百日咳菌の分類に関する研究

第2報 因子分析法による分類と生物学的性状との関係について

長 田 富 香 山 田 昇

北里研究所 (指導 平野憲正博士 高橋暁正博士)

[受付: 5月4日1953年]

第1報に於て我々は、新旧様々の世代の百日咳菌70株の交叉凝集反応を行い、その凝集価につき、ベクトル量の推計学及び因子分析法を應用して、菌型の分類を試みた。即ち11種類の血清に対する70株の菌の交叉凝集反應に於ける凝集価を因子分析法により分析し、11種類の血清中の抗体の種類及びその含有量を現すと考えられる4つの因子の量を計算し、次で之に対応するものとして、70株の菌の各々につき、上記の抗体に対応する抗原の量を現すと考えられる因子得点を計算した。この因子得点のベクトルの型により70株の百日咳菌を次の如く2型に大別することが出来た。(第1図参照)

図1 因子分析法による2型の分類
(因子得点のベクトル)

I) 4つの因子共に、その因子得点が殆んど平均値に均しく同じ程度を示すもの(70株中37株)

II) 4つの因子の内のいくつかの因子得点が平均値からかけ離れた値を示すもの、但し、その程度は $\pm\sigma$ 以上離れているもの(70株中33株)

その後われわれは、かゝる推計学的方面からの菌型分類と、従来菌型分類の手段の1つとされている生物学的性状とは如何なる関係にあるかを追求したので、その結果について報告する。

生物学的性状との関係

上記の如く、因子分析法により70株の百日咳菌を、その因子得点が平均より $\pm\sigma$ より以上離れているか否かにより2型に大別したが、II型(因子得点が平均より

$\pm\sigma$ 以上離れているもの)に関しては、第1～第4因子の内の何れが平均より $\pm\sigma$ 以上離れているかにより、更に4つに分類して、各種の生物学的性状と比較した所、第4因子の値が $\pm\sigma$ より大きい群は、生物学的性状の上でI型に属するものと異なる点がないと考えられるので、この群はI型に加えることとした。又 $+\sigma$ 以上離れた値を示すものと $-\sigma$ 以上離れた値を示すものとの違いが何を意味するかは、生物学的性状との関係からは不明であるため、一括して $\pm\sigma$ 以上離れているものをII型とした。このような因子分析による2つの型の分類は、前報の如く凝集価ベクトルによつて行つた2型の分類とも可成りよく一致している。従つて本報に於いては、II型を更に細分することなく、I型、II型の分類と生物学的諸性状との関係について研究した。

1) 普通寒天培地及びブイヨン培地における発育の有無

70株の百日咳菌は分離直後より常に25%馬血液加ボルデージャング培地に、約1カ月間隔で継代されたものである。ボルデージャング培地に72時間培養した菌を普通寒天培地及びブイヨン培地に十分大量移植し、37°Cに培養して15日間毎日その発育の有無を観察した。その結果は因子分析によりI型に属する37株中、普通寒天に発育を認めたものは4株、ブイヨンには9株であつた。之に対し、II型に属する33株の内普通寒天培地に発育するものは17株、ブイヨンでは14株であつた。これら2型の寒天培地に発育する割合の大小が推計学的に有意であるか否かを、R. A. Fisherの直接確率計算法により検定すると、 $86 \times 10^{-23}\%$ 以下の危険率でII型は

OSADA Fuka and YAMADA Noboru: On the classification of *H. pertussis*. II. On the relation between the classification by the factor analysis and the biological characteristics. Kitasato Institut. — Jap. J. of Bact., 8(4), 425-428, 1953.

表 I 生物学的性状

性 状 菌 型	寒天培養		ブイヨン 培 養		菌 形 態				カタラーゼ作用				ミ ロ ン 反 應					酸 凝 集 反 應				
	— +		— +		— + ++ +++				— 4 8 16 倍 倍 倍				1 5 10 } } } } } 3 7 20 30 — 分 分 分 分 分					pH 3.9 4.4 6.0 7.0 8.0 } } } } } 4.0 5.5 6.8 7.8 8.4				
I 型	33	4	28	9	13	12	9	3	4	0	24	9	11	13	8	2	3	0	14	19	4	0
II 型	16	17	19	14	8	11	8	6	1	2	22	8	9	8	6	1	9	6	11	11	2	3

I 型より寒天培地に発育する%が多いと云える。この事は、従来百日咳菌は変異すると普通寒天培地に発育可能になると云われている事と考え合せ、II 型に属する菌と変異菌との関係を示唆するものである。ブイヨン培地に於ける発育についても全く同様の結果が得られた。

2) 菌形態の変化

B-G 培地 72 時間培養の百日咳菌につき、グラム及びトリジンブラウ染色により形態を観察した。I 型に属するものうち、13 株は極く小さい定型的な卵円形の Cocco-bacillus であり、すべての菌体が一樣の大きさに揃っており(表中—で示す)、12 株は小さい卵円形の菌の間に短桿菌状を示すものが幾分混在して認められ(表中+)、更に 9 株は短桿菌状のものが多く中に卵円形を呈するものが混在し(表中++)、残りの 3 株は一樣に短桿菌様態を示している(表中+++)。II 型に於いては、(—)は 33 株中 8 株に過ぎず、(+)が 11 株、(++)が 8 株、(+++)が 6 株であつた。この様な菌形態の出現状態と、I 型、II 型の分類との間に相関があるかどうかを、無相関検定法⁹⁾により検定すると、 $P=0.004$ となる。仮説を棄てる危険率を 0.01 に置くならば、明かに両者の間に相関があり、従つて I 型、II 型の区別により菌形態の変化に差が認められると判断する事が出来る。即ち I 型には Cocco-bacillus 乃至はこれに近い形のものが多く、II 型には桿菌様態を示す株の多い事を認めた。この所見も従来の百日咳菌は変異に伴い卵円形より次第に長径を増し桿菌状になるとの考えよりすれば、II 型と変異菌との関連性を思わせるものである。

3) カタラーゼ作用

大坪の方法²⁾に従いカタラーゼを測定した。即ちカタラーゼ液としては、72 時間培養の百日咳菌菌苔より 0.5 mg/cc の生菌浮游液を作り、之を原液として倍數稀釈し、硫酸の存在下に 2 分子の過マンガン酸カリが 5 分子の過酸化水素と結合してその紅色を失うように正確に滴定した過酸化水素及び n/1000 過マンガン酸カリを各管に加え、5 分後に判定した。その結果は、I 型では原液

でも陰性のものが 4 株、8 倍稀釈まで陽性のものが 24 株、16 倍稀釈まで陽性のものが 9 株であつた。II 型では原液でも陰性のものが 1 株、4 倍稀釈まで陽性のものが 2 株、8 倍稀釈まで陽性のものが 22 株、16 倍稀釈まで陽性のものが 8 株であつた。I 型にはカタラーゼ陰性株が 4 株も存在するが、百日咳菌には本質的にカタラーゼ産生能の全くない株が存在するものゝ如く考えられ、之等を除くと、I 型、II 型の区別と、カタラーゼ産生能の多少とは特別な関係があるとは認められない。本反應は生菌液作成後 30~60 分後における試験及び 1 夜氷室保存後に於ける試験でもおむね菌液作成直後の成績と一致する点から相当安定性のあるものである事を知つた。

4) ミロン反應³⁾

B-G 培地 72 時間培養菌苔より 4 mg/cc の 0.85% 生理的食塩水浮游生菌液を作り、ミロン試薬を滴下して、凝集出現時間を測定した。I 型に属する 37 株中、全く陰性のもの 3 株、凝集出現 30 分後のもの 2 株、10~20 分後のもの 8 株、5~7 分後のもの 13 株、1~3 分後のもの 11 株であつた。II 型に属するものうち、全く陰性のもの 9 株、30 分後のもの 1 株、10~20 分後のもの 6 株、5~7 分後のもの 8 株、1~3 分後のもの 9 株であつた。この成績よりみると、II 型は I 型に比し 3 倍のミロン陰性株を有したが、全体としては I 型と II 型の凝集出現時間を平均値の差の検定法により比較すると、 $F_s = 0.909 < F_{33}^{36}(0.05) = 1.82 \sim 1.76$ で I 型と II 型間に有意の差は認められなかつた。尚本反應は蒸留水で菌液を作成した場合にはいつでも直ちに凝集が出現して、著明な差異は認められなかつた。

5) 酸凝集反應

Sørensen の Citrat + HCl 及び Phosphat 緩衝液を用いて、pH 1.0~8.4 の緩衝液を作り、2 mg/cc 生菌液 1 cc に緩衝液 0.5 cc を加え、37°C に 2 時間、後 1 夜室温に放置して成績を判定した。

I 型、II 型を通じて凝集の出現し始める pH は 2.5~

3.6位で大差はないが、凝集を呈する幅には可成りの差が認められる。即ち pH 8.0~8.4迄凝集するものは、II型にのみ3株、7.0~7.8迄のものはI型に4株、II型に2株、6.0~6.8迄のものはI型に19株、II型に11株、4.4~5.5迄のものはI型に14株、II型に11株、3.9~4.0迄のものはII型にのみ6株であつた。従つて、本反應もI型とII型を比較して一定の傾向は認められないが、第1因子の因子得点が、平均値より -1.5σ 以上離れている6株が共に凝集域の最も狭い pH 3.4~4.0の間のみで凝集する群に属し、又 pH 3.4~3.9と、pH 5.5~7.0の2カ所で凝集を起すものはII型にのみ5株認めた。之を凝集域の pH の大きい側の終点の数字(凝集を起す最大の pH の値)について、I型とII型との間の平均値の差の検定を行うと、
$$\frac{\bar{x}-\bar{y}}{\sqrt{\frac{u_1^2}{N_1}+\frac{u_2^2}{N_2}}} = 1.143 < t = 2.032$$
で、I型とII型の間に有意の差は認められなかつた。

総 括

百日咳菌 70 株の生物学的性状と、因子分析法による菌型分類との関係を総括すると、従来百日咳菌変異の目安とされている普通寒天培地に対する発育の有無については、因子分析法による分析の結果 I 型に属した 37 株中、4 株だけが寒天培地に発育し、II 型に属した 33 株中では 17 株が発育した。両者の百分率を Fisher の直接確率計算法で検定すると、II 型に属する菌株は、I 型に属する菌株に比し寒天培地に発育する率の多い事が $\alpha = 86 \times 10^{-23}$ 以下で証明された。ブイヨン培地に対する発育の有無についても、同様に直接確率計算法で検定すると、II 型菌は I 型菌に比しブイヨンに発育する率が多い事が証明された。

菌形態については、I 型菌 37 株中、卵円形の *Cocco-bacillus* 状を呈する菌体のみ認める株は 13 株存し、短桿菌状を呈する菌体のみを認める株は 3 株であつた。之に対し、II 型菌 33 株中には、卵円形のものが 8 株認められるのに対し、短桿菌状のものは 6 株認められた。之を無相関検定法により検定した結果、 $P=0.004$ で、I 型、II 型の区別と菌形態の変化とは明かに相関があり、I 型菌は *Cocco-bacillus* の傾向が強く、II 型菌は短桿菌様態を呈する傾向が強い事を知つた。

カタラーゼ作用については、全く陰性のものが I 型に 4 株、II 型に 1 株存在するが、全体としてはカタラーゼ産生能について、I 型、II 型間に一定の傾向は認められなかつた。従つて百日咳菌には I、II 型の区別とは無関

係に、本質的にカタラーゼ作用のない株が多少存在するのではないと思われる。

ミロン反應に於いては、凝集出現時間の測定を行い、全く反應の陰性のものが I 型菌群には 3 株であるのに、II 型菌群には 9 株あつた。又 II 型は I 型に比し凝集出現時間の遅れるものゝ多い傾向を示したが、この出現時間の平均値の差の有意性を検定した結果は、推計学的には I 型と II 型間には有意の差は認められなかつた。

酸凝集反應に於ては、凝集し始める pH は 70 株を通じて大体 2.5~3.6 で菌株間に大差は認められないが、凝集を起す pH の範囲は 3.4~4.0 間の最も狭いものが II 型にのみ 6 株存し、又 2 個所に凝集を呈する株も II 型にのみ 5 株認められた。従つて II 型は I 型に比し酸凝集域の狭い傾向が予想される。然しこれも、凝集を起す最高の pH の値につき、平均値の差の検定を行つたのでは、両者の間に有意の差は検出されなかつた。

考 按

以上 11 種類の免疫血清に対する 70 株の百日咳菌の、交叉凝集反應における凝集價をもとにして、因子分析法により、各血清及び各菌の性質を示す因子(抗原構造及び抗体構造に對應するもの)の種類とその量とを計算し、これによつて 70 株の百日咳菌を 2 型に分類する事が出来たが、この分類により、いくつかの因子の量が平均値からかけ離れているという点で II 型として一括された株は、生物学的性状の上でも、その内のいくつかの性状が I 型と異つた特徴を持ち、又従来変異菌とみなされている菌株は II 型に属するとう点で、こゝに計算された因子は、生物学的性状にも関係がある事を知つた。

然し個々の生物学的性状に於て、II 型の特徴とみなされた所の (1) 寒天及びブイヨン培地に発育し、(2) 菌形態に於いては長径が増大し、(3) ミロン反應出現時間が遅れるか、又は陰性を示し、(4) 酸凝集域が短縮する、等のすべてが、II 型にのみ選択的に著明であるとは限らない。又 II 型は I 型から変異したものであると考える場合にも、色々な種類の生物学的性状がすべて一様に、平行して変異するのではなく、各菌株によりまちまちのいくつかの生物学的性状が変化するため、因子分析による 2 型の分類が、各種の生物学的性状による分類のすべてと、全く一致する事は考えられない。

然し乍ら因子分析法による分類が、このように生物学的性状と或程度の一致を示した事は、本分類が單なる数学的產物としてのみでなく、實際の生物現象をも説明していると云う点で、非常に興味ある事であり、因子分析法の適用と云う新しい面からの分類は、従来見出されな

かつた方面への発展を期待する事が出来ると思う。

尚 II 型として一括されているものは、どの因子が $\pm\sigma$ 以上離れているかにより更に細分される可能性があり、又 $+\sigma$ 以上離れているものと、 $-\sigma$ 以上離れているものが如何なる差異を意味するか、又数学的には軸回轉により更に一層生物現象との良い一致を期待する、等の問題が今後に残された課題である。

本分類と、従来抗原分析の手段とされている吸収試験との関係については第 3 報に述べることにする。

終りに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜つた平野部長並びに 東京大学医学部高橋先生に 衷心より感謝す

る。

本研究の一部は文部省科学研究費の補助によつた。こゝに厚く謝意を表する。

文 献

- 1) 矢追秀武, 田島正典: 予防衛生研究所年報, 昭 22 (1947).
- 2) 大坪五也: 細菌学雑誌. 329, 87-104, 大 12.
- 3) White, P. B.: J. Path. & Bact., 32, 85, 1929.
- 4) 岡本 啓: 日新医学. 32, 11, 昭 11 (1936).
- 5) 高橋暁正, 土肥一郎: 推計学入門, 36-37, 医学書院. 1951.
- 6) 佐藤良一郎: 無相関検定法. 改訂増補. 中文館書店. 1949.

武田の細菌製剤

日本薬局方

予 防 用	ジフテリアトキソイド・百日咳ワクチン (各 20 cc 瓶入)	痘 苗 (10 人分・100 人分)
	破傷風トキソイド (20 cc 瓶入)	腸チフス・パラチフス混合ワクチン (5 cc 瓶入)
	コレラ ワクチン (50 cc 瓶入)	インフルエンザウイルスワクチン (2 cc 瓶入)

治 療 用	ジフテリア抗毒素 3cc (1,500 単位)・1cc (500 単位)	診 断 用	ツベルクリン
	破傷風抗毒素 20 cc・40 cc (各 24,000 単位)		1cc・1cc (各 10 管)

大阪市東区道修町 武田薬品工業株式会社 東京・札幌・福岡・名古屋・仙台・鹿児島