

## 百日咳菌に関する研究 第2報

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31年7月13日受付)

新鮮分離株と陳旧培養株の Oxidative assimilation について

Studies on H. Pertussis

II. Oxidative Assimilation of a Freshly Isolated Strain and  
a Laboratory Strain of H. Pertussis.

Hiraku Takahashi

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University.

(Director : Prof. Dr. T. Tani)

この論文の要旨は昭和29年4月6日東京における日本細菌学会  
第27回総会の交見演説「百日咳」の席上これを報告した。

## 緒 言

分離当初の百日咳菌は固形培養基では殆んど選択的に Bordet-Gengou 培地にのみ発育し、他の培養基に発育しない。然るにこの百日咳菌も継代を経るにつれて次第に血液寒天培地或いは更に普通寒天培地にも発育し得るに至る。福見等<sup>1)</sup>は百日咳菌、パラ百日咳菌、ブロンヒゼプトクス菌の3者について、これらの菌の栄養要求上の差異をS源を中心として述べたのは注目すべきものと思われるが、百日咳菌自体の、この難培養性から容易に培養し得る状態への変化の過程に関しては報告が殆んど無いようである。その他新鮮分離株(以下新鮮株と略記する)の栄養要求に関しては既に浅野<sup>2)</sup>、今村<sup>3)</sup>等はN源として有機のアミノ酸(殊にグルタミン酸)、S源としてチスチン、発育素としてニコチン酸を必要とすることを明らかにしている。しかし乍ら新鮮株はこれらの minimum media に如何なる栄養を加えても陳旧培養株(以下陳旧株と略記する)の発育量には遠く及ばないことは研究室でよく経験する所であるので、この意味での新鮮株の難培養性が栄養要求の差の問題とは別な意味を持つているのではないかと著者は考えた。

しかし乍ら結局それも合成力の差であることはいうまでもないことであるから著者は合成力を知る指標として栄養要求の研究に対してとられる被験培地に菌発育の有無をしらべた福見<sup>1)</sup>、浅野<sup>2)</sup>等の法以外の方法

をさがした。合成力を量的に示し得る実験法として適応酵素のシステムを用いる法<sup>4)</sup>があるが、百日咳菌の新鮮株を用いて in vitro で適応酵素をつくらせることは困難なことに思われる。そこで著者は、上記のいずれの方法にもよらず、菌自体の構成酵素を用いて、その合成能力をうかがう方法として oxidative assimilation の現象<sup>5)</sup>に着目し、この面から百日咳菌の増殖力の変化を検討すべく試みた。

著者は前報<sup>6)</sup>において、百日咳菌の主なエネルギー源について新旧兩種菌株間においては酵素学的に質的差異は殆んど無く、陳旧株における乳酸酸化の著明な増大という現象も、菌株の陳旧化を知る上に極めて手近な酵素学的指標とはなり得ても、それ自体兩種菌株間本来の質的差異ではなく、それはむしろ莖膜の消長に伴う permeability の変化が可成りに関与していると考えた方が妥当であろうと述べた。今回の著者の実験は兩種菌株間の差異を、菌体酵素の質、量的差異という問題から転じて、各々の合成能力という点から観察しようとしたもので、方法として兩種菌株の oxidative assimilation 即ち一定の基質が酸化を受ける際に放出されるエネルギーによつて基質の一部が assimilate され、これが新しい細胞構成成分として合成に導かれる度合を比較測定することによつて、百日咳菌の難培養性から易培養性への変化の機作を検討しようと

試みた。

一定の基質としては、著者が前報<sup>6)</sup>において得た成績、及びその他の文献<sup>2)</sup>より考証し、百日咳菌にお

いて最も力源として利用されると考えられるグルタミン酸を中心としてとりあげた。

### 供試菌株及び実験方法

この実験に使用した百日咳菌々株は新鮮株としては群馬大学微生物学教室より分与を受けた百日咳菌株、L<sub>4</sub>18-323株、40103株、41405株、22490株の4株を用い、その Bordet-Gengou 培地継代25代以内のものを使用した。又、陳旧株としては、当教室に永く保存継代されている伝研株、コイ株の2株を使用した。これらの陳旧株は現在では血液寒天培地は勿論、普通寒天培地上でも 35°C、24時間培養で充分発育可能な菌株で、その生物学的性状は Leslie-Gardner<sup>7)</sup>の所謂 Phase IV に相当する菌株である。

この実験に使用した培地はすべて Bordet-Gengou 培地変法(原法に1%の割合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 GB 培地と略記する)であり、この培地に 35°C、72時間培養(陳旧株においては 35°C、48時間培養)した菌を下記のように集菌し、菌浮游液として使用した。

実験方法は Warburg 検圧法によつた。検圧法の術式細部については、Umbreit et al<sup>8)</sup>の示す所に従つ

た。

実験に使用した菌浮游液は BG 培地に上記のように培養した菌を大形渦巻白金耳で集菌して蒸留水に浮游させ、これを 4,500 r. p.m. 30分遠沈して菌体を集め、これを蒸留水に再浮游させ、同様な手技で更に1回菌体を水洗したのち、これを蒸留水に再浮游させて、光電管比色計を用いて 2.5mgN/ml の菌浮游液として実験に使用した。

Warburg 検圧計 Cell 内ウヂウムは下記のように混合した。即ち

主室： $\frac{M}{50}$  グルタミン酸ソーダ 0.5ml (10 $\mu$ Mol)

$\frac{M}{10}$  磷酸緩衝液 (pH 7.2) 0.5ml  
蒸留水 0.5ml

側室：2.5mgN/ml 菌浮游液 0.8ml (2mgN)

中心室：20%KOH 0.2ml

である。

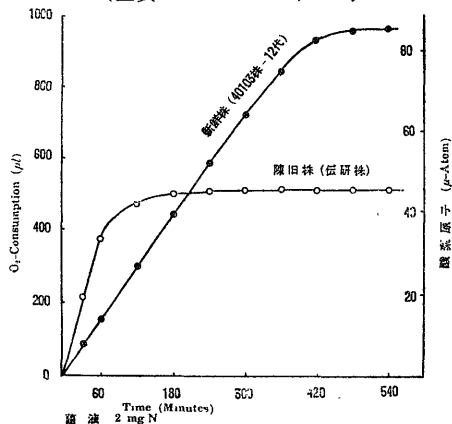
### 実験成績

#### 実験 1

新旧両種菌株についてグルタミン酸々化能をしらべた結果は、著者が前報<sup>6)</sup>に示したように、各々の酸素消費量は、新鮮株では Q<sub>O<sub>2</sub></sub> 172 $\mu$ l、陳旧株では Q<sub>O<sub>2</sub></sub> 424 $\mu$ l であり、酸化速度では陳旧株の方が新鮮株より遙かに大きい結果を得たのであるが、今同じく一定モル濃度のグルタミン酸 (10 $\mu$ Mol) を基質として、これに対する終末酸素消費量を比較追求してみると第1図に示すような結果を得た。

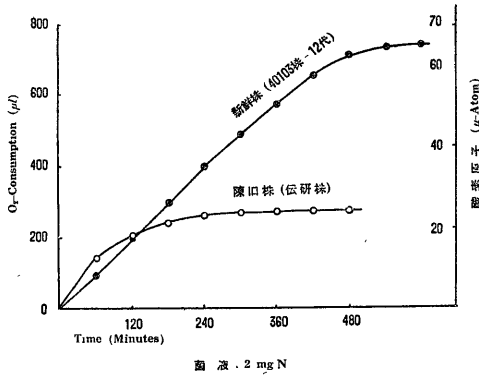
即ち、新鮮株 40103 株—12代の菌では、その酸化速度は Q<sub>O<sub>2</sub></sub>/mgN 80 $\mu$ l で遅いが、1モルのグルタミン酸々化に要する酸素原子数は約 8.5 原子であるのに対して、陳旧株(伝研株)では Q<sub>O<sub>2</sub></sub>/mgN 215 $\mu$ l (第1図の陳旧株30分値よりの計算値)でその酸化速度は速いが、終末酸素消費量は酸素約 4.5 原子の消費を

第 1 図  
新旧両種菌株の終末酸素消費量  
(基質 Glutamate 10 $\mu$ Mol)



し、新鮮株に較べて却つてその終末酸素消費量が少ないという結果を得た。

第 2 図  
新旧両種菌株の終末酸素消費量  
(基質 Succinate 10 $\mu$ Mol)



こうした現象は第 2 図に示すように、コハク酸を基質とした時にもその傾向は全く同一であつて 10 $\mu$ Mol のコハク酸を酸化するのに、新鮮株(40103-12代)では QO<sub>2</sub>/mgN 50 $\mu$ l で速度は遅いが、その終末酸素消費量に酸素約 6.5 原子を要するに対し、陳旧株(伝研株)では QO<sub>2</sub>/mgN 90 $\mu$ l で酸化速度は速いが、その終末酸素消費量は酸素約 2.5 原子で却つて少ないという結果を得た。

著者は百日咳菌の新鮮陳旧両種菌株におけるグルタミン酸々化に認められるこうした現象は、先に Clifton et al<sup>9)</sup> が E. coli のブドウ糖酸化において manometric にその存在を明らかにした oxidative assimilation の

現象に関係があると考へ、以下百日咳菌における oxidative assimilation について検討を加えた。

即ち 1 モルのグルタミン酸及びコハク酸が完全酸化を受けるとすれば、(Krebs の citric acid cycle 或いは別の経路によるものでもよい) それぞれ 9 原子及び 7 原子の酸素を必要とする訳であるから、著者の得た新鮮株のグルタミン酸における 8.5 原子及びコハク酸における 6.5 原子の酸素消費は殆んど完全酸化の値に近く、assimilate される分は極めて僅か若しくは殆んど無いといつてよいであろう。これに対して陳旧株が不完全酸化を示すのは、oxidation によつて生ずるエネルギーが同時に assimilation  $\rightarrow$  synthesis の経路に使われるために、完全酸化を受ける前に基質の一部が assimilate されて、既にメヂウム中から消失しているためであろうと考えられる。即ち陳旧株では catabolic reaction も相当に強いが同時に anabolic reaction も相当に強い菌であるように思考される。陳旧株におけるこの不完全酸化の現象が oxidative assimilation の現象によるものであることを以下に行う実験の成績から証明し、陳旧株の發育良好な特性が、一つにはこうした oxidative assimilation の発達という現象を通して約束づけられているように思われる。

実験 2

そこで著者は、次に陳旧株についてグルタミン酸、乳酸及び焦性ブドウ酸々化時における酸素消費量と炭酸ガス排出量とのバランスについて検討を試みた。その結果は第 1 表に示す通りであるが、この成績は Clifton 等の E. coli における値と類似している<sup>9)</sup>。

第 1 表 諸種の基質 (10 $\mu$ Mol) 酸化時における終末酸素消費量及び炭酸ガス排出量

	O <sub>2</sub> 消費量 3hrs. ( $\mu$ l)*	基質 10 $\mu$ Mol 酸化に消費 した O <sub>2</sub> 量 ( $\mu$ l)	基質 10 $\mu$ Mol 酸化に必要と された O <sub>2</sub> ( $\mu$ Mol)	CO <sub>2</sub> 排出量 3hrs. ( $\mu$ l)*	基質 10 $\mu$ Mol 酸化により排 出した CO <sub>2</sub> ( $\mu$ l)	基質 10 $\mu$ Mol 酸化により排 出された CO <sub>2</sub> ( $\mu$ Mol)
Glutamate	680	458	20.5	752	578	25.1
Lactate	668	446	20.7	611	437	19.5
Pyruvate	570	348	15.5	620	446	20.7
Non-Substate	222	—	—	174	—	—

\* 3 時間で基質酸化速度は略コントロール (non-substate) の酸化速度と等しくなり、基質消費の完了したものと判定した。 菌 株 : 伝研株

上述の陳旧株の示す事実が oxidative assimilation に関係があり、この陳旧株の示す反応が、反応の中間段階で停止しているために起るものでないことを確認すべく次の実験を試みた。

実験 3

$\frac{M}{20}$  グルタミン酸ソーダ 10ml, 陳旧株菌浮游液 (2.5 mg N/ml) 15ml,  $\frac{M}{10}$  磷酸緩衝液 (pH7.2) 10ml に

水を加えて 50ml としたものを 2 組作り 200ml 容量の A, B 2つのフラスコに入れた。これを 37°C の振盪孵卵器内で振盪 (振幅5cm, 1分間140回転) を継続した。その間 1 時間毎に A フラスコ内より 2ml ずつをとりワールブルグ検圧計で15分間の呼吸を測定し、その呼吸値が対照 (グルタミン酸ソーダの代りに水を入れ、他は前記と同濃度のものを対照とする) から同時にとつた 2ml の呼吸値に近づくまで振盪を継続した。呼吸完了までに 5 時間を要した。5 時間 30 分の後、B フラスコ内のメヂウムをとり出し、遠心沈澱して上清 45ml を分離した。この上清につき、Kutscher-Steudel の抽出器を用いて有機酸のエーテル抽出を試みた。

12時間連続抽出した後、エーテルを蒸発し、4mg の残渣を得た。用いられた  $\frac{M}{20}$  グルタミン酸ソーダ溶液 9ml の含むグルタミン酸 (66.15mg) に較べて残渣は僅かに 6% に過ぎず、且つ又、この残渣を 0.5ml の水に入れても、その大部分は不溶であつたので Krebs の中の cycle 中間産物たる脂肪酸は殆んど無いと考えてもよいと思われる。又、この液をブタノール、ピリジン、蒸溜水 (3:2:1)<sup>10)</sup> により指示薬 B.P.B. を使用してペーパークロマトグラフィーを行つて有機酸の有無を検したが、この液の中から有機酸は予期の如く検出不能であつた。又、A フラスコ内残りの 30ml を揮発性有機酸の定性に使用した、即ち、この遠沈上清の蒸気蒸溜液につき醋酸、蟻酸の検出を試みたがこれらの酸についても検出不能であつた。

この実験の結果から、陳旧株のグルタミン酸々化においては、初めに加えた基質のグルタミン酸は途中反応停止による不完全酸化によつて中間代謝産物をメヂウム中に蓄積しているのではないことが明らかとなつた。Assimilative synthesis は catabolic energy と密接な関係があり、catabolic と anabolic な反応の中間に energy carrier として磷酸が重要な役割を果していることは周知の事実である<sup>11)</sup>。百日咳菌陳旧株において oxidative assimilation の現象が存在するならば、陳旧株のグルタミン酸々化に際し、磷酸の欠乏は必然的に assimilative synthesis の阻害、即ち酸化時における終末酸素消費量の増大という形をとつて現われて来ると考えられる。百日咳菌陳旧株のグルタミン酸々化に対する磷酸の影響を実験 4 において検討する。

実験 4

前記の条件に従つて培養した陳旧株菌を型の如く集

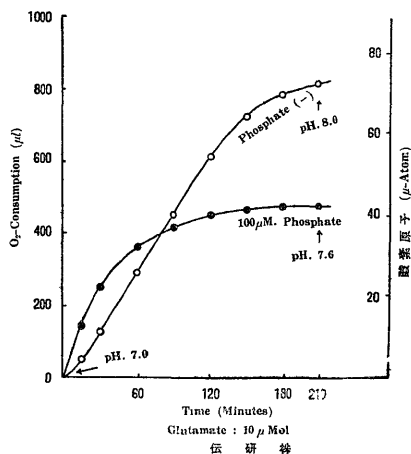
めて蒸溜水に浮遊させ、可及的菌体内部の磷酸をも流出させる目的で前記のような手技で菌体を充分水洗 (4 回水洗) し、光電管比色計を用いて 2.5mgN/ml の菌浮遊液をつくる。

検圧法に関する手技はすべて前記の条件に準ずるが、この実験においては、操作中ピペットその他の容器などについて、極めて微量の磷酸の混入をも防止するよう努めること勿論である。又、検圧計 Cell 内メヂウムについては、磷酸を加えないものにおいては、磷酸緩衝液の代りに蒸溜水を用い、磷酸緩衝液 (pH7.2) を添加した場合においては、以下のように磷酸緩衝液の終末濃度が 2.5  $\mu$ Mol, 5  $\mu$ Mol, 10  $\mu$ Mol, 100  $\mu$ Mol の各種濃度となるように添加した。基質はグルタミン酸ソーダ 10  $\mu$ Mol である。

磷酸濃度に関する酸素消費量の変化は第 3 図及び第 4 図に示す通りである。

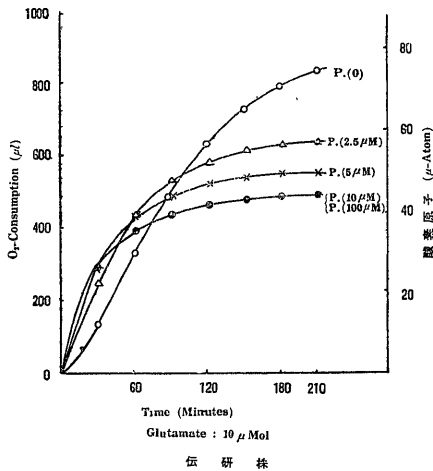
第 3 図

磷酸 (Phosphate) が終末酸素消費量に及ぼす影響



この実験の成績から、磷酸を全く (可及的) 除去した場合においては、酸素吸収量が著しく増大して殆んど完全酸化の値に近づくのが認められる。(第 3 図) 即ちこれは energy carrier としての磷酸の欠乏により、assimilative synthesis が著しく阻害されたために起る現象であると思われ、且つ又、10  $\mu$ Mol の磷酸緩衝液を添加することによつて、酸素消費量は完全に元の酸素モル数 (4.5 原子) に還ることが認められ、(第 4 図) 又、充分に水洗した菌に段階的に磷酸を加えることによつて次第に完全酸化からまぬがれてゆくことも第 4 図の成績からうかがうことが出来よう。極めて

第 4 図  
 磷酸 (Phosphate) の各種濃度と終末酸素消費量との関係



微量の磷酸によつて終末酸素消費量が直ちに低下する事実は、energy carrier としての磷酸が絶えず分解再生を繰り返して回転使用されると考えられることから当然といえよう。

更に以上のような結果は磷酸の存在下に合成阻害剤として 2,4-Dinitrophenol<sup>12)</sup> を使用して行つた次の実験によつて更に強固に裏づけられるであろう。

#### 実験 5

検圧法に関する条件はすべて実験 1 に準ずる。合成阻害剤としては 2,4-Dinitrophenol (pH7.0 溶液に修正, 以下これを D.N.P. と略記する) を用い, これを終末濃度  $\frac{M}{766}$ ,  $\frac{M}{1150}$  及び  $\frac{M}{2300}$  となるようにメジウム中に添加した。基質はグルタミン酸ソーダ  $10 \mu$  Mol である。これら各濃度の D.N.P. 添加時における終末酸素消費量を測定した結果は第 5 図に示す通りである。

結果としては、 $\frac{M}{766}$  の D.N.P. 添加により酸化量は

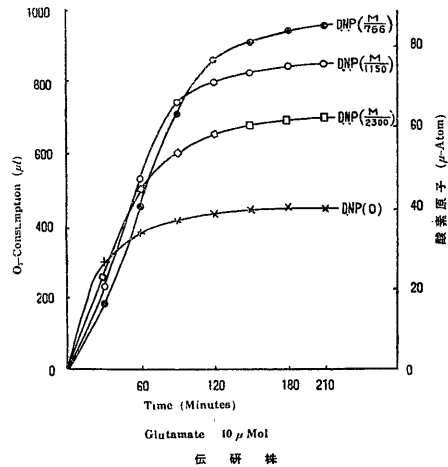
著しく増大して殆んど完全酸化の値に近い酸素量約 8.5 原子を消費し、それ以下の D.N.P. 濃度ではその濃度の減少に比例して終末酸素消費量が減少してゆくことがうかがわれる。

即ちこれは合成阻害剤としての D.N.P. の作用により、百日咳菌陳旧株の assimilative synthesis の経路が阻害されたために起つた酸素消費量の増大であると思考される。

以上実験 1 から 5 までに示した結果から、著者は、百日咳菌陳旧株の一定モル濃度グルタミン酸化においてみられる不完全酸化の成績は、酸化エネルギーを媒介して oxidative assimilation が行われているために起る成績であることを、oxidative assimilation 現象の存在を明確にすることによつて証明し得たと考える。

そして以上の結果から、百日咳菌陳旧株では酸化エネルギーはよく合成に link しているが、新鮮株ではこの点が極めて弱い菌であることが明白となつた。

第 5 図  
 D.N.P. が終末酸素消費量に及ぼす影響



## 考 察

百日咳菌新鮮株は如何に環境の栄養を良くしても依然として貧弱な發育をなすに過ぎないが、又一面、栄養をを相当に制限しても發育し得ることも明らかになっている。かかることから百日咳菌新鮮株はその難發育性にも拘らず、栄養要求的には寧ろ簡単な菌群に入るものと思われる。即ちその難發育性は、更に複雑な

他の栄養物質の不足とか、或いは Virus で示されたような生体のつくるエネルギーに依存している<sup>13)</sup>ため、というような問題とは一応離れているように思われる。

そしてその難發育性は上述の実験からみれば、寧ろエネルギー効率の悪さに原因しているものと考えられ

る。

そこで著者は百日咳菌新鮮株のこのエネルギー利用の低効率ということが、百日咳菌のK抗原の合成とい

う問題と密接な関係があるのではないかと考え、このことに関して実験を継続中であり更に次報で述べる予定である。

## 結 論

以上の実験から、著者は百日咳菌新旧兩種菌株の代謝について、次のような新知見を得た。即ち、

(1) 一定モル濃度のグルタミン酸及びコハク酸々化における終末酸素消費量を新旧兩種菌株について比較追求した結果、新鮮株では殆んど完全酸化に近い酸素消費を示し、陳旧株では著しい不完全酸化の値を示すことを知った。

(2) そうしてこの事実は、百日咳菌陳旧株において oxidative assimilation の現象が著明なために現われる新旧兩種菌株間の相違であることを証明した。

(3) この oxidative assimilation の有無から、百日咳菌陳旧株は基質酸化における酸化エネルギーが極

めてよく合成に利用されて、エネルギー効率のよい菌であり、陳旧株の良好な増殖力がここに起因していることを推論した。これに対して百日咳菌新鮮株では、用いられた条件下では oxidative assimilation が極めて弱く、基質酸化における酸化エネルギーは殆んど合成に利用されず、極めてエネルギー効率の悪い菌であることを証明した。そして百日咳菌新鮮株の難培養性がエネルギー効率の低さに原因していることを指摘した。

稿を終るに当り、終始御懇篤な御指導並びに御校閲を賜った恩師谷友次教授並びに西田尚紀助教授に深甚の感謝を捧げます。

## 文 献

- 1) H. Fukumi, E. Sayama, J. Tomizawa & T. Uchida : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 6 : 587, (1953).
- 2) 浅野浅雄 : 日本細菌学雑誌, 7 : 400, (1952).
- 3) S. Imamura : Jap. J. Exper. Med., 22 : 49, (1952).
- 4) Y. Oda, I. Miyahara, E. Inada & M. Suda : Med. J. of Osaka Univ., 2 : 71, (1951).
- 5) C. E. Clifton : Advance in Enzymology, 6 : 269, (1946).
- 6) 高橋啓 : 十全医会雑誌, 58 : 18, (1956).
- 7) P. H. Leslie and A. D. Gardner : J. Hyg., 31 : 423, (1931).
- 8) W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer : Manometric Techniques and Tissue

- Metabolism, (1951). Burgess Publishing Co. Minneapolis, America.
- 9) C. H. Werkman & P. W. Wilson : Bacterial Physiology, 531 ~547, Academic Press, New York, (1951).
- 10) H. J. Koepsell, F. H. Stodola & E. S. Sharpe : J. Am. Chem. Soc., 74 : 5142, (1952).
- 11) F. Lipman : Advance in Enzymology, 1 : 99, (1941).
- 12) R. D. Hotchkiss : Advance in Enzymology, 4 : 153, (1944).
- 13) W. W. Ackermann & R. B. Johnson : J. Exp. Med. 97 : 315, (1953).