

百日咳菌に関する研究

第3報 百日咳菌の莢膜抗原と Oxidative assimilation との関係について

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31年7月26日受付)

(この論文の要旨は昭和29年5月東京における第27回日本細菌学会総会の交
見演説「百日咳」の席上これを報告した。)

Studies on H. Pertussis.

III. On the Relation between the Capsule Antigen and the Oxidative Assimilation of H. Pertussis.

Hiraku Takahashi

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director : Prof. T. Tani)

緒 論

前報¹⁾において著者は百日咳菌々株のうち、いかなる培地にも難発育性を有する新鮮分離株と、多数継代の結果、普通寒天培地にも旺盛に増殖し得るに至つた教室保存株とについて、ワールブルグ検圧法により、Clifton et al²⁾³⁾の示した oxidative assimilation の現象を中心として、カタボリズム、アナボリズムの2面から検討を加えた。その結果百日咳菌の oxidative assimilation は陳旧培養株(以下陳旧株と略記する)よりも新鮮分離株(以下新鮮株と略記する)において遙かに少なく、かかる点から新鮮株は陳旧株に較べてエネルギー効率が極度に悪い菌株であることが明らかとなつた。しかし乍ら新鮮株が生体内において強い生存

能力と増殖能力とを有し、反対に陳旧株はこれを持たないということ⁴⁾はよく知られていることである。従つて著者は、新鮮株の貧弱なエネルギー効率性がエネルギー効率の良い菌からの退化現象ではなくて、寧ろ新鮮株特有のメタボリズムの存在と関連するのではないかと考えた。百日咳菌新鮮株に特有な合成作用としては、莢膜の合成があり、これが又 in vivo の増殖に重要な役目を持つてゐるわけであるから、著者はその貧弱なエネルギー効率性が莢膜合成と関係しているのではないかと考えた。そこで莢膜抗原(K抗原)とエネルギー効率との相関々係を諸種の陳旧度の菌株を用い、又培地環境をかえることによつて検討した。

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、40103株、41405株、22490株、中川 G₈株、坂入株、三木株、原田株、伝研株、コイ株の9株である。これらの菌株のうち、伝研株、コイ株は教室保存の陳旧株であり、前報¹⁾で示したように極度に易発育性を有するに至つた菌株である。その他の菌株は夫々群馬大学微生物学教室、北里研究所春日研究室及び阪大公衆学衛生学教室より分

与をうけた諸種陳旧度の百日咳菌々株である。

又、この実験に使用した培地としては、Bordet-Gengou 培地は原法に1%の割合に照内ペプトンを加え、20%の割合にクエン酸ソーダ加牛全血液を加えて培地を作製した。以下これをBG培地と略記する。その他、炭末加水解カゼイン寒天培地(Casein hydrolysate charcoal agar medium, 略して CHCAM)及び炭末加

牛肉消化培地 (Beef digestion charcoal agar medium, 略してBDCAM)を用いた,水解カゼイン培地は Cohen-Wheeler⁶⁾ の法にしたがって作成し,これに活性木炭末を1%,寒天を3%の割合に加え, pH. を7.2に修正, 115°C 20分滅菌して, CHCAMとした. 又, 牛肉消化液は Pope の法⁷⁾にしたがって作製し, 活性木炭末, 寒天と夫々上記の濃度に加え, pH7.2として前記の如く滅菌し, BDCAMとした.

Oxidative assimilation はワールブルグ検圧計を用いて測定した. 検圧計 Cell 内のメヂウムは次のように混合した.

主室には $\frac{M}{50}$ グルタミン酸ソーダ0.5ml, $\frac{M}{10}$ 磷酸

緩衝液 (pH 7.2) 0.5ml, 蒸留水 0.5ml, 側室には菌浮游液 (2.5 mgN/ml) 0.8 ml を入れ, 中心室には 20% KOH 0.2 ml を入れた. なお検圧法術式の細部に亘つては Umbreit et al⁸⁾ の示す所に従つた.

百日咳菌の抗元分析は, 前報⁷⁾の如く因子血清による試験管内定量凝集試験により行つた. 即ち, S 因子血清の最高凝集価は 1:1,200, O 因子血清のそれは 1:3,200 である. 本実験では各血清の最高凝集価を 100%とし, 各菌株の被凝集性を%を以て現わした.

実験に用いた基質は著者の経験⁹⁾に鑑み, 百日咳菌の主要エネルギー源と考えられるグルタミン酸を用いた.

実験成績

実験1.

上述の各菌株を用いて, 各百日咳菌集落の生物学的性状及び S 因子並びに O 因子凝集反応を観察した. (第1表) 第1表でみるように, S 凝集のみを示し, O 凝集を示さぬ春日等のいう完全な 1 型菌は, 上述の百日咳菌々株の内では見出されなかつたが, 中川 G₈ 株-6代, 40103 株-15代及び 41405 株-11 代の菌が春日等によつて述べられた 1 型菌に最も近い位置にあるものと考えられ, 坂入株及び三木株は春日等の 3 型菌に属し, 伝研株, コイ株は更に O 抗原をも失いつつ

ある段階にあるものと考えられ, R 型に属するものと判定した. 又, 原田株-33代は春日等のいう移行型に属するものと思われる.

これら各陳旧度の異なる百日咳菌々株について, 夫々の oxidative assimilation の度合をしらべてみると第2表に示すような結果を得た.

第1表, 第2表の成績から, 各百日咳菌々株の oxidative assimilation の度合は, 各菌株の各因子血清に対する被凝集性と全く比例的に増減することを知り得る. 今, 用いられたグルタミン酸量のうち catabolism

第1表 BG 培地上に培養せる供試各菌株の發育性状及び因子血清に対する被凝集性

菌 株	継 代 数	BG 培地上の 發育速度	集 落 性 状	因子血清に対する被凝集 (%)	
				S 因子	O 因子
中 川, G ₈ 40103 41405	6	35°C, 48時間培養でルーペを用いて極めて微細な集落を可視. 72時間で肉眼的に可視	極めて微細, 正円形, 半球状膨隆, 光沢あり, 半透明, 溶血量著明	100	10
	15			100	10
	11			100	20
原 田	33	略々上段の如きも發育速度稍々速し	略々上段に同じ	50	80
坂 入 三 木	不 明	35°C, 24時間培養でルーペを用いて微細な集落を可視. 48時間で肉眼的に明瞭に可視	集落かなり大, 稍々偏平, 粘性, 稍々不正円形, 稍々不透明, 溶血量弱し	0	80
				0	100
伝 研 コ イ	不 明	35°C, 24時間培養で肉眼的に微細な集落を明瞭に可視	集落大形, 不正円形, 不透明, 灰白色, 溶血なし	0	(100)*
				0	(100)*

*この凝集は非定形的である. 即ち10%まで定形的でありあとは(±)の凝集を示す.

第 2 表 供試百日咳各菌株の Oxidative assimilation

菌 株	継 代 数	O ₂ 消費		エネルギー効率イン デックス = 吸収されたグルタミン酸量 ÷ 代謝されたグルタミン酸量
		10 μ Mol S. Glutamate (μl)	10 μ Mol S. Glutamate (μ-Atom)	
40103	15	940	85	0.06
中 川 G ₃	6	875	78	0.16
41405	11	856	76	0.18
原 田	33	796	71	0.27
坂 入	不 明	660	59	0.53
三 木	不 明	586	52	0.73
伝 研	不 明	498	44	1.04
コ イ	不 明	490	44	1.04

菌 液 : 2mg N.

基 質 : グルタミン酸ソーダ 10 μMol.

に使用された量と, anabolism を受けた分量との比を求めて, これをエネルギー効率の index として第 2 表中に示したが, これによつてみれば, 各菌株間の抗元構造とエネルギー効率との間の比例的相関々係を一層明瞭に知ることが出来よう.

この index は, グルタミン酸 10 μMol の完全酸化には, 理論上 90 μMol の酸素が必要とされる所から, 各菌株について, catabolism に使用された酸素の μMol 数を分母とし, 90 μMol からこの値を差引いた残りを分子として算出した.

Catabolism に使用されなかつた 残りの 部分が, 直ちに anabolism に使用されたとは 必ずしも 即言出来ないが, 前報⁹⁾の実験で明らかなように, この条件下で検圧計を振盪した場合, 液中の蓄積産物は殆んど無視し得る程度であるから, 著者はこの比をエネルギー効率の指標とした.

この index の値からみると, 殆んど, 完全酸化を示す 40103株—15代は特別として, 1 型菌は略々 0.16~0.18の値を示すのに対し, 移行型(原田株—33代)は 0.32とかなりの差を示し, 更に 3 型菌(坂入株, 三木株)は 0.53, 0.73であつて移行型に比して著しい差を示した. 坂入株及び三木株は血清学的には共に莢膜抗原を失つてはいるが, 両菌株の O 因子血清に対する被凝集性の差及びエネルギー効率比の値からみて, 坂入株は三木株に較べてなお血清学的に検知出来ぬ程度の莢膜抗原を有しているのではないかと推測される.

以上述べた 3 種の型の菌群に対して, R 型に属すると考えられる伝研株, コイ株の菌群におけるエネルギー効率比は, 他の菌群のそれとは更に格段の差異を示

している.

以上著者がこの実験において示した各百日咳菌々株間の抗元分析及びエネルギー効率比測定の結果から, 各種百日咳菌々株の陳旧度を従来の発育相による分類⁹⁾や, 最近の春日等¹⁰⁾による抗元構造上の分類とは全く別個にエネルギー効率比という酵素学的に測定可能な数値を以て現わし得ることを発見した. そしてその効率比は抗元分析の結果とは殆んど全く比例的に増減するが, 菌株の継代々数とは必ずしも比例的でないことを知つた.

実験 2.

著者は Bordet-Gengou 培地以外の培地を使用して百日咳菌を増殖させようと試みているうちに, 炭末加水解カゼイン寒天培地 (CHCAM) 及び炭末加牛肉消化寒天培地 (BDCAM) が百日咳菌の増殖には Bordet-Gengou 培地に優る良い成績を示すことを知つた, しかし乍ら, 百日咳菌新鮮株をこれらの培地に継代したときは, BG 培地からこれらの培地に移植するという只一回の継代操作によつて, 新鮮株の保有する莢膜抗原が著しく失われるという事実をも著者は経験した.

先に山本¹¹⁾は Bodert-Gengou 培地に亜硫酸ソーダを 0.3% に添加することによつて百日咳菌の発育が稍々良好となるが, 同時に百日咳菌の O 抗原の増大と莢膜抗原の減少が認められ且つこの現象が可逆的であることを報告している.

そこで著者は BG 培地, 炭末加水解カゼイン寒天培地, 炭末加牛肉消化寒天培地及び山本にならつて炭末加水解カゼイン寒天培地に亜硫酸ソーダを 0.3% に加えた培地の 4 種の培地につき百日咳菌 22490株—25代

を用いて、各培地上における百日咳菌の発育度を肉眼的に比較した。その結果は第3表に示す如く、炭末加牛肉消化寒天培地が最も百日咳菌の発育良好であり、

次いで0.3% 亜硫酸ソーダ・炭末加水解カゼイン寒天培地、炭末加水解カゼイン寒天培地、BG培地の順であった。

第3表 各種百日咳菌培地における *H. pertussis* の発育速度 (22490株—25代)

培地	培養時間	24	48	72
BG培地		—	ルーペで極めて微細な集落を可視	肉眼的に微細な集落を可視、半透明、溶血(+)
CHCAM		±(培地面 稍々湿潤)	肉眼的に灰白色微細な集落を可視	肉眼的に半球状の稍々明瞭な集落
0.3% S. sulfite CHCAM		±(同上)	同上(稍々集落の白色強し)	肉眼的に稍々扁平な白色の集落 CHCAMより稍々大
BDCAM		ルーペで極めて微細な集落を可視	肉眼的に白色の明瞭な集落を可視	肉眼的に稍々扁平なかなり大なる集落 集落最も大形

今回同じ百日咳菌22490株—25代を用いてBG培地から炭末加水解カゼイン寒天培地及び炭末加牛肉消化寒天培地に移植発育した菌のS被凝集性をしらべてみ

ると、只一回の継代によつて第4表に示す如き結果を得た。

即ち第4表の結果から同じBG培地上に継代した場

第4表 各種培地上発育菌のS被凝集性変化

	22490-25代(原株)	22490-25代から BDCAMへ移植初代	22490-25代から CHCAMへ移植初代	22490-26代
S-被凝集性 (%)	50	0	5	50

合には一回の継代によつてS被凝集性には全く差を見ないが、炭末加水解カゼイン寒天培地及び炭末加牛肉消化寒天培地に継代した場合には、S被凝集性は夫々著明に低下し、この傾向は炭末加牛肉消化寒天培地発育菌において一層著しいことを知り得た。

しかし乍ら、著者の実験した所では、このS被凝集性の低下は、これらの菌を再びBG培地にもどし植えた場合、容易に原株のS被凝集性に復帰するものであり、かかる点からこの現象は培地環境に対する百日咳菌菌体表面の一時的な可逆的適応現象であると考えられる、この現象は山本等¹⁰⁾の0.3%亜硫酸ソーダ加BG培地における実験成績と共通するものであろうと考えられる。

第3表及び第4表の成績から、これらの培地上における百日咳菌の発育状況と莢膜抗原の消長との間には密接な相関関係が認められる。即ち発育良好な培地に増殖した菌程、一時的にせよその莢膜抗原の減少が著明なことである。実験1に示した抗原構造とエネルギー効率との相関関係から推察し、培地環境とエネルギー

効率との間にも一定の相関関係の存在が考えられる所から、以下著者はこれらの特殊な培地に発育した百日咳菌のエネルギー効率について検討を試みた。

BG培地継代31代の百日咳菌原田株を用い、これをBG培地、炭末加水解カゼイン寒天培地及び0.3% 亜硫酸ソーダ・炭末加水解カゼイン寒天培地の各培地に夫々型の如くに培養し、各培地に発育した菌について、上述の術式に従つてグルタミン酸ソーダ $10 \mu\text{Mol}$ を基質として各々のoxidative assimilationの度を測定し、これよりエネルギー効率のindexを算出した。結果は第5表に示す如くである。

第5表の成績から、これら3種の培地に発育した菌の中で最もエネルギー効率の良好なのは0.3% 亜硫酸ソーダ・炭末加水解カゼイン寒天培地であり、炭末加水解カゼイン寒天培地がこれに次ぎ、BG培地は最も悪いエネルギー効率を示すことが知られる。かかる現象は炭末加牛肉消化寒天培地発育菌においても全く同様に認められる。この場合は百日咳菌22490株—25代を用いた。(第6表)

第 5 表 各種培地上発育菌の Oxidative assimilation. (原田株-31代)

培地*	O ₂ 消費 / 10 μ Mol S. Glutamate (μ l)	O ₂ 消費 / 10 μ Mol S. Glutamate (μ -Atom)	エネルギー効率インデックス
B G 培地	817	73	0.23
CHCAM	675	60	0.50
0.3% S. sulfite CHCAM	628	56	0.57

* 各培地へは原田株-31代 (BG培地)より移植す。移植 1 代目の菌を使用。
菌液 : 2mg N. 基質 : グルタミン酸ソーダ 10 μ Mol.

第 6 表 BDCAM 上発育百日咳菌の Oxidative assimilation. (22490株-25代)

培地*	O ₂ 消費 / 10 μ Mol S. Glutamate (μ l)	O ₂ 消費 / 10 μ Mol S. Glutamate (μ -Atom)	エネルギー効率インデックス
BG 培地	735	65	0.38
BDCAM	628	56	0.61

* 各培地へは22490株-25代 (BG培地)より移植す。
菌液 : 2mg N. 基質 : グルタミン酸ソーダ 10 μ Mol.

実験 2 の成績から同一菌株の百日咳菌でも、培地環境を変えて発育良好な培地に移植することによつて容易に莢膜抗原を失わしめることが出来、エネルギー効

率の上からも速かに菌株の陳旧化を起さしめ得るものであることが知られ、且つこの現象は発育良好な培地環境における程著しいものであることが伺われる。

考 察

従来百日咳菌の分類が発育相を分類の規準とした⁷⁾のに対して、春日等⁸⁾がK抗原及びO抗原の消長という数値的に測定可能な尺度を以て百日咳菌の変異を表わしたことは明らかに百日咳菌分類学上の著しい進歩であつた。

著者が以上の実験成績から知り得た事実は、百日咳菌においては、K被凝集性が強い菌程 oxidative assimilation の度合が少なく、O被凝集性が強い菌程 oxidative assimilation の度合が大きいということ、即ち百日咳菌々株の変異相を抗血清を用いることなく、oxidative assimilation の度合で判断することが出来るということである。殊に“エネルギー効率の index”の設定はこれを以て酵素学的測定手段により数値的に百日咳菌々株の陳旧度を測る尺度となし得る可能性を

十分に示すものであると考えられる。

従来抗血清を用いないで百日咳菌の相変異を測定する方法として重金属反応が試みられているが、すべての変異相を通じて定量的であるとはいえない。

しかし乍ら著者がここに示したエネルギー効率の index は実験 1 に示す如く、抗原構造及び発育相と全く比例して消長するものであり、百日咳菌々株の変異度を示すに極めて定量的であるといえよう。

百日咳菌のK抗原の量とエネルギー効率とが全く比例的に消長する所から、著者は百日咳菌の oxidative assimilation と莢膜合成との間に本質的な關聯の存在を予想しているが今回は、その間の意義を明らかにするには到らなかつた。今後更に多数の菌株を使用し、その間の意義を追求したいと考えている。

結 論

以上の実験成績から著者は次の結論を得た。

1) 百日咳菌新鮮株においては *oxidative assimilation* の現象が弱く、陳旧株においてはこの現象が著しいという前報において著者の発見せる事実を、春日等の抗元構造による分類に従って集めた更に多数の百日咳菌々株において再検討し、この事実が春日等の分類にも極めてよく一致するものであることを確認した。その結果S抗元価(莢膜抗元価)の高い百日咳菌程弱い *oxidative assimilation* を示した。

2) 従来行われて来た百日咳菌の相変異分類とは全く別個に、抗血清を用いることなしに、*oxidative assimilation* の際のエネルギー効率 *index* を測定する

ことにより、百日咳菌の相変異を全相に亘つて定量的に分類し得る可能性がある。

3) Bordet-Gengou 培地よりも一層顕著な百日咳菌の発育を示す2, 3の固形培地について検討した結果、これらの培地上に発育した百日咳菌は、抗元構造及びエネルギー効率 *index* の上から菌株の陳旧化の傾向が特に著明であり、この傾向は Bordet-Gengou 培地において最も少なく、発育が旺盛な培地程強い。

稿を終るに当り、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師、当教室主任、谷友次教授並びに西田尚紀助教授に対し深甚の謝意を捧げます。

文 献

- 1) 高橋啓：百日咳菌に関する研究,(第2報), 十全医学会雑誌, 58: 728, (1956). 2) C. E. Clifton: *Advance in Enzymology*, 6: 269, (1946). 3) C. E. Clifton: *Bacterial Physiology*, C. H. Werkman & P. W. Wilson 編集, Amer. Press, New York, 531, (1951). 4) 春日忠善, 浮島光威, 高津邦芳, 中瀬安清: 日本細菌学雑誌, 8: 841, (1953). 5) P. H. Leslie & A. D. Gardner: *J. Hyg.*, 31: 423, (1931). 6) S. M. Cohen & M. W. Wheeler: *Am. J. Pub. Health*, 36:

- 371, (1946). 7) C. G. Pope & M. L. Smith: *J. Path. Bact.*, 35: 753, (1932). 8) W. W. Umbreit, R. H. Burris & J. F. Stauffer: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, U. S. A. (1951). 9) 高橋啓: 十全医学会雑誌, 58: 18, (1956). 10) 山本郁夫, 赤間清人, 宮本靖夫, 西郷美信: 文部省科学研究費, 総合研究, 百日咳研究班, 昭和28年度業績集. 11) 水沼寛: 日本細菌学雑誌, 10: 707, (1955).