百日咳菌毒素に関する研究

佐 藤 壽 永 室 功

東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)

〔受付: 9月5日 1953年〕

緒 論

本菌の毒素に関しては, Leslie 等¹⁾, Evans 等²⁾ によつてその特異性, 抗原性並びに家兎皮内注射による特異的出血性壊死の出現等が明らかにされ, 引続き本菌毒素が易熱性であり, Formalin, Phenol, 紫外線照射³⁾等によつて無毒化され, 又菌体からの抽出過程に於ても屢々毒性の減弱すること等が認められた。

従つて従来この毒素分劃を抽出するに際しても, 超音波, 凍融法及び尿素抽出等の比較的温和な方法が用いられ, 又液体培養に於て其の培養液に, 或いは單に菌体を洗滌するだけで相当の毒素成分が抽出される事も既に確認されている。只本物質の化学的性状に關しての報告は少い様で, 山本⁴⁾⁵⁾⁶⁾ は, DNA を主体とする核蛋白であると結論し, Pillemer 等⁷⁾ は之を單純蛋白であるとして居る。

余等は高分子核酸及び核蛋白に主眼を置き, 抽出, 精製過程に於て定性反應及び家兎皮内反應等を観察しながら, 各菌体成分を分劃し, 其の毒性, 化学的性状等に就て研究したので, 其の知見を報告する。

実験材料及び方法

菌株: 群大, 医, 微生物学教室分譲の広瀬初代株で, Bordet-Gengou 培地に3代培養後使用した。本菌株は血清学的に春日⁸⁾ の1型菌に相当し, 3B型抗血清に凝集せず, 1型L抗血清に著明に凝集する。又生菌0.4mgの接種で家兎皮内に著明な出血性壊死を生起する。

培地及び培養方法: 培地は Casamino acid (Vitamine free Casamino acid Difco) を加えた炭末加無蛋白液体培地 (善養寺)⁹⁾ を使用し, Roux 瓶に400cc 宛分注, 120度, 20分高压滅菌後 Bordet-Gengou 培地から直接2mgの菌を接種し, 37°C, 5日間培養した。

化学分析: 菌体成分各分劃のN, Pの測定は夫々 Microkjeldahl 法及び Fiske-Subbarow 法に従い, 還元値は Hagedorn-Jensen 法により, INH_2SO_4 で加水分解

し, 其の間3, 4, 5, 6の各時間に還元力を測定して其の最高の値をブドウ糖に換算して表した。

電気泳動: 次の條件に従い, Tiselius 電気泳動装置 (SCH. B型, 日立) により行つた。

試料: 1.0~0.3% (Phosphate buffer, pH7.8), イオン強度: 0.2 温度: 2°C, 時間: 50分, 電流: 10mA.

毒性の判定: 毒性は家兎皮内反應及びマウス致死量を以て檢した。即ち檢体を水に溶解して連続稀釈を行い, 可檢量が0.5cc 中に含まれる様にし, 家兎脱毛背部の皮内に注射し, 24及び48時間後に生ずる壊死部の直径を測定した。而して壊死直径1~3mm迄を陽性とし, 最小壊死量 (MND) を以て表した。一方マウスに対しては各被檢量につき2~3匹のマウスを使用し, 0.5cc 宛を腹腔内に注射して, 5日間觀察後, 最少致死量 (MLD) を求めた。

菌体成分抽出法

40l の培地に5日間培養し, de Laval 遠心器に依り分離し, 濕潤量約33gを得た。

先ず予備実験に於て核蛋白が毒素成分の主体であるとの文献に従い, 之を菌体から抽出する目的を以て (1) 0.01M クエン酸ソーダの存在に於て0.2~0.01% DCA (Desoxychol 酸) を菌体 (10mg/cc) に作用せしめた (Avery,¹⁰⁾ Alexander,¹¹⁾ Schneider,¹²⁾)。この方法で本菌は容易に溶菌されるが, その抽出液中の毒性は対照 (DCA なし) に比し著しく弱い。尙おこの場合抽出液中のNとPとを測定すると, DCA 0.01% では対照と変わらないが, DCA 0.1% となるとP量は変わらないがN量は処理時間が長くなると却つて減少する。之は DCA の作用によつて蛋白の一部が変性して不溶性になつたものと思われ, このことは毒性物質が核酸ではなく蛋白であるこ

SATO, Hisashi and HIMURO, Isao: Studies on Pertussal toxin. Bacteriological Department, Medical Faculty, Tohoku University, Sendai. Jap. J. of Bact., 8(8), 829-833, 1953.

とを想像させる。又 (2) 上述のクエン酸ソーダ液に 1 M に食塩を加えた溶液では、抽出される P 量は前者に比して大差はなく菌もよく溶けるが、N 量は極めて少く、而もこの抽出液は殆んど毒性を示さない。即ち以上の方法は本菌の毒素成分抽出には不適であり、(3) 結局対照として用いたクエン酸ソーダのみの溶液に菌を浮遊せしめ、37°C に 15~60 時間放置するだけで本菌は容易に自家融解を起し、之から毒素成分を抽出することが出来る。

1) 自家融解による抽出：以上の事実に基づいて、次の様な方法により各菌体成分分割の抽出を行つた。即ち約 30g (湿潤量) の菌体をクエン酸ソーダ溶液 1 l に浮遊せしめ、37°C に 15 時間放置した後、遠心により上清と菌体とを分ち、この菌体は再び 1 l の同溶液に浮遊せしめて更に 45 時間、都合 60 時間放置後、菌体残渣と上清とを分つた。この上清は 15 時間抽出上清とともに種々の濃度の Ethanol によつて分割した。即ち先ず Ethanol 50 % で沈降するものを Fr. I、其の上清から Ethanol 75 % で沈降するものを Fr. II、同様に Ethanol 80 % 沈降物を Fr. III、其の上清を蒸発濃縮して Fr. IV とした。さてこの Fr. I. II. III の毒性を比較すると、両抽出液とも Fr. I が最も毒性強く、Fr. II 之に次ぎ、Fr. III は極めて毒性が弱いので、Fr. I₁₅ + Fr. I₆₀、Fr. II₁₅ 及び Fr. II₆₀ の夫々から毒素成分の精製を行つた。

2) Sevag 法¹³⁾ による処理：先ず毒素成分たる核蛋白質と混在する多糖体及び遊離核酸を分つために、Sevag

法に従い処理した。即ち上述の分割の湿量約 5 g につき 50cc の水に溶解して粘稠な溶液 (pH7.0) を得、之に Chloroform と Amyl alcohol とを夫々 1/4 量及び 1/10 量に加え振盪せる後、遠心に依り Chloroform Gel (核蛋白質) と上清 (多糖体+核酸) とを分ち、上清は Gel の出来なくなる迄 15~20 回同操作を反復し、各回の Gel は其の都度水にて洗い、この洗液に就ても同操作をなし、Gel と上清とを得、上清は先の上清と合した。一方各回の Gel は Ethanol 3 倍量の添加により解膠沈澱し、水に溶解する (この際多少の不溶部を残す)。

3) 糖蛋白質体の分離：次に Robbins, Pillemer 等¹⁴⁾ に従つて、この溶液中に混在する 1 種の糖蛋白質体を除去した。即ち一部の溶液について糖蛋白質を除去する爲の最適 CaCl₂ 濃度を検討せる結果、0.1M では核蛋白質が溶存し、糖蛋白質のみが沈降するが、0.025M に於ては、核蛋白質も亦沈降することを認めたので、残余の溶液 90 cc に CaCl₂ を 0.1M の割合に加え、2~3°C の氷室に 1 夜放置後、沈澱を遠心除去し、糖蛋白質を得た。一方其の上清を透析後、新に CaCl₂ を 0.025M の割合に加え Ethanol を 50 % に加え、氷室に暫時放置後、遠心して沈澱を分ち、水に溶解して再透析後、Ethanol を 3 倍量に加えて沈降し、凍結乾燥して毒素分割 (核蛋白質分割) を得た。

4) 多糖体及び核酸の分離：一方 Sevag 法上清には食塩を 1 M、Ethanol を 50 % に加えて糸状の核酸を得、之を更に Avery 等¹⁰⁾ に従い CaCl₂ を用いて精製した。他方核酸を除いた上清からは多糖体分割を得た。

第 1 表 各成分の定性反應と分析

		Fr. I 15+60			Fr. II ₁₅			Fr. II ₆₀			各 Fr. から 多糖体
		核酸	毒素	糖蛋白質	核酸	毒素	糖蛋白質	核酸	毒素	糖蛋白質	
定性 反應 0.1 %	Diphenylamine 反應	+++	++	+	+++	++	±	+++	++	±	—
	Cystein-H ₂ SO ₄ 反應	+++	++	±	+++	+	—	+++	++	—	—
	Orcinol 反應	++	+	±	+++	+	±	++	±	+	++
	Carbazol 反應	+++	+	+	+++	+	+	+	+	+	+++
	Biuret 反應	—	++	++	—	++	++	±	++	++	—
分 析	還元糖 (%)	19.56	17.66	24.22	19.56	11.12	17.66	12.06	20.44	22.32	15.78
	N (%)	11.82	13.72	11.75	11.15	14.84	11.75	13.02	13.90	10.80	4.48
	P (%)	6.30	1.45	0.50	6.50	1.25	0.62	6.10	1.45	0.50	0.45
	N/P	1.87	8.57	17.53	1.76	11.87	18.95	2.13	9.58	21.60	

実験成績

定性反應及び分析：(第1表) 上記の菌体各成分は0.1%水溶液として定性反應を行つたが 不溶性の糖蛋白質は均等な懸濁液として用いた。(1) 各分割の核酸はBiu-ret 反應が陰性であるが Fr. II₆₀ の核酸のみは微弱陽性を呈し, N/P = 2.13 で若干の蛋白を含んでいると思われる。之に反し, Fr. I₁₅₊₆₀ 及び Fr. II₁₅ の核酸は N/P が1.87 及び 1.76 で, 核酸の理論値に近い。全体として核酸は還元値が高く, Carbazol 反應も強く, N, P₁ が少いのが多糖体の混在が考えられる。(2) 毒素成分はDNA 及び蛋白反應が比較的強く, N/P が 8.57, 9.58, 11.87 を示し, 核蛋白の外に遊離の蛋白等が混在していると思われる。(3) 一方糖蛋白質は蛋白及び多糖体反應が比較的強く, 核酸反應が微弱陽性で, 還元値が他の成分に比し多く P は少い。(4) 多糖体分割は著明な糖反應を呈するにも拘らず, 還元値も, 収量も少なかつた。之は他の分割に移行して居る爲と想像される。

電気泳動：各分割中, Fr. I₁₅₊₆₀ 及び Fr. II₁₅ の毒素分割と, Fr. II₁₅, Fr. II₆₀ の核酸分割とに就てのみ本分析を行つた(第1図)。これらの易動度, 定性反應及び分析の結果を綜合して見ると, 毒素分割は何れも核酸,

第1図 電気泳動所見

核蛋白, 核酸脱蛋白又は多糖体と思われる 3 Components を示し, 核酸分割は Fr. II₁₅ に於ては核酸 (DNA 及び RNA) 及び多糖体と思われる 3 Components より成り, Fr. II₆₀ の核酸分割は単体の像を示している。

各分割の毒性：毒性試験には Fr. II₆₀ からの各分割を使用した。この結果家兎皮内反應では毒素分割が最も毒性強く, MND 0.0037mg を示し, 之の量はN量にして0.00051mg に相当する。糖蛋白質は0.03mg 迄陽性を呈し, 恐らく毒素成分の混在と思われる。一方核酸分割は1.0mg では陽性であるが, 0.25mg では多少の発赤のみで特有な壊死は出現しなかつた。之に反して多糖体分割は殆んど毒性を呈せず, 1.0mg の注射でも多少の発赤のみで壊死の出現を見なかつた。一方マウスに対

する毒性は各被検量につき3匹宛を使用した結果, 毒性分割が最も毒性強く, 0.25mg で全動物を致死せしめ, 糖蛋白質, 核酸及び多糖体分割は1.0mg でも之を致死せしめ得なかつた。

毒素分割に就ての吟味

上述の如く, DCA による菌体抽出液は毒性が弱く, 又菌体抽出液に食塩を1Mに加え, Ethanol 50%で沈降した沈渣も家兎皮内反應が減弱する事実を認めた。之等を分離された毒素成分に就て再確認する目的で次の実験をなした。

(1) DCA による処理：Fr. II₆₀ 毒素分割を1mg/cc に水に溶解し, この2cc 宛に, DCA 0.1, 0.2, 0.4% となる様に加え, DCA を含まない対照と共に 30, 60, 120分と37°C に放置し, 各時間毎に Ethanol 3倍量宛加えて沈渣を分ち, 之を3回 Ethanol で洗つた後, 4cc の水に溶し (DCA 0.4%の60分, 120分処理の沈渣は若干難溶性であつた), 各々の0.5cc 宛を家兎皮内に注射した。この結果, 0.2及び0.4% DCA で処理した場合は60分, 120分に於て対照に比し毒性が著明に減弱している。このことはDCAにより核酸と蛋白とが分離され, 蛋白が変性して毒性を失つたものと考えられる。

(2) 高濃度食塩溶液から Ethanol 50%に加えて沈降せる場合：Fr. II₆₀ 毒素分割を1mg/cc に水にとかし, 其の2cc 宛に4M, 2M食塩水及び水の各2cc を加えた。これ等溶液を何れも Ethanol を以て沈降させ, 沈渣を夫々4cc の水に溶解し, 其の0.5cc 宛を家兎皮内に注射した。この結果2M (最終濃度) 食塩溶液からの沈降物は多少の発赤, 硬結のみで, 壊死は認められず, 1M溶液の時は弱陽性, 対照の水溶液の時は強陽性であつた。

毒素分割より核酸及び蛋白の分離

上述の事実は何れも(1)高濃度食塩溶液中では核蛋白が解離状態にあること, (2)核蛋白の中, 毒性を示すものは核酸ではなく, 蛋白であることを想像させる。今本菌の核蛋白が若し高濃度食塩溶液中で解離状態にあるとすれば, 食塩溶液からの Sevag 法により, 核酸脱蛋白が得られる筈であり, 若しこれが得られるとすればこのものは毒性を有するだろうか, 之等を検討する目的で次の実験を行つた。

実験方法：毒素分割40mgを170ccの水に溶解し, これに食塩を1Mに加えた。この際多少の沈降物を生じたので遠心して集め Ethanol 沈降により PFI(収量1.0mg)を得た。遠心上清は上述と全く同様の Sevag 法により, Gel と上清とを分離し, Gel は Ethanol で解膠沈澱後,

透析し、凍結乾燥して PFII (18.2mg) とした。一方 Sevag 法の上清に Ethanol を 50 % に加え、核酸を沈降し、CaCl₂ により精製して、之を NA (8.0mg) とした。

実験成績：PFII 及び NA に就て定性反応、分析並にマウス毒性及び皮内反応を検し、PFI は定性反応及び皮内反応のみを行つた。之等の結果は第 2, 3 表に示した。

第 2 表 核酸及び核酸脱蛋白の定性反応と分析

		PFI	PFII	NA
分 析	N (%)		11.55	4.50
	P (%)		0.25	3.20
	N/P		46.32	1.42
定性 反 應	Diphenylamine 反応	—	—	+
	Orcinol 反応	—	—	+
	Carbazol 反応	+	—	+
	Biuret 反応	+	+	—

第 3 表 核酸及び核酸脱蛋白の毒性

		PFI	PFII	NA
家 兔 皮 内 反 應	0.015 mg	⊕	⊕	⊕
	0.007 mg	⊕	⊕	多少の 発赤のみ
	0.003 mg	⊕	⊕	⊕
マ ウ ス 毒 性 対	1.00 mg		○●	○○
	0.50 mg		●●	○○
	0.25 mg		○●	○○

註 皮内反応 + 壊死直径 1~3 mm
 ++ " 3~5 mm

○ 硬結、腫脹を伴う

マウス ● 死

○ 生

PFII は N/P が 46.32 を示し、P が極めて少なく、核酸反応も陰性である。一方 NA は N/P が 1.42 を示しているが、N、P 共に少く、多糖体の如き不純物の混入を思わせる。一方皮内反応は NA に於ても陽性であるが、PFI、PFII に比し著しく弱く、又対マウス毒性は PFII、NA 間に明瞭な差異を示し、NA は 1.0mg に於ても致死せしめ得ない。即ちこの結果から皮内反応及びマウスに対する毒性とも NA に比し PFII の毒性がより強い結果を示した。

総括と考按

余等は家兔皮内に著明な出血性壊死をおこす百日咳 1 相菌の自家融解液から菌体成分を抽出し、これ等の化学的性状及び毒性等に就て検討を加えた。

(1) 菌体成分抽出に当り、クエン酸ソーダ液を用いた時と、之に 1 M 食塩を加えた場合とでは、皮内反応に著明な差異があり、後者は殆んど陰性を示しその抽出液は、対照に比し N が著しく少く、P は余り差がない所を見ると、この場合は主に DNA そのものが抽出されるのではないと思われる。

(2) 毒素分割は定性反応及び分析の結果等から主として蛋白及び核蛋白の混合物と考えられるが、これを (i) 水溶液として Sevag 法を行うと上清に遊離の核酸が移るが、Gel の方にも尙お多量に存在する。然るに (ii) 高濃度食塩溶液となして Sevag 法を行うと容易に蛋白と核酸とを分離することが出来、又 (iii) 高濃度食塩溶液から Ethanol 50 % で沈降する部分は皮内反応が減弱すること等から、本菌の核蛋白は食塩水中に於て解離しているのではないと思われる。この事は勿論 Sevag 法自身が一部蛋白の変性を来し、核酸と蛋白との結合を開裂する作用も考えられ速断はなし得ないが、木下等⁵⁾、青野等¹⁶⁾の他の細菌に於ける所見と比較すると、本菌の核蛋白は解離し易い状態にあると思われる。

(3) 先に山本等⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾は菌体の凍融又は洗滌により得られた抽出溶液から等電点法により、粗毒素分割を分離し、更に Pillemer 等¹⁴⁾に従い精製毒素を得ているが、この毒素分割は DNA の反応が著明に陽性で、N/P が 2.3 であることから、核蛋白が毒素の本態ならんとなし、又之に DNA ase を作用させると毒素が減弱又は消失する故、毒性は DNA に関係があるだろうと推論した。余等の得た毒素分割は核酸反応は陽性であるが、多量の蛋白が存在し、又 DCA を作用させると毒性は著明に減弱する。即ち DCA は一方表面活性剤として働き蛋白を変性せしめ (Anson¹⁸⁾)、他方核蛋白を核酸と蛋白とに開裂 (Marko,¹⁹⁾ Chargaff²⁰⁾) させる作用があり、毒素分割中の核蛋白は DCA に依つて核酸と蛋白とに分れ、分れた蛋白の変性を来し、これによつて毒性が失われると推測される。従つて毒性の原因は蛋白にあると考えられるのである。又毒素分割の食塩溶液から Sevag 法により得られた蛋白は、N/P が 46.32 を示し、P が極めて少いが、同時に分離された核酸に比し毒性が著しく強い点等からも毒性の主体は蛋白質にある様に思われる。而して菌体蛋白を夫々完全に分離して単体とするこ

とは極めて困難で、毒性を示す蛋白も核蛋白から由来する核酸脱蛋白であるか、又はそれ以外の菌体蛋白であるかの決定は困難であるが、本毒性蛋白は高濃度塩類溶液に溶存し、Sevag 法によつて得られたものであり、この操作から考えると核酸脱蛋白とも考えられる。

結 論

(1) 炭末加無蛋白液体培地の培養菌体の自家融解液から菌体成分を抽出し、Ethanol 及び Sevag 法によつて各種成分を分離する方法を述べた。

(2) 本菌の核蛋白は高濃度食塩溶液中では解離状態にあると思われ、その中での Sevag 法により P 量の極めて少い毒性ある蛋白と毒性のない核酸を得ることが出来る。

(3) 毒素分離は主として蛋白質(核蛋白+蛋白)と考えられ、MND 0.0035mg, マウス MLD 0.25mg を示し、DCA の作用により毒性は著しく減弱する。

(4) 菌体成分を夫々完全に分離することは極めて困難で、糖蛋白体、核酸も皮内反応陽性を呈するが、毒素分離に比し著しく弱い。

文 献

- 1) Leslie, P. H. and Gardner, A. D., J. Hyg., 31 423, 1931
- 2) Evans, D.G.: J. Path. Bact., 51, 49, 1940
- 3) Pittman, M.: J. Imm., 69, 201, 1952
- 4) 山本郁夫, 他 2 名: 細菌誌 6, 47, 昭 26 (1951)
- 5) 山本郁夫, 他 4 名: 細菌誌 7, 623, 昭 27 (1952)

- 6) 山本郁夫, 他 11 名: 細菌誌 7, (特別号) 399, 昭 27 (1952)
- 7) Robbins, K. C. and Pillemer, Z.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 74, 75, 1950
- 8) 春日忠善, 他 2 名, 細菌誌 7 (特別号) 436, 昭 27 (1952)
- 9) 善養寺浩: 総合医学, 8, 377, 昭 26 (1951)
- 10) Avery, O. T. and McCarty, M.: J. Exp. Med., 83, 97, 1946
- 11) Alexander, H. E. and Leidy, G.: J. Exp. Med., 93, 345, 1951.
- 12) Schneider, M. D.: J. Bact., 63, 495, 1951
- 13) Sevag, M. G., Lackman, D. B. and Smolens, J.: J. Biol. Chem., 124, 425, 1938
- 14) Burell, J. I., Robbins, K. C. and Pillemer, L. Science, 108, 311, 1948
- 15) 木下嘉一, 佐々木彰: 第 26 回日本細菌学会発表, 昭 28 (1953), 新潟
- 16) 青野義一, 中目幡雄: 同上学会発表
- 17) 山本郁夫: 第 7 回日本細菌学会関東支部会発表, 昭 27 (1952), 東京
- 18) Anson, M. L.: J. Gen. Phys., 23, 239, 1939
- 19) Marko, A. M. and Butler, G. C.: J. Biol. Chem., 190, 165, 1951
- 20) Chargaff, E. and Saidel, H. F.: J. Biol. Chem., 177, 417, 1949