 15分間加熱滅菌を施したもの。(炭末を除去せず。)

第2群 第1群と同様の条件下に各種炭末濃度の系列を作り、各々を室温で数分間強振して暫時放置後、この各々を東洋濾紙No.50を以て炭末を濾別した濾液系列を作り、pH7.2に再修正後、115°C、15分間加熱滅菌を施したもの。

第3群 第1群と同じ条件下に作つた各種炭末濃度

の系列をザイツ濾過板を以て炭末を濾別した系列を作り、115°C、15分間加熱滅菌を施したもの。(ザイツ濾過板は市販のものを更に $\frac{1}{2}$ の厚さにして使用した。)

第4群 第1群と同じ条件下に作った各種炭末濃度の系列を、各々 4500 r.p.m. 30分間遠心沈澱して炭末を除去した上清系列を作り、これに115°C、15分間の加熱滅菌を施したもの。

以上4群の試験管系列を作る。

判定：

前記百日咳菌株のBG培地35°C、72時間培養菌の1白金耳を、10mlの滅菌生理食塩水に浮遊させたもの1滴を、各試験管に接種し、35°C、5日間培養して、増殖の有無を肉眼的及び拡大鏡を用いて判定した。

実験結果：

第6表に示すように、濾紙、ザイツ濾過板又は遠心沈澱によつて炭末を除去した系列(第2、

第3、第4群)には全く百日咳菌の発育増殖は認められない。又、炭末を加えない基礎培地のみものには勿論全く菌の発育増殖は認められない。又、第1群中、炭末濃度が0.001%のものでは菌の発育増殖は殆んど認められないに等しいが、0.005%から5%の間では常に菌の発育増殖が認められ、就中、最も顕著な発育は、炭末濃度0.05%から0.5%の間において認められ、この炭末濃度では、百日咳菌は培地全体に亘つて著明な濁濁を示して増殖し、液面では全面に亘つて菌膜を作り、顕著な発育増殖像が認められた。以上の成績は前記のいずれの菌株についても全く同様であつたが、第6表は18323株の成績を以て代表記載した。

第 6 表

群	炭末濃度% 種別	0	0.001	0.005	0.01	0.05	0.5	1	5
		1	炭末を除去せず	—	—	+	++	+++	+++
2	濾紙 (Toyo. F. P. No.50) 濾液	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Seitz Filt. 濾液	—	—	—	—	—	—	—	—
4	遠心沈澱上清 (4,500 r. p. m. 30分)	—	—	—	—	—	—	—	—

第1群及び第2群における実験成績は、先に善養寺等²⁾が発表した成績と略々一致しているが、実験5の成績より総合的に判断して、百日咳菌の発育増殖に及ぼす活性炭末の作用機序は

Foster et al が *B. larvae* において示したような培地中に既存する発育抑制物質の吸着除去という考えでは説明し難いように思われる。

考 察

百日咳菌の発育増殖に及ぼす活性炭末の特異な作用に興味を抱き、その作用機序を manometric に追求すべく、著者は阿部の報告に基き、これを追試したが、実験1において示したように、著者の成績からは、阿部のいうような活性炭末の Krebs の Cycle 中の基質に対する酸化酵素賦活作用は認められなかつたばかりでな

く、著者が実験2から実験4迄に示した成績から、活性炭末には、その他にも酵素賦活的作用は認め得ないように思考される。

又、Foster et al³⁾ が *B. larvae* の培養実験において示したような培地中既存の発育抑制物質(脂肪酸)の吸着除去という活性炭末の作用機序も、著者の実験5の成績からは、百日咳菌の場

合、この機作を以て炭末の意義を説明することは不可能なようである。

著者が行つた実験の範囲からは、炭末の百日咳菌発育促進的作用の機作はなお全く不明であるが、Pollock⁹⁾ のいう菌発育途上における脂肪酸の吸着という興味ある作用機序も、今後機会あればこれを追試したいと考えている。

しかし乍ら活性炭末の旺盛な発育促進作用と、著者の以上の実験成績から考えて、炭末の百日咳菌発育に及ぼす作用は寧ろ、発育促進的な物質の吸着濃縮の場としての機作に今後追求すべき分野が存するに思われる。これに関

して、最近、浅野⁹⁾ は炭末や澱粉の入らないカゼイン水解培地にガラス玉を加えることにより、百日咳菌の著明な発育増殖が認められることを報告し、このガラス玉の意義を Heukelkian & Heller¹⁰⁾ が E. Coli のガラス玉培養において示した解釈を以て説明し、ガラス玉面と培地中の窒素化合物との荷電関係から、ガラス対液の境界面に栄養物質が集積濃縮されて、ここに百日咳菌が発育増殖するものであろうとしているのも、著者が炭末の意義について今後に着目する所と關聯して興味深い。

結 論

以上記載した実験成績から次の結論を得た。

(1) 阿部の成績に基き、百日咳菌菌体酵素系に及ぼす活性炭末の意義を manometric に追求したが、著者の成績は阿部の成績と異なり、活性炭末には、コハク酸、フマル酸、マリック酸、焦性ブドウ酸及び乳酸酸化酵素賦活作用は認められなかつた。

(2) 活性炭末には百日咳菌におけるコハク酸脱水素酵素賦活作用も認められない。

(3) 菌浮遊液の陳旧化に伴つて起る酵素活性の低下も、活性炭末の添加によつて、その酵

素活性が復活するような現象は認められない。

(4) 活性炭末が百日咳菌発育に及ぼす作用は、培地中既存の発育抑制物質の吸着除去という機作によるものではない。

(5) カゼイン水解培地中の活性炭末の至適濃度については、善養寺等の報告と全く同じ成績を得て、これを追試確認した。

稿を終るに当り、終始御懇篤な御指導及び御校閲を賜つた恩師、谷友次教授、並びに西田尚紀助教授に深甚の謝意を捧げます。

文 献

- 1) 関悌四郎：日本衛生学雑誌，4：28，(1945)。
- 2) 善養寺浩：総合医学，8：377，(1951)。
- 3) M. R. Pollock：Symposia Soc. Exp. Biol.，3：193，(1949)。
- 4) 阿部貞太郎：日本細菌学雑誌，7：85，(1952)。
- 5) W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer：Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 1951., Burgess Publishing Co., Minneapolis, America.
- 6) E. C. Slater：Biochem.

- J.，45：1，(1949)。
- 7) Foster, J. W., Hardwick, W. A. and Guirard, Beverly：J. Bact.，59：463，(1950)。
- 8) S. M. Cohen and M. W. Wheeler：Am. J. P. H.，36：371，(1946)。
- 9) 浅野浅雄：日本細菌学雑誌，9：279，(1954)。
- 10) H. Heukelekian and A. Heller：J. Bact.，40：547，(1940)。