C1毒素非産生Clostridium botulinum C型菌のC2毒素産生及び胞子形成との関係について

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 芹川, 俊彦
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9005

金沢大学十全医学会雑誌　第91巻　第5号　687－694　(1982)

C_1毒素非産生 Clostridium botulinum C 型菌の C_2毒素産生及び胞子形成との関係について

金沢大学医学部微生物学講座（主任：西田尚紀教授）
芹　川　俊　彦

（昭和57年9月2日受付）

C_1毒素非産生 Clostridium botulinum C 型菌8株について，C_2毒素産生の有無をグルコース濃度1.0％の pre - reduced anaerobically sterilized - trypticase - yeast - glucose 培地（PRAS - TYG 培地）の培養上清をトリプシン処理することにより検討した結果，全株共にC_2毒素を産生することが判った．またC_2毒素産生に関し，本培地はグルコース濃度0.2％の PRAS - TYG 培地，あるいは Egg meat 培地よりも良好であることが判った．培養時間とトリプシン処理によるC_2毒素の活性化を検討した結果，C_2毒素は培養液中に非活性の形で放出され，培養期間中に培養液に含まれる何らかの酵素により活性化されることが判った．更に，C_2毒素産生と胞子形成の関係を検討した結果，胞子形成が多ければ多いほどC_2毒性が高く，培養液中の胞子数が10^4/ml 以下の場合には，C_2毒性は認められなかった．また，C_2毒素は対数増殖期には産生されず，胞子形成期に菌体内に産生され，胞子が成熟し，free spore になる過程に培養液中に放出されることが判った．

Key words　*Clostridium botulinum* type C, Sporulation, Toxin production, *Clostridium botulinum* C_2-toxin.

著者は1974年から1976年にかけて，石川県の湖沼地帯における Clostridium botulinum C 型菌の分布調査を実施し，C. botulinum C 型菌が本県に広範囲に分布することを明らかにすると共に、多数の C 型菌を河北潟の土壌から分離した[1]．その際，Hungate[2]の方法に従い厳密な嫌気条件下で作製した（pre-reduced anaerobically sterilized，以下 PRAS と略）毒素産生用クックトミート培地[1]においても，C. botulinum C 型菌の主毒素であるC_1毒素を産生しない菌株を8株分離した．これらの菌株はC_1毒素を産生しない外は、培養性状，生化学性状が C 型菌と全く同一であり、更に C 型菌に特異的な抗菌血清に対し被凝集性を示すことから，これら8菌株を C 型菌の無毒株と同定した[1]．一方，Eklund ら[3]はC_1毒素非産生 C. botulinum C 型菌株の中には、培養菌液をトリプシンにより処理することによりC_2毒素を証明出来得る菌株が存在することを報告した．著者は上述の Eklund らの知見に基づき、土壌から分離した8菌株の無毒株について，嫌気的な要求度が強い C 型菌の発育に最適である PRAS 培地を用い，C_2毒素産生を検討した．また，本研究の途次，C. botulinum C 型菌のC_2毒素産生が胞子形成と密接に関係していることが示唆されたので，両者の関係についても併せ検討した．

材料及び方法

I．被験菌株

河北潟の土壌から著者が分離したC_1毒素非産生 C. botulinum C 型菌8株，85－14，85－18，86－16，86－18，86－19，92－13，98－1，98－2[1]を用いた．

II．使用培地

C_2-Toxin Production by *Clostridium Botulinum* Type C Having No C_1-Toxigenicity and the Relation of C_2-Toxigenesis with Sporulation Frequency. **Toshihiko Serikawa,** Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

毒素産生用培地としてグルコース濃度1.0％のPRAS - trypticase - yeast - glucose 培地（以下PRAS - TYG 培地と略）を用いた．本培地は，Eklundら[3]が C_2毒素の検討に用いたTYG培地の組成，即ちトリプチケースペプトン（BBL）3％（W/V），酵母エキス（Difco）2％（W/V），グルコース 0.2％，塩酸システイン 0.1％を基礎とし，この外更にグルコース0.8％，緩衝系として Na_2CO_3 0.4％，KH_2PO_4 0.045％，K_2HPO_4 0.045％，塩類として $(NH_4)_2SO_4$ 0.09％，NaCl 0.09％，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.009％，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.009％，酸化還元指示薬としてレザズリン0.0001％を添加したものである．本培地は，ガス噴射装置[4]を用い，CO_2存在下で中試験管（16×160 mm）に8 mlずつ分注し，ブチルゴム栓をして115°C，15分間高圧滅菌することにより作製した．なお，比較培地としてグルコース濃度0.2％のPRAS - TYG 培地，及びC. botulinum C型菌の発育が良好であるEgg meat 培地（Difco）[5]を用いた．

III．植菌及び培養

肝片加肝ブイヨンで16時間前培養した菌液0.2 mlを，中試験管中のグルコース濃度1.0％または0.2％のPRAS - TYG 培地8 mlに CO_2噴射下で植菌し，または中試験管中のEgg meat 培地10 mlに大気下で植菌した後，CO_2存在下で培養を行った．また，培養菌液の遠心上清液（450×g，15分間）を毒素液とした．

IV．毒力の測定及びトリプシンによる毒素の活性化

毒力の測定は，0.02％ゼラチン加0.05 Mリン酸緩衝液（pH 6.5）で2倍段階希釈した試料0.25 mlをマウスの尾静脈に注射し，3日間生死を観察しminimum lethal dose（MLD）/mlを求めた．毒素の活性化は，培養上清液を等量の0.5％トリプシン溶液と混合し，37°C，1時間反応させることにより行った[3]．トリプシン溶液は，0.05 Mリン酸緩衝液（pH 6.5）100 mlにトリプシン（Difco，1：250）を0.5 g溶解したものを用いた．なお，トリプシン溶液に等量の生理食塩水を混合し，その0.25 mlをマウスの尾静脈に注射したが，マウスは何ら異常を示さなかった．また，トリプシン処理後の試料は4°Cにおいて保存したが，その毒素活性は安定で，1週間後においてもMLD/mlの値は変化しなかった．

V．抗毒素血清及び中和試験

C. botulinum C型菌の C_1，C_2毒素おのおのに対する抗毒素血清は，大阪府立大学阪口玄二博士より分与を受けた．なおこの抗 C_2毒素血清は，Eklundら[3]の報告した抗 C_2毒素血清と同一であることが確認されたものである．C. botulinum A，B，D，E型抗毒素血清は千葉県血清研究所近藤久博士より分与されたものを使用した．C. novyi A，B型抗毒素血清はWellcome research laboratories（英国）より購入した．中和試験は，毒素液と等量の抗血清を混合し37°C，30分反応させた後，0.5 mlをマウスの腹腔内あるいは尾静脈内に注射することにより行った．

VI．総生菌数及び胞子数の測定

総生菌数の測定は以下の方法により行った．試料をPRAS希釈液（Na_2CO_3 0.24％，KH_2PO_4 0.045％，K_2HPO_4 0.045％，$(NH_4)_2SO_4$ 0.09％，NaCl 0.09％，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.045％，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.09％，塩酸システイン 0.045％，レザズリン 0.0001％を含む）で10倍段階希釈し，その0.1 mlを5 mlの，VL培地[6]（milieu a l'extrait de viande et de levures）にグルコースを添加したVLG培地を基礎として作製したPRAS変法VLG培地[4]に CO_2噴射下で植菌し，これを直ちにHungate[2]に従いroll tube法を用いて，CO_2存在下で中試験管内壁にフィルム状に拡げて固め，24時間培養した．培養後管壁に発育したコロニーを計算し，colony - forming unit（CFU）/mlで表した．胞子数の測定は，試料を75°C，15分間加熱した後，上述の方法に準じて行い，sporulation frequencyとして表した．

VII．顕微鏡下での胞子の観察

培養菌液を450×g，15分間遠心後，沈渣に対しWirtzの胞子染色[7]を行い顕微鏡下で観察した．

VIII．菌の発育及びpHの測定

菌の発育は，その濁度を島津ボシュロム・スペクトロニク・20光電比色計を用い OD_{560}にて測定した．培地のpHはZeromatic SS - 3メータ（東芝ベックマン）により測定した．

IX．菌体内の毒素検索

培養菌液を遠心集菌後，沈渣を0.05 Mリン酸緩衝液（pH 6.5）で2回遠心洗浄し，培養液と等量の同緩衝液に浮遊させた後，超音波細胞破砕機（UR - 200型，トミー精工）を用い，20キロサイクルで5分間処理することにより細胞を破壊した．超音波処理液を3,000×g，20分間遠心し，その上清液についてトリプシン処理を行った後に毒性を測定した．

成　　績

I．PRAS - TYG 培地における毒素産生及び毒素中和試験

先ず，グルコース濃度1.0％のPRAS - TYG 培地を用い，被験8株について毒素産生の有無を検討した．本培地で37°C，1週間培養した後，培養上清をトリプシンで活性化し，その0.25 mlをマウス尾静脈に注射し，致死毒性を検討した結果，被験 C_1毒素非産生C. botulinum C型菌8株中1株（85—14株）を除きマウスに

Table 1. Production of C_2-toxin in different media by *C. botulinum* type C strains producing no C_1-toxin

Strain	C_2-toxicity in the culture* supernatant of					
	PRAS-TYG medium** containing 0.2% glucose		PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose		Egg meat medium	
	Without trypsinization	With trypsinization	Without trypsinization	With trypsinization	Without trypsinization	With trypsinization
85−14	0***	0	0	0	0	0
85−18	8	64	32	64	0	32
86−16	16	32	64	64	0	64
86−18	4	32	16	128	0	64
86−19	8	32	0	32	0	64
92−13	32	32	16	64	0	64
98− 1	8	64	256	256	0	64
98− 2	8	16	64	64	0	64

*: Incubative period; 7 days
**: PRAS-TYG medium ; Pre-reduced anaerobically sterilized trypticase-yeast-glucose medium
***: MLD/ml

致死毒性を示した．この致死毒性に対し，C. botulinum 抗A，B，C_1，C_2，D，E型毒素血清，及びC. novyi 抗A，B型毒素血清を用いて中和試験を行ったが，この致死毒性は抗C_2毒素血清によってのみ特異的に中和され，これらのC_1毒素非産生C. botulinum C型菌8株中7株は，C. botulinum C_2毒素を産生することが判った．

II．C_2毒素産生条件

グルコース濃度1.0％のPRAS－TYG培地においてC_2毒素が産生されることが判ったので，次にグルコース濃度0.2％のPRAS－TYG培地，並びにEgg meat培地を併用して，C_2毒素産生条件を検討した．上記の3種の培地を用い，37°C，1週間培養後の培養上清について，トリプシン無処理及び処理後のC_2毒性を測定した．その結果，トリプシン処理を行った場合，Egg meat培地においてもかなり高いC_2毒性が認められたが，86－19株を除き，1.0％グルコースのPRAS－TYG培地において最も高いC_2毒性が認められた（表1）．0.2％グルコースのPRAS－TYG培地においてもC_2毒素産生が認められたが，1株（85—18株）を除き，その値は低かった．なお，85—14株は本実験においてもいずれの培地でもC_2毒性を示さなかった．トリプシン無処理の場合には，Egg meat培地においては全くC_2毒性は認められなかったが，PRAS－TYG培地ではグルコース濃度0.2％の場合にはC_2毒素産生株7株全株共に，また1.0％グルコースの場合には7株中6株がC_2毒性を示した．しかしながら、そのC_2毒性の値はトリプシン処理後の値に比べ低い場合が多く，グルコース濃度0.2％の場合には7株中6株，またグルコース濃度1.0％の場合は7株中4株がトリプシン処理後に比べ低いC_2毒性を示した．以上の結果，C_2毒素産生に関しグルコース濃度1.0％のPRAS－TYG培地は，0.2％グルコースの場合よりもあるいはまたEgg meat培地よりも，良好であることが判ったので，以後の実験においては1.0％グルコースのPRAS－TYG培地を用いることとした．

Table 2. Production of C_2-toxin in 24 hr culture in PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose

Strain	C_2-toxicity in 24 hr culture supernatant of PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose	
	Without trypsinization	With trypsinization
85−14	0*	0
85−18	0	64
86−16	0	8
86−18	4	128
86−19	0	32
92−13	0	64
98− 1	8	256
98− 2	0	64

* : MLD/ml

上記の実験中，1.0％グルコースのPRAS－TYG培

地における菌の発育は，培養24時間以内に最大値に達することが観察されたので，24時間培養液についてトリプシン無処理及び処理後のC_2毒性を検討した（表2）．培養24時間ではトリプシン無処理の場合，ほとんどの菌株において毒性を示さなかったが，トリプシン処理を行った場合，86—16株の1株を除き全株が1週間培養と同一の毒力を示した．86—16株については48時間培養で最大の毒力（1週間培養と同じ値）を示した．以上の結果，並びに表1に示した1.0％グルコースのPRAS—TYG培地における1週間培養液についてのC_2毒性の検討結果から，C_2毒素は先ず非活性の状態で培養液中に放出され，培養液中に含まれる何らかの酵素によって培養時間と共に活性化されることが判った．またC_2毒素の培地への放出には48時間の培養時間で充分であることも判明した．

III．胞子形成とC_2毒素産生

毒素産生条件を検討した上述の実験の際，グルコース濃度1.0％のPRAS - TYG培地を繰り返し作製してC_2毒性を検討したが，その毒性が作製した培地ロットにより異なる事実に遭遇した．この際，これらの遠心沈渣について胞子染色を行ったところ，高い毒素産生を示した培養液の染色標本には多数の胞子が認められたのに反し，毒素産生が低い場合には少数の胞子しか認められなかった．このことから，胞子形成がC_2毒素産生と密接に関係しているのではないかと思われた．例えば，表3は98—1株について行った6回の実験をまとめC_2毒性と胞子数との関係を調べたものである．即ち，98—1株を1.0％グルコースのPRAS—TYG培地で24時間あるいは48時間培養した培養液中のC_2毒性と胞子数との関係を調べた結果，6回の実験のうち4回は10^7/mlの胞子を認め，且つ256～512 MLD/mlのC_2毒性を示したが，他の2回においては少数の胞子を認めたに過ぎず，それに比例して毒性も低かった．表4には更に，被験8株全株について1.0％グルコースのPRAS - TYG培地で24時間あるいは48時間培養した培養液中のC_2毒性と胞子数との関係を，6～7回にわたって調べた成績を示した．その結果から，胞子数が10^4/ml以下の培養液中にはマウスに対する致死毒性は認められなかったが，10^5/ml以上のものについては確実にC_2毒性が認められ，且つ胞子数が増加するにつれてC_2毒性も増加し，胞子数とC_2毒性は密接に関係することが判った．先の実験でC_2毒素産生を認めなかった85—14株は，6回の実験のうち4回は胞子数が10^4/ml以下を示し，毒性も認めなかったが，2回の実験において2.6×10^6，3.2×10^6/mlの胞子形成を認め，同時におのおの16，8 MLD/mlの致死毒性を認めた．また，本毒素は抗C_2毒素血清によってのみ中和され，本菌株もC_2毒素産生株であることが判った．胞子形成はまた培養液のpHと関係しており，培養液のpHが6.0以上の時，胞子数は10^7/ml以上の値を示す場合が多かった．また，48時間培養から得られた菌体細胞の超音波処理抽出液中には，全株についてC_2毒性を認めることが出来なかった．

Table 3. Sporulation frequency and C_2-toxicity of strain 98-1

Case	Bacterial growth (OD_{560})	Viable counts after heating at 75°C for 15 min (CFU*/ml)	Toxicity** (MLD/ml)
1	1.46	2.0×10^5	4
2	1.40	3.0×10^5	8
3	1.32	1.0×10^7	256
4	1.32	3.4×10^7	512
5	1.31	4.0×10^7	512
6	1.36	5.7×10^7	512

*: Colony-forming unit
**: Trypsin-activated

Table 4. Sporulation frequency and C_2-toxicity of *C. botulinum* type C strains producing no C_1-toxin

Sporulation frequency (level/ml)	No. of cases	Toxicity* (MLD/ml)									
		0	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Less than 10^4	4	4**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^5	11	0	2	3	4	1	1	0	0	0	0
10^6	20	0	0	6	2	8	4	0	0	0	0
10^7	15	0	0	0	0	0	0	4	2	7	2
10^8	1	0	0	0	0		0	0	0	0	1

*: Trypsin-activated
**: Number of cases showing each level of toxicity

Table 5. Sporulation and C_2-toxin production by type C strain 98−1

Incubation period (hr)	Bacterial growth (OD_{560})	pH	Viable counts after heating 75°C for 15 min (CFU*/ml)	Toxicity** (MLD/ml)	
				Intracellular	Extracellular
0	0.08	6.70	1.3×10^4	0	0
4	0.16	6.50	1.0×10^4	0	0
6	0.70	6.30	5.9×10^3	0	0
8	1.52	5.85	5.7×10^3	0	0
10	1.55	5.90	8.4×10^3	0	0
12	1.54	6.20	8.3×10^3	0	0
14	1.50	6.20	3.2×10^6	128	4
16	1.50	6.00	7.7×10^6	128	256
18	1.40	6.06	1.4×10^7	128	512
20	1.40	6.10	3.4×10^7	64	512
22	1.40	6.05	3.6×10^7	64	512
24	1.40	6.03	3.0×10^7	64	512
48	1.36	6.20	5.7×10^7	0	512
168	1.16	6.20	4.3×10^7	0	512

*: Colony-forming unit
**: Trypsin-activated

次いで，C_2毒素が胞子形成と関連し増殖のいかなる時期に産生されるのかを検討するため，毒素産生が被験菌株の中で最も高い98−1株を用い，培養時間，菌の発育，胞子形成，及びC_2毒素産生の関係について検討した（表5）．肝片加肝ブイヨンで16時間前培養した菌液0.2 mlを，20本のグルコース濃度1.0％のPRAS-TYG培地（8 ml）に植菌し37°Cで培養を行った．菌の増殖はOD_{560}にて測定し，最高値に達するまでは1時間毎，以後24時間目までは2時間毎，1週間目までは1日毎に測定した．またC_2毒素に関しては，培養24時間目まで2時間毎に，以後1週間目まで1日毎に1本の培地を抜き取り毒性を測定し，同時にpH，総生菌数，胞子数を測定した．OD_{560}は培養3時間目から増加を認め，10時間で最高値に達し，以後1週間の間ゆるやかな減少を示した．胞子数は培養12時間目までは10^3〜10^4/mlの値を示したに過ぎず，顕微鏡的には胞子を認めることは出来なかった．この時(12時間目)まではC_2毒性も認められなかった．培養14時間目の培養液において，胞子数が3.2×10^6/mlとなり，顕微鏡的にも胞子を認めることが出来たが，95％以上の胞子はsporangiaの中に存在した(図1)．この時期において，C_2毒性は菌体内及び培養液中に共に認められたが，培養上清におけるC_2毒性はわずか4 MLD/mlに過ぎず，菌体内に128 MLD/mlと高い毒性が認められた．16時間培養では，胞子数は14時間培養時の約2倍に増加し，顕微鏡的にはfree sporeが増加し全胞子数の約17％を占めるに致った．この時期においては，培養上清中のC_2毒性は急激に増加した(256 MLD/ml)．18時間培養においては，胞子数は更に約2倍になり，free sporeも増加して全体の50％以上を示した．この時期に培養上清中のC_2毒性は最大値の512 MLD/mlに達した．20時間以後の培養においては，胞子数はほぼ一定であったが，時間の経過と共にfree sporeの割合は増加し，48時間培養で90％以上（図2），1週間培養ではfree sporeのみとなった．C_2毒性に関しては，20時間以後培養上清中の毒性は最大値(512 MLD/ml)を示し一定であったが，菌体内の毒性は14時間で最大値（128 MLD/ml）に達した後は20時間目から減少し，48時間培養以後には認めることが出来なかった．以上の結果，C_2毒素は先ず胞子形成初期に産生され菌体内に蓄積し，その後数時間以内に，free sporeの増加に伴い，培養液中に放出されることが示唆された．なお，上述の実験は3回繰り返したが，ほぼ同様の成績を示した．

考　　察

先に著者によってC. botulinum C型菌の無毒株として同定された8株は，全株共にグルコース濃度1.0％

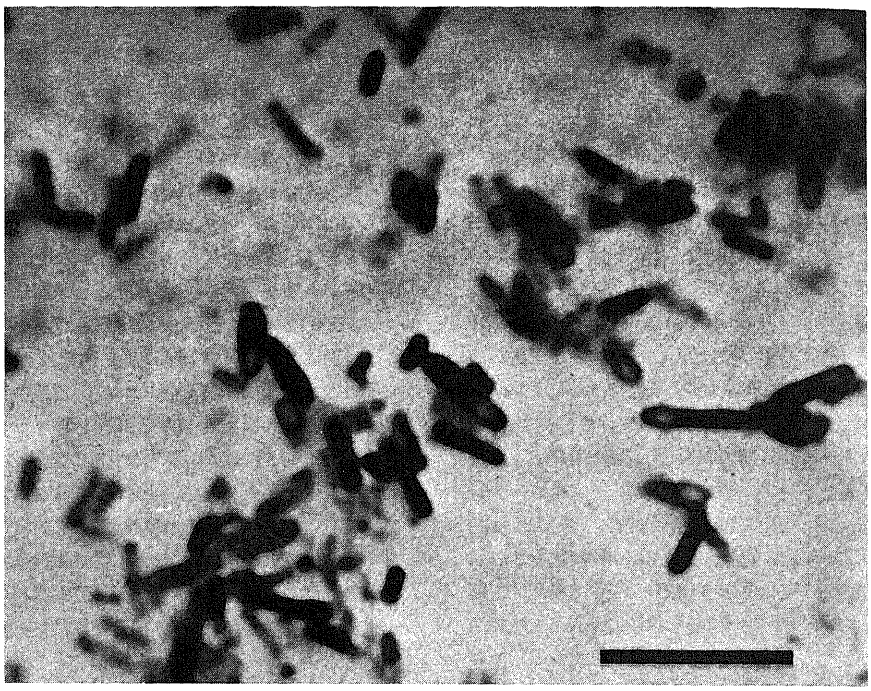

Fig. 1. *C. botulinum* type C strain 98–1; 14-hr culture in PRAS-TYG medium. ×1,000 (bar, 10 μm).

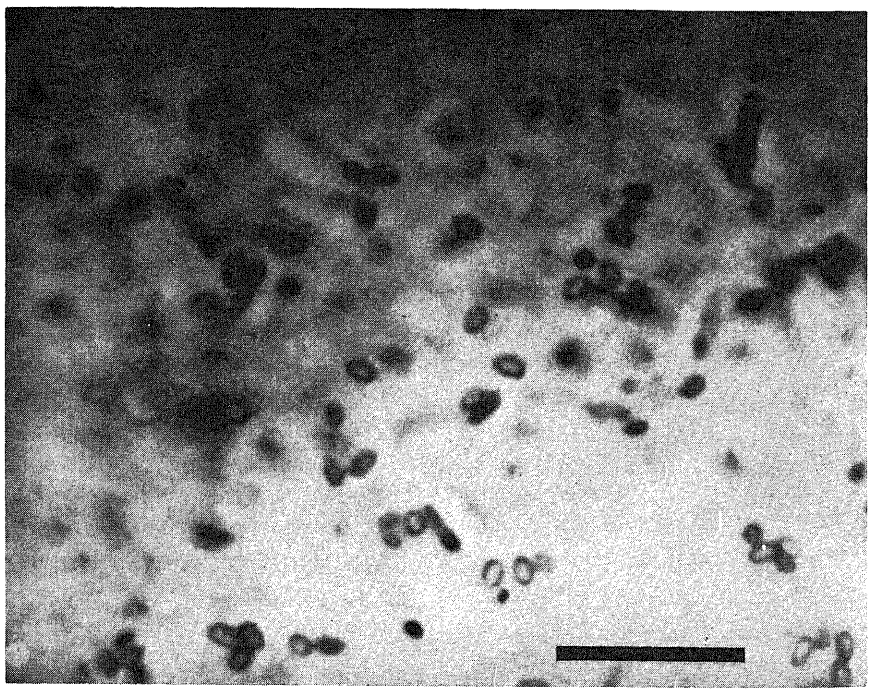

Fig. 2. *C. botulinum* type C strain 98–1; 48-hr culture in PRAS-TYG medium. ×1,000 (bar, 10 μm).

のPRAS - TYG 培地における培養上清をトリプシン処理することにより，C_2毒素を産生することが明らかとなった．C. botulinum Cα 型は C_1，C_2毒素を，Cβ 型はC_2毒素のみを産生するという Jansen の記載[8]によれば，これらの菌株は，C. botulinum Cβ 型ということになる．

C_2毒素産生に関して Eklund ら[3]はグルコース濃度を1.0％にすると，C_2毒素産生は抑制されると報告した．しかるに本研究においては，グルコース濃度 1.0％の方がC_2毒素産生が促進されたが，これは Eklund らが使用した TYG 培地に緩衝系が含まれておらず，そのためグルコース濃度を 1.0％にした場合，発育は良好になるが培地 pH が著しく下り，その結果胞子形成は敏感に pH の影響をうけて抑制され，胞子形成と密接な関係を持つC_2毒素産生が低下するものと考えられる．この点，著者の使用した PRAS - TYG 培地は緩衝系が含まれるため pH が低下しにくく，且つまた発育も良好であったので，C_2毒素産生用培地として適していると思われる．

C_2毒素は，胞子形成期に菌体内に産生され free spore の増加に伴い非活性の状態で培養液中に放出された後，培養液中の何らかの酵素によって活性化されるものと考えられる．このように，毒素産生と胞子形成が密接に関係しているものとしては，C. histolyticum の毒素原性と胞子形成との関係があり，胞子形成が良好な菌株は強毒株であり、胞子形成が不良な菌株は弱毒株であると報告[9)10)]されている．また C. perfringens のエンテロトキシン産生は，胞子形成と密接に関係しており，更にこの毒素は spore coat 蛋白成分であると報告[11)]されている．C_2毒素もまた胞子形成期にのみ産生されるものであるが，この毒素が胞子成分であるか否かは今後の研究課題である．

結　　論

河北潟の土壌から分離した C_1毒素非産生 C. botulinum C型菌8株について，グルコース濃度 1.0％の PRAS - TYG 培地を用い，C_2毒素産生の検討を行った．その結果，培養上清のトリプシン処理により，8株全株に毒素が認められ，この毒素は抗C_2毒素血清によってのみ特異的に中和されたことから，これらの菌株は C. botulinum C_2毒素を産生することが判った．C_2毒素産生には PRAS - TYG 培地が適しており，グルコース濃度は 0.2％よりもむしろ 1.0％の方が良好であった．また，C_2毒素産生は胞子形成と密接な関係があることが判った．即ち，胞子数が多ければ多い程毒性が高く，マウスに対する致死毒性を示すには，培養液中に 10^5/ml 以上の胞子数を認めることが必要であった．また，この毒素は対数増殖期に産生されず，胞子形成と同時に産生された．

謝　　辞

稿を終るに臨み，終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を載いた西田尚紀教授に心から御礼申し上げます．また実験の遂行にあたり終始直接御指導御助言を載いた微生物学教室中村信一助教授はじめ多大な御協力を載いた微生物学教室員各位並びに石川県衛生公害研究所微生物部木村晋亮部長に深く感謝の意を表します．また、C. botulinum 抗 C_1，C_2毒素血清の分与を受けた大阪府立大学農学部阪口玄二博士，抗 A，B，D，E 型毒素血清の分与を受けた千葉県血清研究所近藤久博士に謝意を表します．

文　　献

1) 芹川俊彦：石川県湖沼地帯における *Clostridium botulinum* C型の分布．十全医会誌，**86**，245 - 255 (1977).

2) **Hungate, R. E.** : The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev., **14**, 1 - 49 (1950).

3) **Eklund, M. W. & Poysky, F. T.** : Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. Appl. Microbiol., **24**, 108 - 113 (1972),

4) 東量三：ガス噴射法一新しい嫌気性菌培養法．メディア・サークル，**11**, 169 - 183 (1966).

5) **Segner, W. P., Schmidt, C. F. & Boltz, J. K.** : Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. Appl. Microbiol., **22**, 1017 - 1024 (1971).

6) **Buttiaux, R., Beerens, H. & Tacquet, A.** : Manuel de techniques bactériologiques, 2d ed., p 436, Éditions Médicales Flammarion, Paris, 1966.

7) **Wirtz, K.** : Eine einfache Art der Sporenfärbung, Zentbl. Bakt. Parasitkde, I Abt. Orig., **46**, 727 - 728 (1908).

8) **Jansen, B. C.** : The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. Onderstepoort J. Vet. Res., **38**, 93 - 98 (1971).

9) 今泉昌明・西田尚紀：*Cl. histolyticum* の毒素原性と胞子形成能．医学と生物学，**70**, 1 - 5 (1965).

10) **Sebald, M. & Schaeffer, P.** : Toxinogenèse et sporulation chez *Clostridium histolyticum*. C. R. Acad. Sc., **260**, 5398 - 5400 (1965).

11) **Frieben, W. R. & Duncan, C. L.** : Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. Eur. J. Biochem., **39**, 393 - 401 (1973).

C_2-Toxin Production by *Clostridium Botulinum* Type C Having No C_1-Toxigenicity and the Relation of C_2-Toxigenesis with Sporulation Frequency

Toshihiko Serikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 687–694 (1982)

Key words: *Clostridium botulinum* type C, Sporulation, Toxin production, *Clostridium botulinum* C_2- toxin.

Abstract

Clostridium botulinum type C strains with no C_1-toxigenicity were reexamined for C_2-toxigenicity and all the 8 strains tested were found to be C_2-toxigenic. Pre-reduced anaerobically sterilized trypticase-yeast-glucose medium (PRAS-TYG) containing 1% glucose was used for the production of C_2-toxin, because the toxin was yielded at higher levels by *C. botulinum* type C cultured in this medium than those in two other media tested, PRAS-TYG containing 0.2% glucose and egg meat medium. The culture fluid was trypsinized to activate C_2-toxin. The present study on toxin production revealed that C_2-toxin was activated by some enzyme(s) in the culture medium after the toxin was issued out of cells. The production of C_2-toxin appeared to be closely related with sporulation frequency of *C. botulinum* type C: the higher the sporulation frequency, the higher the yield of C_2-toxin was. The toxin was not produced during the log-phase, but it was produced during the sporulating period and then excreted into the medium as spore maturation proceeded. The toxin was not produced when the sporulation frequency was less than 10^4/ml.