百日咳菌の力源代謝

第3報 培地中の活性炭末・血球・可溶性澱粉の機序

阿部貞太郎

(國立予防衛生研究所)

[受付: 7月30日, 1951年]

前報にて強調した如く, 百日咳菌(第一相)の培養には, 血球, 血清, 活性炭末, 可溶性澱粉等の存在が不可欠なる事実がある。これに関しては1947年 M.R. Pollock 女史の興味ありまた暗示的な論文がある¹⁾²⁾³⁾。要略すると, 血清中のアルブミン, 可溶性澱粉, 炭末等は, 脂肪酸を吸着し, 無毒化する作用があつて, 恐らく百日咳菌の代謝産物である脂肪酸, 特に不飽和脂肪酸を無毒化するため, 菌の培養が可能となるのであろう。かゝる細菌群に, 淋菌, 脳脊髄膜炎菌等がある, と。

また1947年, 同女史は百日咳菌と類デフテリア菌("Q", 株)とが, 血液のない普通寒天培地上に, 共棲的に発育する現象を発見, ついでこの類デフテリア菌の Growth factor を調べて, それには不飽和脂肪酸であるオレイン酸リノール酸, リノレン酸が有効で, 飽和脂肪酸であるミリスチン酸, パルミチン酸, ステアリン酸が無効なることを知り, この共棲的発育の機序は, 不飽和脂肪酸のやりとりと結論し, 間接に百日咳菌培地中の血液, 可溶性澱粉, 活性炭末の意義は, 不飽和脂肪酸の無毒化であると, 私は同女史の1947年の報告に基き, この脂肪酸の直接的証明及びその論拠の是非を力源代謝及び培養方面より研究してきた。

実験

1) 嫌気性培養について

第二報記載の Hornibrook, Sophia 等の半合成培地には, 可溶性澱粉, 活性炭末等を処方如く入れた培地と, B-G 培地を常法により嫌気性培養瓶に入れ, 空気を N_2 にて置換して 37° , 4日間培養する。また同時に好気性培養も併用する。

好気性培養発育度
(肉眼的)嫌気性培養発育度
(肉眼的)

B-G 培地	++	+
半合成培地 < 可溶性澱粉	+	-
活性炭末	++	+

以上の結果より, 嫌気性培養に於ては, B-G 培地中の血液に酸素源があつて, 例えば酸化ヘモグロビンが考えられるが, この培地中の酸素源を利用して百日咳菌が

発育し, 可溶性澱粉には吸蔵された酸素源がないため不発育であり, 活性炭末には吸蔵された酸素源の存在が予想され, これにより発育し得ると考えられる。炭末の吸蔵された酸素源に関しては, 東北大学抗酸性菌研究所の新津君の結核菌の炭末加培地による, 深部培養に関する報告がある⁴⁾。試験には幾種のワクチン生産用百日咳菌を用い, 同一結果であることより百日咳菌は培地の状況を考慮に入れると, 培養には絶対に酸素が必要であると考えられる。

1) 脂肪酸の抗菌性について(第1表参照)

炭末加半合成培地(炭末 0.5g/l)の約100%に百日咳菌を培養して, 培養後1000回5分遠心, 炭末を回収し, 2度蒸留水で洗浄遠心して, 百日咳菌の大部分を除去し, デシケーター中で減圧乾燥する。この炭末 25g をメタノールにて連続抽出し, ついでメタノールをとばして蒸留水にとかし, コンゴローート酸性にしてエーテルにて抽出, エーテルをとばすと, 黄色油の部分(約200mg)黄褐色泥状の部分(約50mg)を得る。これを鹼化してエーテル抽出した後, コンゴローート酸性にした後, エーテルで再抽出すると, 前者は黄色油状の不鹼化物で200mg位, 後者は脂肪酸の部分で約20mg位であり, 板状の結晶を混合した黄褐色の固形物を得た。

これらのものを, 10^{-2} mol 含有よりはじめて Sophia の可溶性澱粉加(1g/l)又は活性炭末加(1g/l)半合成培地にて, 百日咳菌に於て抗菌性をみる。(第1表参照)参照の爲に, ステアリン酸, オレイン酸の抗菌性をみた。 10^{-2} mol の濃度では, 脂肪酸 Na の沈澱が生じて結果は不明瞭であるが, 10^{-3} mol 以下は判定し得る。

活性炭末に於ては, 全然発育には影響はない。このことは炭末に吸着された脂肪酸の濃度に逆算して約100倍の濃度であるから, 脂肪酸の無毒化による培養可能な條

ABE, Sadataro: Metabolism of *H. pertussis* III. Mechanism of action carbon, red cell and soluble starch on the medium.

National Institute of Health of Japan. Jap. J. Bact., 7(2): 85-89, 1952.

件は、十分に説明できない。また飽和脂肪酸であるステアリン酸の抗菌性は、この実験では不明であるが、しかし不飽和脂肪酸であるオレイン酸は可溶性澱粉の場合 10^{-3} mol 程度であられて居り、本炭末より抽出した脂肪酸は可溶性澱粉で 10^{-3} mol 位(オレイン酸と当量)で少しく発育阻害に働いて居るだけである。これは不飽和脂肪酸に似て居り、やはり Pollock 女史の不飽和脂肪酸の無毒化という考も少しは意味はある如くである、不飽和物で(オレイン酸と等量)は全然その抗菌像は不明である。

また活性炭末の代りに蔗糖より作製した炭末(1g/l)の培養は、発育はするが著明に活性炭末より発育が悪いことは注目すべきであり、後章に於てまた触れるであろう。

第1表 脂肪酸の抗菌像
(発育度は肉眼的)

		10^{-3} mol	10^{-4} mol	10^{-5} mol	10^{-6} mol	10^{-7} mol
ステアリン酸	活性炭末 ^(c)	+++	+++	+++	+++	+++
	可溶性澱粉(S.S.)	++	++	++	++	++
オレイン酸	C.	++	++	+++	+++	+++
	S.S.	—	+	++	++	++
炭末吸着脂肪酸	C.	+++	+++	+++	+++	+++
	S.S.	+	++	++	++	++
炭末吸着不酸化物	C.	+++	+++	+++	+++	+++
	S.S.	++	++	++	++	++
対 照	C.	+++	+++			
	S.S.	++	++			
蔗糖作製炭末		+	+			

3) 各種培地発育百日咳菌の力源代謝(第2表参照)

B-G-培地発育百日咳菌の代謝様式は第二報に於て記載したが、炭末加半合成培地または可溶性澱粉加半合成培地に発育した百日咳菌の代謝様式が如何に変化するかは興味あることである。即ち細菌は、規定された培養環境により、その環境に適合した適應酵素系が発達することは周知の事実である。

Ajl 氏が腸菌の代謝様式の決定の際有力な論拠となつた、醋酸培地発育腸菌の比較検討がその好例である。もし活性炭末、可溶性澱粉、血球等が百日咳菌の代謝に何らかの関係があるならば、かゝる機序に基く適應酵素系の増大を追跡することにより、その関係機序を推察することができるのである¹⁰⁾。第3表は、かゝる培養後の百日咳菌のワールブルグ検圧計に酸素吸収量を記し、コハク酸の場合を100として比較値を出し、参考に

大腸菌の場合も記載した。

培養には、第二報に記した Sophia の半合成培地に、それぞれ活性炭末又は可溶性澱粉を入れた培地を用い、静止培養を主とし、1日5分間2回振盪したものである。

炭末加半合成培地の百日咳菌は、7日間 37°C 培養後、約3 lの培養液を2000回5分遠心して炭末を大部分除き、後3000回30分で大部分の百日咳菌を集菌して、約50ccに再浮遊し、4000回5分で炭末を除き、4000回30分で集菌、これを二度繰返して約20ccに再浮遊、脱脂綿にて自然濾過したものを酵素液として用いた。可溶性澱粉加半合成培地の場合は、8日間 37°C 培養後、約3 lを3000回30分で遠心集菌し、脱脂綿自然濾過後4000回30分菌を洗浄して、最後に脱脂綿加圧濾過したものであり、炭末の場合の百日咳菌は、Kokkoid でよく被凝集性を保有するが、可溶性澱粉の場合、桿菌状を呈するもの多く、被凝集性も少し落ちる傾向がある。

かゝる菌の酵素系を比較すると、フマル酸系では、S.S. 発育菌が少し大であるが、林檎酸系に於ては、著明に S.S. 発育菌が増大するのに反し、炭末発育菌は B-G 発育菌と似ている傾向がある。焦性葡萄糖→醋酸→蟻酸系もまた炭末の方が非常に増大するが、S.S. の方はやゝ増大し、B-G の方が非常に活性度が弱い。S.S. 発育菌は蟻酸系を除くとよく大腸菌に似て居り、C₄-Cycle が円滑に動いて居ることが想定される。炭末の方は、林檎酸系を除くと、クエン酸及びα-ケトグルタル酸の活性を保有することより、C₇-Cycle がよく動いて居る如き感を与える。百日咳の発育には可溶性澱粉発育菌の如く C₄-Cycle が補強された形が望ましく、血球及び炭末は夫々の弱体化して居る酵素系を補強するが如き作用により、百日咳菌の発育する条件を與えると推察される。しかし一方、可溶性澱粉半合成培地に継代することにより、B-G-培地発育百日咳菌免疫血清による凝集價の低下を來たすことは既定の事実であることより考えて、かゝる培地には百日咳菌には好適ではなく、継代してもあまり変化のない B-G-培地が適當であることより、百日咳菌本来の代謝様式は B-G-培地発育菌に Analog なものであると云い得る。即ち百日咳菌とは林檎酸及び蟻酸系における、非常に重要な力源代謝系が不完全である細菌と考えられる。しかし蟻酸系の方は、醋酸二分子縮合してコハク酸になる経路の存在することにより、その重要さは自から減少するであろう。

4) 活性炭末及び血球と百日咳菌酵素系の活性度に及ぼす影響について(第3表参照)

第 2 表

	活性炭末加半合成培地發育菌 0.73mgN/cc				可溶性澱粉加半合成培地發育菌 0.41mgN/cc				B-G-培地發育菌		大腸菌	
	酸素吸収量(μ l)			比	酸素吸収量(μ l)			比	Q _{O₂}	比	Q _{O₂}	比
	15分	30分	Q _{O₂}		15分	30分	Q _{O₂}					
コハク酸	8	14	33	1.60	8	16	35	1.00	298	1.00	1637	1.00
フマル酸	4	8	22	0.66	7	13	27	0.83	83	0.27	814	0.49
林檎酸	2	4	11	0.33	14	25	57	1.63	41	0.14	717	0.44
焦性葡萄糖	29	57	156	4.72	13	24	52	1.49	36	0.12	2335	1.42
α -ケトグルタル酸	10	20	55	1.66	12	20	44	1.26	127	0.42	844	0.51
オキザール醋酸	4	8	22	0.66	4	8	17	0.48	10	0.03	186	0.11
クエン酸	14	26	71	2.15	2	4	9	0.03	75	0.25	200	0.12
醋酸	31	60	164	4.95	8	15	33	0.94	16	0.05	1244	0.76
蟻酸	20	36	99	3.00	0	0	0	0	0	0	2553	1.56
L(+)-グルタミン酸	8	14	33	1	6	10	22	0.63	347	1.16	/	/

第3表 各基質活性炭末菌液の關係
酸素吸収量 (μ l)

	15分	30分	45分	60分
1. リンゴ酸・菌液	17	30	46	61
2. リンゴ酸・活性炭末	2	4	4	4
3. リンゴ酸・活性炭末・菌液	34	65	95	131
4. 活性炭末	0	1	2	2
5. 菌液	8	15	23	29
(1+2)-(4+5)	11	17	24	32
3-(4+5)	26	50	68	98 (200%増加)
1. フマル酸・菌液	47	67	109	131
2. フマル酸・活性炭末	3	5	7	11
3. フマル酸・活性炭末・菌液	61	95	154	211
4. 活性炭末	5	5	8	9
5. 菌液	34	46	70	84
(1+2)-(4+5)	14	20	36	50
3-(4+5)	22	38	84	127 (150%増加)
1. ケトグルタル酸菌	51	92	139	171
2. K.G.+Carbon	12	18	28	36
3. K.G.+Carbon+菌	80	144	209	274
4. Carbon	6	11	15	21
5. 菌	19	29	50	63
(1+2)-(4+5)	38	70	102	123
3-(4+5)	55	104	141	190 (50%増加)

	1分	30分	45分	60分
1. グルタミン酸+菌	74	144	217	277
2. グルタミン酸+Carbon	4	6	8	8
3. グルタミン酸+菌+Carbon	89	182	260	325
4. Carbon	6	9	13	15
5. 菌	11	23	36	42
(1+2)-(4+5)	61	128	176	228
3-(4+5)	72	160	211	268
(註 中心室に20% HCl)				(20%増加)

実験3)より活性炭末及び血球が酵素補強作用の存在が推定されるので、次の如き実験を行つた。即ち基質(中和したもの)0.1cc炭末(1g/10cc)1cc菌液1ccとの組合せを5組作り、総量を0.4ccになるようにPhosphat Bufferを入れ、中心室に20% KOH 溶液0.2cc又は20% HCl 溶液0.2ccを入れて、第4表の如くに実験する。基質は C₇-Cycle 全部について行われ、炭末においては Warburg 検圧計にて測定前20分間振盪して、炭末のガス吸収を定常状態にするようにし、牛血球液の場合は、常法により3回洗浄して50%浮游液を用いた。加熱血球は100°C10分にこの血球液を加熱して十分均等にす一方、炭末に関しては1930年代に Weland 及び Warburg のアミノ酸分解に関する報告がある(45)(77)。即ち活性炭末は、生体酸化に非常に似た性質をもつて居るのであり、血炭中の二價の Fe が関與するものであることが結論され、蔗糖をやいて作つた炭末にはこの性質がないことである。この活性炭末による酸化は、アミノ酸から $\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ になる反應過程中、生物酸化還元酵素

系と如何に嵌合するか問題であるが、炭末それのみではアミノ酸以外の基質については、活性をもたないとされて居る。

第4表 フマラーゼと活性炭末

	2時間後 旋光度	リンゴ酸 (100cc中 のg数)	旋光度	4時間後 リンゴ酸 (100cc中 のg数)
百日咳菌液	-0.38°	0.078	-0.67°	0.139
同+活性炭末	-0.96°	0.199	-1.32°	0.273
大腸菌	-0.67°	0.139	-1.72°	0.356
同+活性炭末	-1.32°	0.273	-2.37°	0.492
対照 (フマル酸 ノミ)			0	0
対照 (フマル酸 +活性炭末)			0	0

しかるに第3表に示す如くに、ある酵素系の補強作用があることが判つた。即ち炭素及び百日咳菌浮游液の個々の酸素吸収量の和よりも、同時に存在する方が酸素吸収量が増大する事実である。活性炭末にては、グルタミン酸120%, リンゴ酸300%, フマル酸250%, α -ケトグルタル酸250%に増大し、クエン酸、コハク酸、オキザール醋酸、焦性葡萄糖、醋酸、蟻酸系にはこの現象はない。また可溶性澱粉(1g/10cc)1ccを入れた場合には、C₇-Cycle 全部の基質にはこの増大する現象はない。

50%牛赤血球浮游液1ccにおいては、著明にこの現象が存在する。即ちフマル酸130%, リンゴ酸290%, コハク酸114%, α -ケトグルタル酸140%, 醋酸290%, クエン酸280%に増大があり、不変なものはオキザール醋酸、焦性葡萄糖、蟻酸系である。血球を蒸留水にて溶血させると、この増強作用は大になる傾向があり、また加熱血球にもこの作用は同程度に存在する。市販のHemoglobin (1g/5cc) 0.1ccには、この作用はなく、凍結乾燥したStoma (1g/10cc) 0.1ccにもない。蔗糖をやって作った炭末にはこの作用はなく、試験用に血球より作製したHemoglobin (1g/5cc) 0.1ccにも作用はなかつた¹¹⁾。

この増大する現象は、血球及び炭末とある酵素系との間に何らかの影響機序の存在を証明するものである。この増大現象が百日咳培養と何らかの関係があることは実験3)の酵素系の比較実験を考慮すると理解される。

また炭末の場合、表面活性ということだけでは説明し難い。炭末の代りに活性アルミナ、カオリン、硅藻土の如きもので代用してもこの現象がないと同時に、培養実験では炭末の代用にはならないが、蔗糖より作製した炭

末にはこの現象は見られないが、培養試験では発育度は悪いが発育はする。この機序に関しては、以上の実験だけでは不明な点が多いが、やはり炭末のアミノ酸分解の折と同じく、二價の鉄のある状態における作用と考えるのが妥当であろう。Hemoglobinの実験がこれに合わないが、然し或Fe⁺⁺の存在状態であることは推察される。例えば蔗糖をやって作った炭末と二價の鉄を混和しても、アミノ酸の分解が行われないうのと同一である。

5) フマラーゼと活性炭末の関係

活性炭末には、1)にて述べたごとく吸蔵されて居る酸素の存在より酸化物触媒と考えられるが、一方フマラーゼの如き加水酵素系もまた増強することもある。測定方法としては、1927年P. W. Clutterbuckの報告に基いた旋光度測定が用いられた⁹⁾。フマル酸はフマラーゼによりL(-)リンゴ酸となり、 $[\alpha]_D^{20} = -1.7^\circ$ であるが、醋酸ウラニウムが存在すると、 $[\alpha]_D^{20} = -482^\circ$ となるから酵素反応に用いる稀薄なリンゴ酸溶液でも十分正しく測定し得ることである。

実験は $1/10$ M フマル酸10ccを百日咳菌液(0.69mg N/cc)1cc及び大腸菌液(0.51mg N/cc)1cc、活性炭末1gを中試験管に入れ、振盪培養器(37°C)中にて、2時間、4時間と測定し、対照の菌液の入つてないフマル酸及びフマル酸と炭末のものを4時間後に測定したのは当然である。菌液の溶媒は $1/10$ M フマル酸を用いた。

各時間後、検体を水浴上5分加熱後遠心、醋酸ウラニウム約0.5gを入れて加温、除蛋白して自然濾過した後、長さ1dl約7cc容量の旋光度測定管に入れて、型の如く測定する。(第5表参照)

明瞭に百日咳菌液も大腸菌液にも活性炭末が存在すると、フマラーゼの活性が増大し、4時間後には、百日咳菌では200%増大、大腸菌では140%に増大する。

討 論

M. R. Pollock 女史の報告に基いて、百日咳菌の培地に含まれる血球、活性炭末、可溶性澱粉等の機序が脂肪酸といかなる関係にあるかについて実験を進めたが、この説に対しては十分に納得できない結果である。可溶性澱粉が沃度反応と同じく巨大な澱粉の分子中に脂肪酸が捕捉され、電導率の低下をきたすという事実から考えても¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、やはりPollock女史の説もまた一つの因子と考えることはできる。しかし活性炭末の発育増長性は、この脂肪酸の捕捉ということだけでは説明はできず、私の発見した或酵素系の増強作用が活性炭末、血球に存在する事実は、発育には十分なる関係があり、炭末の吸蔵

されて居る酸素もまた或役割をして居るのであろう。しかしこの酵素系増強作用だけでも、發育可能な十分な條件とはなり得ない。即ちこの作用の存する加熱血球即ちチョコレート培地においては、百日咳菌が不發育であることである。これには蛋白の熱変性による脂肪酸捕捉性の欠落と考えると、理解できる可能性が生ずる。

何れにせよ百日咳菌の力源代謝 Cycleは、リンゴ酸系及び醋酸、蟻酸系において弱体をなして居り、この系の増強作用が、活性炭末、血球に存在し、これが發育とは密接に関係しておると考えることはできる。

微生物を培養という現象から通観するとき、腸内細菌の如く、普通寒天に發育し得る細菌群、百日咳菌の如く、B-G-培地にのみ發育し得る細菌群、さらに人工培地に増殖し得ないリケッチャ、ウィールス群、に大別すると、リケッチャの力源代謝系は、力源をアミノ酸からのみ求め、Krebs の C_7 Cycle が存在すると推察される。M.R. Bovarnick 氏の報告を考え合わせるとき、ある力源代謝酵素系の欠落現象と考えられるウィールスの世界に一步近付いた感がする。その力源代謝系の欠落はまづリンゴ酸系であろうと予想されるのである。そして、百日咳菌の如きは、Hemoqhilus group 細菌よりリケッチャに近い位置を占めると、代謝様式の検討より判定するものである。

結 論

百日咳菌本来の代謝系は、 C_7 -Cycle であり、リンゴ酸系も不完全である故、培地中に血球及び活性炭末を必要とし、このものがこの酵素系の補強作用を有す。M.R. Pollock 女史の脂肪酸中毒説は、可能性は十分考えられ

るが、決定的な証明を得ることができなかった。

最後に、御指導を賜わりし、予研第二細菌部々長福見秀雄博士に衷心より感謝するとともに、御鞭撻御便宜を頂いた傳研一研曾良氏、同四研野島氏同七研浮田助教授、山川氏、爲政氏、小田氏、さらに私の討論の相手である畏友予研化学部水野傳一君、の諸氏には、改めて深甚なる謝意を呈する。

文 献

- 1) Pollock M.R.: Brit. J. Exd Path., 28, (1947).
- 2) Pollock M. R.: J. gen. Microbiol. 23, (1948a).
- 3) Pollock M. R.: Long chain unsaturated fatty acids as essential growth factors. Biochem. J. 45, P. 417, (1949).
- 4) Warburg: Biochem ZS., 113, 257, (1921).
- 5) Wieland & Bergel: Ann., 439, 207, (1924).
- 6) Wieland etc.: Ann. 513, 204, (1934).
- 7) Bauer. etc.: Biochem. Zs. 274, 381, (1934).
- 8) 新津泰考: 結核菌の深部培養、活性炭素を用いた無蛋白深部培養基、抗酸菌病研究雜誌、第5巻、第1号、昭和24年。(1949).
- 9) Clutterbuck, P.W.: Biochem. J., 21, 512, (1927).
- 10) Stanier, R.Y.: Simultaneous adaptation. anew technique for the study of metabolic pathways, J. Bact. 54, 339-348, (1947).
- 11) Kobat. E.A.: Experimental immunochemistry (1950). Crystalline oxyhemoglobin, P. 454.
- 12) Bales, F, et Rundle: J.A.C.S. 65, 142, 1943.
- 13) Mikus. F. F. etc.: The complex of fatty acids with amylose. J.A.C.S. (1946), 1115-1123.
- 14) Turnes. N.C.: Starch. blue, Science, 108,302, (1948).