

石川県湖沼地帯におけるClostridium botulinum C型の分布

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8662

石川県湖沼地帯における Clostridium botulinum C 型の分布

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52年2月9日受付)

水鳥の Clostridium botulinum C 型菌による中毒について数多くの報告がなされている^{1)~3)}。1973年夏から秋にかけ、東京都、茨城県、千葉県などでカモを主とする多数の野鳥の変死がみられ、その原因は C. botulinum C 型毒素であることが証明された^{4)~6)}。

同じ頃、石川県河北潟においてもカモの変死がみられたので、著者はその原因究明を目的とし主として河北潟周辺の岸辺および石川県内の他の4つの潟について C. botulinum の分布状況を調べると共に、河北潟における C. botulinum C 型菌分布の季節的変動、およびフナの本菌による汚染状況などの疫学的研究を行った。

本研究におけるもう1つの目的は、上述の調査中土壌から菌分離を試みた際、C. botulinum C 型菌と共に分離された本菌と全く同じ培養性状、生化学性状をもつ多くの無毒株を同定するということである。元来 Clostridia の有毒 species では最終決定は毒素によって行われている関係上、有毒 species の無毒株と思われる株は "unidentified" とした方が良くとさえされている⁷⁾⁸⁾。既に、Yamagishi ら⁹⁾は C. perfringens C 型菌の同定の際、凝集反応が無毒株の同定に際し有効であると報告しているので、著者は C. botulinum C 型菌の無毒株の同定にも凝集反応が利用出来るのではないかと考え検討した。また C. botulinum C 型菌と同時に分離した菌の中で、培養性状および生化学性状が本菌に似た多くの類似菌について同定を行ったが、このうち毒素学的に C. novyi A 型菌と同定したものの中に、従来の A 型菌と異なる性状を示したものが存在したので、これについても併せ検討した。

実験材料および実験方法

I. 使用培地

C. botulinum C 型菌の分離培養のため、VL 培地¹⁰⁾を改良した東の変法 VL-G 培地¹¹⁾を用いた(表1)。この変法 VL-G 培地はガス噴射装置¹¹⁾を用い、CO₂存在下で試験管(16×160mm)に5ml宛分注し、ブチルゴム栓をして115°C、15分間高压滅菌した。被検材料の希釈には、東の方法¹¹⁾に従って作製した希釈液(塩類溶液 I、7.5ml; 塩類溶液 II、7.5ml; レザズ

表1 変法 VL-G 培地の組成

塩類溶液* I	7.5ml	} A**
II	7.5ml	
レザズリン (0.1%液)	0.1ml	
トリプティケース (BBL)	0.1g	
酵母エキス (Difco)	0.5g	
肉エキス (Difco)	0.2g	
寒天	1.5g	
グルコース	0.2g	
蒸留水	81.5ml	
Na ₂ CO ₃ (8%液)	7.5ml	} B
塩酸システイン (3%液)	1.0ml	
pH 7.0		

* 塩類溶液

I: K ₂ HPO ₄	0.6%
II: K ₂ H ₂ PO ₄	0.6%
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2%
NaCl	1.2%
MgSO ₄	0.12%
CaCl ₂	0.12%

**A を加温溶解し、CO₂ を吹込みながら B を加え、レザズリンが脱色するまで CO₂ を通す。

Distribution of Clostridium botulinum type C in lake districts of Ishikawa Prefecture. Toshihiko Serikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

リン (0.1%液), 0.1ml; Na_2CO_3 (10%液), 3 ml; 塩酸シスチン (5%液), 1 ml; 蒸留水, 81ml) を用いた (塩類溶液 I, II については表 1 参照).

上記培地よりの純粋分離および分離菌株のレシチネース中和試験のために, Nagler の変法 VF 血液寒天培地¹²⁾, すなわち肉エキス (大五栄養化学) 1.0%, ポリペプトン (大五栄養化学) 1.0%, 寒天 1.5%, グルコース 1.0%, NaCl 0.5% (pH7.2) の割に加え 120°C, 15分間高圧滅菌後, 56°C に冷却し, ヒト保存血液および卵黄液 (卵黄と等量の滅菌生理食塩水を混合した液) をおのおの 10% になる様に加え, 滅菌シャーレ (直径 9 cm) に 20ml ずつ分注したものをを用いた.

C. botulinum C 型菌の毒素産生能を検討するために, 上述の変法 VL-G 培地から寒天を除去したものに, クックトミート培地 (栄研化学) を 1.0% (W/V) およびグルコースを最終濃度 0.5% になる様に追加したもの⁵⁾ を用いた (変法 VL 培地は既に 0.2% のグルコースを含む).

C. novyi の毒素産生用培地として, Nishida らの培地¹³⁾ および竹松の記載した TYG 培地¹⁴⁾ を用いた.

凝集反応用並びに免疫用抗原は, プロテオースペプトン (Difco) 3.0%, グルコース 1.0%, NaCl 0.5%, 塩酸シスチン 0.05% の割に含む抗原作製用培地 (pH7.2) を用いた.

II. 被検材料よりの *C. botulinum* 毒素の証明

土壌よりの *C. botulinum* 毒素の検索は小野ら¹⁵⁾ の方法によった. すなわち, 約 40~50g の被験土壌 (潟の水辺および水深約 1m の水底より約 100g 採取し, ビニール袋に入れ供試するまで 4°C に保存したもの) と 50ml のリン酸緩衝食塩水 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.4g; KH_2PO_4 , 0.7g; NaCl , 6.8g; 蒸留水, 1l; pH7.0) をよく混合し, 数分間静置した後上清を取り 3,000rpm, 30分間遠心した後, 沈渣にリン酸緩衝食塩水 1.5ml を加え再浮遊させ被検材料とした. その 1.0ml を 10ml のクックトミート培地 (栄研化学) に移植し, 60°C, 60分間加熱し急冷した後 30°C, 48時間培養した. 培養後 3,000rpm, 20分間遠心し, 上清 0.25ml を 2匹のマウスに腹腔内注射し 4日間観察を行い, 致死毒性の有無を判定した. 致死毒性のあるものについては *C. botulinum* A 型, B 型, C 型, E 型抗毒素血清による中和試験を行った. 中和試験は, *C. botulinum* A 型, B 型, E 型抗毒素血清の各々 6.7IU/ml を含む混合血清に上述の土壌培養上清を等量加え, 37°C, 30分間放置した後, マウスの腹

腔内に 0.5ml 接種しマウスの生死を観察した. 上述の抗毒素血清により中和されない場合, *C. botulinum* C 型抗毒素血清 (4IU/ml) で中和試験を行った. また, いずれの抗毒素血清によっても中和されない場合には, 土壌培養上清を 10 倍もしくは 100 倍希釈した後, 同様の操作で再検討した.

フナよりの *C. botulinum* 毒素の証明には, フナを 48 時間室温に放置した後腸管を取り出して細切り, 約 1g を 10ml のクックトミート培地 (栄研化学) に移植し, 60°C, 30分間加熱した後 30°C, 72時間培養した. その培養上清について上述の土壌の場合と同様の方法で毒素を検索した.

III. *C. botulinum* C 型菌の分離

毒性を認めた被検材料からの *C. botulinum* C 型菌の分離は, Hungate¹⁶⁾ の方法に従い, ガス噴射法にて変法 VL-G 培地を用い Roll tube 内培養を行った. すなわち, 被検材料を 80°C, 20分間加熱した後, ガス噴射装置下で前述した希釈液を用いて 10^{-1} ~ 10^{-3} に希釈し, それぞれの 0.1ml を 5ml 変法 VL-G 培地に接種し, CO_2 存在下で Roll tube を作り 37°C, 48時間培養した. 培養後, *C. botulinum* C 型菌らしい集落 (直径 1~3mm のひ薄で中心部不明瞭なもの) を釣菌し, Nagler の変法 VF 血液寒天培地上に塗抹して 37°C, 48時間培養後, 比較的大きなレシチネース環を示す集落を取り, 純粋分離を行い, 次の種々の検討により同定を行った.

IV. 分離菌株の培養性状

培養性状は, 肝片加肝ブイオンにおける発育並びに Nagler の変法 VF 血液寒天培地上での集落, レシチネース, 貞珠層などの様相を観察した. 胞子の形態は, Nakamura ら¹⁷⁾ の糖分解用基礎培地に 1.5% の寒天を加えた培地を, 前述した如くガス噴射法で作成し, 斜面培地として用い, 48時間培養後塗抹染色し顕鏡した.

V. レシチネース中和試験

C. novyi と思われる分離菌株のレシチネース中和試験は, Oakley ら¹⁸⁾ の方法に従って行った. すなわち Nagler の変法 VF 血液寒天培地の片側に *C. novyi* A 型あるいは B 型抗血清 2 滴を均一になる様に塗抹し, 肝片加肝ブイオンで 24時間培養した菌液を画線塗抹し, 37°C, 48時間培養後, レシチネース反応あるいは溶血反応が A 型あるいは B 型抗血清により抑制されるか否かにより, *C. novyi* の型別を行った.

VI. 分離菌株の産生毒素の検討

1. *C. botulinum* 毒素

C. botulinum 毒素の毒素型は、前述の如く *C. botulinum* A 型、B 型、C 型および E 型抗毒素血清による中和試験を行って決定した。毒素産生能の検討は、肝片加肝ブイオンで 37°C、24 時間前培養後、その 0.1ml を毒素産生用変法 VL 培地に接種し 30°C、5 日間培養した。培養後遠心し、上清を 0.2%ゼラチン加 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 10 倍段階希釈し、その 0.5ml ずつ 2 匹のマウスに腹腔内注射した後、4 日間生死を観察し MLD/ml を求めた。

C. botulinum A 型、B 型、E 型抗毒素血清は千葉県血清研究所より購入し、C 型抗毒素血清は大阪府立大学阪口玄二博士および千葉県血清研究所近藤久博士より分与を受けた。

2. *C. novyi* 毒素

C. novyi の毒素の中和試験は Nakamura ら¹⁹⁾の方法に従った。すなわち肝片加肝ブイオンで前培養した菌液 1.0ml を 10ml の Nishida らの培地¹³⁾および TYG 培地に接種し、37°C、24 時間培養後 3,000 rpm、15 分間遠心した上清を毒素液とした。この毒素原液または適当に希釈した毒素液と等量の *C. novyi* A 型および B 型抗血清を混合し、マウスの尾静脈へ 0.5 ml 注射し、48 時間後にその生死で毒素型を判定した。用いた *C. novyi* A 型抗血清は千葉県血清研究所近藤久博士より分与を受け、B 型抗血清は Wellcome Research Lab. (英国) より購入した。

VII. 生化学性状試験

分離菌株の糖分解性状は、変法 VL-G 培地から寒天とグルコースを除いた培地を基礎培地とし、各糖を 1% (サリシンの場合 0.5%) に加えた培地を用いた。この培地に肝片加肝ブイオンで 24 時間前培養した菌液を 0.1ml 加え、37°C で 3 日間培養後、Beckman Zerotomic SS-3 pH メータ (Beckman-東芝) で pH を測定した。

硝酸塩還元能、凝固卵白消化能、ゼラチン液化能の性状は Nakamura ら¹⁷⁾の方法、またインドール産生能は Smith ら²⁰⁾の記載に従った。

VIII. 凝集反応

1. 抗原の作製

肝片加肝ブイオンで 24 時間前培養した菌液 0.5ml ずつを、15ml の抗原作製用培地 6 本に移殖し 37°C、24 時間培養後 3,000 rpm、20 分間遠心し、0.15M NaCl で 1 回洗滌後、全体の沈渣を 10ml の 0.4%ホルマリン加 0.15M NaCl に浮遊させ抗原液とした²¹⁾。なお凝集反応用の抗原は洗滌しないものを用いた。

2. 抗菌血清の作製

上述の抗原液を家兎の耳静脈へ 3 日間隔で 7 回注射

した。注射量は 1 回目 0.5ml、2、3 回目 1.0ml、4、5 回目 2.0ml、6、7 回目 3.0ml とした。最終回より 7 日後に試験採血を行い、凝集価が 1.280 以上の時全採血を行った。

最初、土壌より分離した *C. botulinum* C 型菌の有毒株 8512 と無毒株 8514 の、両方の 0.4%ホルマリン処理抗原液を免疫に用いたが、前者で免疫している途中家兎が斃死し再度試みたが失敗した。そのため、本研究では *C. botulinum* C 型菌の無毒株と推定される 8514 株の抗菌血清のみを凝集反応に用いた。

3. 凝集価の測定

上述の抗菌血清を 0.15M NaCl にて 10 倍よりの倍数希釈法によって 5,120 倍まで希釈し、この希釈血清 1.0 ml に上述の如く作製した抗原を 1 滴加えよく攪拌した後、56°C、2 時間反応させ凝集塊を認めたものを凝集反応陽性として凝集価を求めた。

4. 凝集反応の対照菌株

作製した抗菌血清の特異性を検討するため、以下の *Clostridia* を対照の菌株として用いた。

1) 金沢大学医学部微生物学教室保存株

() 内は使用した菌株数を表わしている。*C. botulinum* A 型菌 (10)、B 型菌 (6)、C 型菌 (2)、D 型菌 (1)、E 型菌 (10)、F 型菌 (6)；*C. bifermentans* (1)；*C. sordellii* (4)；*C. novyi* A 型菌 (12)；*C. chauvoei* (1)；*C. sporogenes* (2)；*C. perfringens* A 型菌 (3)、B 型菌 (2)、C 型菌 (4)、D 型菌 (2)、E 型菌 (2)；*C. absoum* (2)；*C. tetani* (3)；*C. septicum* (2)；*C. butyricum* (2)；*C. acetobutyricum* (1)。

以上の菌株は既報の論文¹⁷⁾²²⁾に引用されているものである。

2) ATCC (American Type Culture Collection) 保存株

C. aminovalericum 13725；*C. botulinum* A 型菌 25763；*C. beijerinckii* 25752；*C. barkeri* 25849；*C. carnis* 25777；*C. cadaveris* 25783；*C. cochlearium* 17787；*C. difficile* 9689；*C. fallax* 25754；*C. ghoni* 25757；*C. glycolicum* 14880；*C. histolyticum* 25779；*C. indolis* 25771；*C. lituseburensis* 25759；*C. lentoputrescens* 17794；*C. malenominatum* 25776；*C. manganotii* 25761；*C. oceanicum* 25647；*C. pseudotetanicum* 25779；*C. putrificum* 25784；*C. perenne* 25782；*C. pasteurianum* 6013；*C. parapatrificum* 25780；*C. paraperfringens* 25753

; *C. plagarum* 25768 ; *C. propionicum* 25522 ; *C. rubrum* 14949 ; *C. sartagoformum* 25778 ; *C. subterminale* 25774 ; *C. sticklandii* 12662 ; *C. sporogenes* 25762 ; *C. sporosphenoides* 25781 ; *C. scatologenes* 25775 ; *C. sphenoides* 19403 ; *C. tertium* 14573 ; *C. tyrobutyricum* 25755.

IX. 吸収試験

20ml抗原作製用培地20本にそれぞれ肝片加肝ブイヨンで前培養した菌液1.0mlを接種し、37°C、13時間培養後3,000rpm、20分間遠心集菌し、0.15M NaClを加えて全量20mlにし20倍に濃縮した濃厚菌液を作り、この菌液約3~4mlに被験吸収血清の10倍希釈液10mlを混和後56°C、2時間反応させた。反応後3,000rpm、20分間遠心し、その上清に再び菌液を加えて同様の操作を行い合計3回の吸収操作をくり返した²³⁾。反応後3,000rpm、20分遠心しその上清液を吸収血清として使用した。なお吸収後の抗血清の希釈は1:20のものとした。

実験結果

1. *C. botulinum* C型菌の分布

1. 河北潟における分布

1974年7月31日および9月17日に河北潟周辺のA~Fの6地区の岸辺(図1)より土壌100検体を採取した。これらの土壌の被検材料を方法の項で示した様に加熱処理シুক্তミート培地で培養した後、培養上清について毒性を調べた結果、46検体(46%)の培養上清がマウスに対し致死毒性を示した(表2)。これらの斃死したマウスはすべて *C. botulinum* C型毒素による特有の症状(腹壁の陥没を伴う呼吸困難の症状)を示した。そこで培養上清の毒性物質は *C. botulinum* C型毒素ではないかと想定し、そのうち4検体の培養上清について中和試験を行ったところ、すべてが *C. botulinum* C型抗毒素血清によって中和されたが、*C. botulinum* A型、B型、E型抗毒素血清では中和されず、これらの毒性が *C. botulinum* C型毒素によるものであることが判った。しかし本研究の初期には *C. botulinum* C型抗毒素血清が不足していたので、致死毒性陽性のすべてに対しては中和試験を行えなかった。

上記の検索中、9月17日に採取したF地区の27検体は100%に致死毒性陽性であった。この時期は水鳥の数が増加する時にあたるので、場所の差よりむしろ時期の差に意義があるのではないかと考え、このF地区について1975年2月14日より1976年6月15日まで継続

して土壌を採取し毒性を調べ季節的変動をみた結果、果して次年度の秋期(10月)に再び高頻度に致死毒が証明された(表3)。これらのマウスも上述した *C. botulinum* C型毒素による特有の症状を示し死亡した。この検索の途中、その時々致死毒を示した検体から無作為に50検体を選び、その培養上清について *C. botulinum* 抗毒素血清で中和試験を実施したところ、50検体すべてがC型抗毒素血清でのみ中和され、他の抗毒素血清では中和されなかった。

以上の結果より、河北潟で採取した土壌325検体中153検体(47%)の培養液の致死毒は、そのほとんどすべてが *C. botulinum* C型毒素であると推定した。

2. 石川県内の他の潟における分布

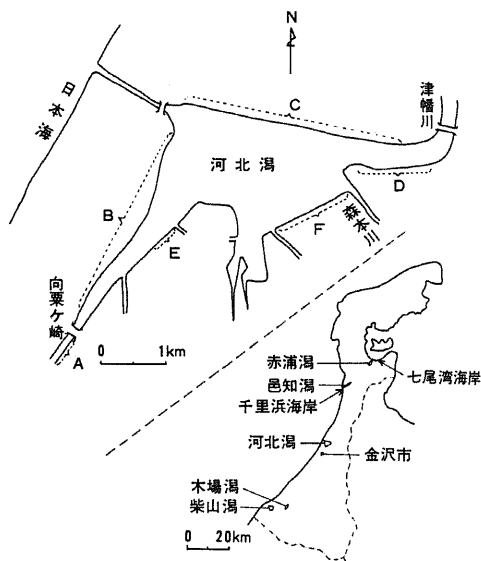


図1 土壌の採取場所

表2 河北潟における *C. botulinum* C型菌の分布

採地 取区	採取年月日	検体数	致死毒性陽性検 体数 (%)
A	1974年7月31日	3	2 (67)
B	"	22	9 (41)
C	"	25	5 (20)
D	"	14	2 (14)
E	"	9	1 (11)
F	1974年9月17日	27	27 (100)
計		100	46 (46)

表3 河北潟のF地区における季節的変動

採取年月日*	検体数	致死毒性陽性検体数(%)
1974年9月17日	27	27 (100)
1975年2月14日	20	1 (5)
4月15日	25	15 (60)
6月24日	20	8 (40)
8月1日	20	12 (60)
10月17日	20	20 (100)
12月11日	20	17 (85)
1976年1月28日	20	9 (45)
2月25日	20	8 (40)
3月29日	20	3 (15)
4月27日	20	9 (45)
6月15日	20	5 (25)
計	252	134 (53)

* F地区の約200mの区域から、5～10mの間隔で採取した。

表4 石川県内における *C. botulinum* C 型菌の分布

採取場所	採取年月日	検体数	致死毒性陽性検体数 (%)
柴山潟	1975年11月4日	40	26 (65)
木場潟	11月4日	20	11 (55)
邑知潟	11月12日	40	36 (90)
赤浦潟	11月21日	30	10 (33)
七尾湾海岸	11月21日	30	0 (0)
千里浜海岸	11月12日	60	0 (0)

河北潟は秋期に高頻度に *C. botulinum* C 型菌によって汚染している事実が判ったので、石川県内の他の4つの潟、すなわち柴山潟、木場潟、邑知潟、赤浦潟より1975年11月に土壌を採取して *C. botulinum* の分布状況を調査した(但し、河北潟8.2km²に対して柴山潟1.8km²、木場潟1.2km²、邑知潟0.8km²、赤浦潟0.3km²と小さく、またこの4潟の中で交通状況、人混みなどの関係から水鳥が多数生息しているのは実際には邑知潟のみである)。その結果、邑知潟より採取した土壌40検体中36検体(90%)の培養上清にマウスに対する致死毒性が認められた(表4)。この際、致死毒性陽性の土壌83検体から無作為に47検体を

選び、その培養上清について再び *C. botulinum* 抗毒素血清で中和試験を行った結果、47検体すべてがC型抗毒素血清で特異的に中和された。水鳥の飛来が確実に認められている邑知潟で他の潟より(図1) *C. botulinum* C型菌が高頻度に汚染していることが判った。これに反し、七尾湾海岸、千里浜海岸より採取した砂土、計90検体の培養上清には何ら毒性が認められなかった(表4)。

3. 河北潟のフナにおける分布



河北潟で1974年12月に捕獲した全長20cm大のフナ(*Carassius auratus*) 19匹について *C. botulinum* の汚染状況を調べたところ、2匹の腸管内容物の培養上清に致死毒性が認められ、更に *C. botulinum* 抗毒素血清で中和試験を行ったところ、C型抗毒素血清で特異的に中和された。この結果、河北潟に住む魚類もまた *C. botulinum* C型菌で汚染していることが判った。

II. *C. botulinum* C 型菌の分離

1. 分離菌株の培養性状

C. botulinum C 型菌の分離は、実験当初平板培地を用いて行ったが分離出来ず、通常の方法では困難であるということが判ったので、前もって還元された培地を用い、厳密な嫌気条件下で分離を行った。毒性試験で *C. botulinum* C 型毒素の認められた土壌の被検材料を、方法の項で示した如く、加熱処理後変法 VL-G 培地を用いて Roll tube 内培養を行い、発育した集落の中から *C. botulinum* C 型菌と思われる集落を釣菌し、Nagler の変法 VF 血液寒天培地上に塗抹し純粋分離を行った。その結果、*C. botulinum* C 型毒素を認めた土壌中19検体について検討したところ、12検体より *C. botulinum* C 型菌らしいと思われる33菌株を分離した。これらの菌株はすべて oval, subterminal の胞子を示したが、これらを肝片加肝ブイオンで48時間培養すると、ブイオン下部のみにしか発育しない22株と、上部まで充分発育する11株に区別出来、前者がかなりの strict anaerobe である事を予想させた。Nagler の変法 VF 血液寒天培地で培養すると、肝片加肝ブイオン下部にのみ発育を示す22株は、集落のまわりのレンチネース環辺が不明瞭であり、これに対し、肝片加肝ブイオンで上部まで生える11株は、環辺と培地の境界が明瞭であった。前者に属する22株を第I群とし、後者の11株を第II群とした。第II群は、レンチネース環の大きさの相違、真珠層の様相の相違および後述する生化学性状の違いにより、亜群すなわち第II群-a (3株)、第II群-b (8株)に分かれた(図2)。

図2 分離菌株の培養性状

性状	群	I (22株)		II	
				a (3株)	b (8株)
肝片加肝ブイヨン (37°C, 48時間)		下部にのみ発育		上部まで充分発育	
レシチネース反応* (斜線部)		 環辺不明瞭		 環辺明瞭	
真珠層*		集落上にみられ、レシチネース環上に及ばない		集落上およびレシチネース環上にみられる	集落上にみられ、レシチネース環上に及ばない
集落*		1 ~ 2 mm		3 ~ 4 mm	2 ~ 3 mm

* Nagler の変法 VF 血液寒天培地で37°C, 48時間培養した。

表5 分離菌株の中和試験

群	レシチネース中和試験*		毒素中和試験		同定
	C. botulinum C型抗毒素血清#	C. novyi A型抗血清	C. botulinum C型抗毒素血清	C. novyi A型抗血清	
I					
14株	- **	-	+	-	C. botulinum C型菌
8株	-	-			?
II					
a	-	+			C. novyi A型菌
b	-	+	-	+	C. novyi A型菌

* Oakley らおよび Nakamura らの方法によった。

** - : 中和出来ない。

+ : 中和出来る。

この C. botulinum C型抗毒素血清は精製トキソイドに対して作製され、抗レシチネースを持たない。

第II群-aの3株は、Nagler の変法 VF 血液寒天培地上で3~4 mmの集落の周囲に小さなレシチネース環を作り、集落上およびレシチネース環上に C. novyi A型菌に特徴的な真珠層を示した。また、このレシチネース反応は Oakley らの方法で中和試験を行ったところ、C. novyi A型抗血清で特異的に中和された(表5)。

第II群-bの8株は、2~3 mmの小さな集落の周囲に大きなレシチネース環を作り、真珠層は集落上のみ認められ、また Oakley らの方法でレシチネース中和試験を行ったところ、C. novyi A型抗血清でいくらか中和されたが不完全なままでとどまり、また C. novyi B型抗血清では中和出来なかった。し

かしながら、Nakamuraらの方法(この際、抗血清を大量に使い得る)に従って中和試験を行ったところ完全に C. novyi A型抗血清で中和された(すなわち、卵黄寒天平板培地の中央に直径5 mmの小孔をあけ、また10 mmの同心円上に数個の同様の小孔を作り、中央の小孔に C. novyi のA型あるいはB型抗血清を0.3 ml注入し、周辺部の小孔に TYG 培地37°C、24時間培養の菌液を0.3 ml注入した後37°C、48時間培養しレシチネース反応の抑制の有無を判定したところ、C. novyi A型抗血清で中和されることが判った)。しかし C. novyi A型菌のレシチネースとしては非定型的なものであった。

第I群に属する22株は、Nagler の変法 VF 血液

表6 分離菌株の生化学性状

性 状	第 I 群		第 II 群		C. botulinum C 型菌 (Stockholm 株)
	有 毒 株 (14*)	無 毒 株 (8)	a (3)	b (8)	
レシチネース反応	14**	8	3	8	+
真 珠 層	14	8	3	8	+
糖 分 解 性 状					
グルコース	14	8	3	8	+
マルトース	14	8	3	0	+
ラクトース	0	0	0	0	-
シュークロース	0	0	0	0	-
サリシン	0	0	0	0	-
フラクトース	14	8	3	0	+
ガラクトース	0	6	3	0	-
マンノース	10	7	3	0	+
メリピオース	9	6	3	0	-
イノシット	14	8	3	8	+
インドール産生	0	0	0	0	-
硝酸塩還元	0	0	0	0	-
凝固卵白消化	0	0	0	0	-
ゼラチン液化					
2%	14	8	0	8	+
10%	11	6	0	8	+

*使用菌株数 **陽性菌株数

寒天培地上で1~2mmの集落のまわりに境界の不明瞭な大きなレシチネース環を示し、このレシチネース反応は上記2つの方法のいずれを用いても C. novyi A型抗血清で中和されなかった。また真珠層がいくつかの小集落上のみ観察されたが、認められない集落も多数あった。しかしこの真珠層は、Nagler培地の乳糖に代えて1%イノシットを入れた培地ではすべての小集落上に認められたが、「第II群-aの3株にみられた C. novyi A型菌に特徴的なもの」とは明らかに異なり、むしろ第II群-bのものに似ていた。

2. 分離菌株の生化学性状

第I群に属する22株の生化学性状は、グルコース、マルトース、フラクトースおよびイノシットを分解、ゼラチンを液化するが、インドール産生能および硝酸塩還元能はなく、凝固卵白消化陰性で、この性状は C. botulinum C 型菌の標準株である Stockholm株とほとんど一致した(表6)。

第II群-aの3株は、Bergey's Manual 第8版の C. novyi A型菌に関する記載と比べ、ガラクトース、マンノースおよびメリピオースを分解する点、ま

たゼラチンを液化しないという点で異なり、C. novyi A型菌の変異型と考えた。

第II群-bに属する8株は、第I群、第II群-aに比べ糖分解性が弱く、グルコースおよびイノシット以外は分解しなかったが、ゼラチンを液化し、C. novyi A型菌に関する Bergey's Manual の記載とほぼ一致した。

3. 分離菌株の産生毒素の検討

第I群の22株の毒性試験を行った結果、14株に毒性が認められ8株が無毒だった。産生毒素の毒素型を C. botulinum 抗毒素血清での中和試験により検討した結果、いずれもC型抗毒素血清で特異的に中和された(表5)。如上の生化学性状の結果と合わせて、この14株を C. botulinum C 型菌と同定した。残りの無毒の8株は、培養性状および生化学性状より C. botulinum C 型菌の無毒株の可能性を考えたが、この決定は後述する凝集反応による手段に任すこととした。有毒株14株の毒素産生能を方法の項で述べた術式で検討した結果、2株が 10^6 MLD/ml、11株が 10^4 MLD/ml、1株が 10^3 MLD/mlの毒素産生能を示した。

表7 C. botulinum C型菌(8514株)の抗菌血清に対する凝集反応

菌 群	菌 株 数	凝 集 価	同 定
第 I 群			
有 毒 株	14	320-640	C. botulinum C型菌
無 毒 株	8	320-640	C. botulinum C型菌
第 II 群			
a	3	0	C. novyi A型菌(変異型)
b	8	0	C. novyi A型菌(変異型)
対 照 菌 群			
C. botulinum C型菌	2	1,280	
C. botulinum D型菌	1	1,280	
C. novyi A型菌	8	80-320	
	4	0	
他 の 45 菌 種	99	0	

第II群-bの8株についての毒性試験を方法の項で示した通り、すなわち TYG 培地で37°C、24時間培養した培養上清について検討した結果、8株中7株の培養上清に毒性が認められ、いずれも C. novyi A型抗血清で特異的に中和された(表5)。以上の毒素中和試験の結果、また上述した培養性状および生化学性状の検討により、第II群-bの8株を C. novyi A型菌と同定した(但し、そのレンチネース反応は従来の C. novyi A型菌のそれと著しく異なっていた。また、1株は C. novyi A型菌の無毒株と思われた)。

なお、第II群-aの3株(現行の方法で一応 C. novyi A型菌と判定したが、生化学性状はかなり異なり変異型と同定したものは TYG 培地および Nishida らの培地においても毒性を示さなかった。

III. 凝集反応

本研究中に分離した第I群に属する C. botulinum C型菌の無毒株ではないかと考えた8株の同定を行うため、この無毒株の中の1株である8514株の抗菌血清を用いて凝集反応を行った。凝集反応の値は、毒素型判定とどの程度一致するかということが問題であるから、先ず C. botulinum C型菌と同定したものと凝集反応を行うと、14株の同定株すべてが320~640の凝集価を示し、本菌の無毒株ではないかと考えた8株もまた同一の凝集価を示した(表7)。次に他の型あるいは他の菌種との凝集反応を検討したとこ

ろ、これに反して、C. botulinum A型菌、B型菌、E型菌およびF型菌の33株は凝集反応を示さず、またその他の Clostridia 44種、計66株についても凝集反応陰性であった。但し、対照として用いた C. botulinum C型菌の標準株2株(Stockholm株およびCB-3株; 東京都衛研分離株)の他に C. botulinum D型菌1株(1873株)が1,280の凝集価を示し、また C. novyi A型菌1株(140株)が320の凝集価を示した。しかし土壌より分離した第II群の C. novyi A型と同定した11株(いずれも従来の C. novyi A型菌と比べて非定型的である)は凝集反応を示さなかった。教室保存の C. novyi A型の定型的集落を示す11株を追加して検討してみたところ、7株が80~320の凝集価を示し、C. novyi A型菌ともかなり交差凝集を示すことが判った。

更に、凝集反応に用いた8514株の抗菌血清を C. novyi A型菌140株で吸収試験を行ったところ、凝集素は完全に吸収された。

以上の結果より、C. botulinum C型菌と推定される8514株の抗菌血清による凝集反応は、C. botulinum C型菌のみではないことは判ったが、近縁菌の C. botulinum D型菌および C. novyi A型菌を除いては起こらないことが判った。これらの凝集反応の特異性の検討結果、また前述した培養性状および生化学性状の成績より、第I群の8株の無毒株を C. botulinum C型菌と同定した。

考 察

本邦における *C. botulinum* C 型中毒の最初の報告は、1961年に北海道で発生したミンクの中毒²⁴⁾であるが、最近野鳥の *C. botulinum* 中毒についての報告がなされた。1973年9月東京都の中川流域に生息するカモなどの野鳥が多数変死した事件について、小野ら²⁵⁾および坂井ら⁶⁾が調査した結果、*C. botulinum* C 型中毒であることが判明した。この事例と同じ頃、茨城県や千葉県沼でもカモの大量死がみられ、その原因が福田ら⁴⁾や坂口²⁵⁾によってこれらもまた *C. botulinum* C 型中毒であることが明らかにされた。

同じ頃、河北潟においてもカモを主とする野鳥の変死がみられたという情報を得たが、著者が調査した11月中旬には既に時遅く、カモの死体がみられず、その実態をつかむことが出来なかった。しかし翌年より始めた本研究により、河北潟周辺の土壌は *C. botulinum* C 型菌で汚染していることが判り、河北潟におけるカモの変死もまた *C. botulinum* C 型菌によるものであることが推定された。また、河北潟に住むフナの腸管内容物中に *C. botulinum* C 型毒素が証明されたことから、潟の魚介類も広く汚染されていると思われる。

Smith²⁾は、*C. botulinum* C 型菌は昆虫、鳥類および動物の真正寄生菌であり、水鳥の生息する場所以外の土壌には認められないと述べている。著者が調査した河北潟には1976年1月の調査で、カルガモ (*Polionetta*)、コガモ (*Nettion*)、オナガモ (*Dafilia*) など2万羽以上の野鳥が生息しており、カルガモなどの永住するものを除きこれらの大部分は渡鳥として毎年9月中旬に飛来し、翌年の3月下旬まで生息する。ところで、著者が土壌の毒素原性について季節的変動を調査したところ、渡鳥の飛来する秋期に非常に高頻度に *C. botulinum* C 型毒素が認められ、渡鳥が *C. botulinum* C 型菌の分布に重要な役割を果たしていると考えられる。また石川県内の他の4つの潟について秋期に検索したところ、多数の水鳥が飛来する邑知潟に高頻度に *C. botulinum* C 型毒素が認められた。またいずれの潟も *C. botulinum* C 型菌で汚染しており、条件がそろえば秋期に野鳥の *C. botulinum* 中毒が再発生する危険性が考えられる。

C. botulinum C 型菌は通常の培地では非常に生育が悪く、実験の当初平板培地を用いて分離を試みたが失敗したので、“prereduced”で作った東の変法 V L-G 培地¹¹⁾を用いて Hungate 法¹⁶⁾により film

culture によった。しかし本培地でも培地上を遊走する *Clostridia* のため分離が困難で、更に分離方法を検討する必要があると思われた。

著者が河北潟の土壌より *C. botulinum* C 型菌らしいと思ひ分離した33菌株中、現行の Oakley らの方法¹⁸⁾に従って *C. novyi* A 型菌として判定した第II群-a 3株は、定型的真珠層を示したが、最も鋭敏なゼラチン判定法を用いても陰性である点、また生化学性状が古典的A型菌よりはるかに saccharolytic である点など、かなり異なるものであった。また毒素学的に *C. novyi* A 型菌とした第II群-b の8株は、生化学性状はほぼ一致し、またそのレシチネース反応も *C. novyi* A 型抗血清によって中和されたが、その毒素抗毒素間の中和は、古典的な *C. novyi* A 型菌の毒素とかなり異なり、中和するのに要する抗血清量は保存株に比べ数百倍量であることが現在判ったので、更に分類学的検討を要する(またこの *C. novyi* A 型菌のレシチネース反応は、古典的 *C. novyi* A 型菌のそれと著しく異なる)。

有毒 *Clostridia* の無毒株の同定は、むしろ「同定しない方がよい」とされる程に慎重を要する¹⁹⁾。Hayra¹⁾は *C. botulinum* C 型菌の蛍光色素標識抗体 (Wellcome Research Lab. 英国) を用いて、本菌の無毒株と推定される菌株を分離、同定している。そこで著者は土壌より分離した *C. botulinum* C 型菌の無毒株解明のため、特に沢山の菌種と株を用い、凝集反応の特異性について検討した結果、*C. botulinum* C 型菌並びにその類似菌、*C. botulinum* D 型菌の他に *C. novyi* A 型菌の中で凝集するものがあることが判った。但し、*C. novyi* は生化学的に容易に *C. botulinum* C 型菌と区別しうるので、凝集反応は実際的な分離、同定に極めて有意義な方法であると判った (*C. botulinum* D 型菌の可能性については、土壌より全くD型毒素が証明出来なかったことより一応否定出来る)。 *C. botulinum* C 型菌とD型菌は培養性状、生化学性状が同一であり、また両種間でフェージ変換により毒素原性の転換が出来ること²⁶⁾²⁷⁾から、両種は相当に近縁の種であることが考えられるが、著者の凝集反応の結果でもそのことが確認された。一方、*C. novyi* A 型菌の一部が凝集反応陽性であり、また吸収試験の結果からも、*C. botulinum* C 型菌と *C. novyi* A 型菌の一部は共通抗原を持つことが判ったが、このことは Eklundら²⁸⁾の *C. botulinum* C 型菌を特異的なフェージにより *C. novyi* A 型菌または *C. botulinum* D 型菌に転換出来るとする報告から考えて、この3種

菌群は分類学的に近縁関係にあると考えられ、更に将来この面から検討されるべきものと思われる。

結 論

河北潟周辺より採取した土壌325検体中153検体(47%)にマウスに対する致死毒素原性が認められ、この毒素は *C. botulinum* C型に特有の症状を示した。毒素中和試験を行った結果、*C. botulinum* C型抗毒素血清で特異的に中和され、これらの致死毒が *C. botulinum* C型毒素であることが判った。更に河北潟の一定地区の土壌材料について、その毒素原性について季節の変動を調べ、秋期に高頻度に毒素が証明されることが判った。この致死毒素原性を示す土壌より *C. botulinum* C型菌の分離を試み、*C. botulinum* C型様の33菌株を分離した。諸種性状および毒素学的検討の結果、14株を *C. botulinum* C型菌、11株を *C. novyi* A型菌(但し、いずれも未知の変異型)と同定した。残りの *C. botulinum* C型菌と培養性状並びに生化学性状の一致する無毒株8株の同定のため、*C. botulinum* C型菌の凝集反応の特異性について検討し、この凝集反応が用いられることが判り、無毒の8株を *C. botulinum* C型菌と判定した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を戴いた西田尚紀教授に心から御礼申し上げます。また本研究の機会を与えて下さった石川県衛生公害研究所三根晴雄所長に深く感謝の意を表します。実験の遂行にあたり御協力御教示を賜った微生物学教室中村信一助教授はじめ教室員各位並びに衛生公害研究所微生物部木村晋亮部長、山田那代技師(現小松保健所)に深謝致します。また *C. botulinum* C型抗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、千葉県血清研究所近藤久博士、菌株の分与を受けた東京都立衛研坂井千三博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Hay, C. M. E., van der Mada, H. N., & Knoetze, P. C. : J. S. Afr. Vet. Ass., 44, 53 (1973).
- 2) Mortojudo, J. W., Siagian, E. G., Suhadi, F., Ward, B. Q., & Ward, W. M. S. : J. appl. Bact., 36, 437 (1973).
- 3) Smith, L. DS. : The pathogenic anaerobic bacteria, 2nd ed., p.203, Illinois, U.S.A., Charles C. Thomas., 1975.
- 4) 福田芳生・佐々木熙夫・七山悠三・福島悦子・本田久義 : 日本食品衛生学会第27回学術講演要旨, 21 (1974).
- 5) 小野武男・石橋幸子・東 量三 : 日細誌, 29, 161 (1974).
- 6) 坂井千三・伊藤 武・岡沢久美子・善養寺浩・辺野喜正夫 : 東京都衛研年報, 26, 14 (1975).
- 7) Smith, L. DS. : Introduction to the Pathogenic Anaerobes, 1st ed., p. 22, Chicago, University of Chicago press, 1955.
- 8) Oakley, C. L. : In Microbial classification. Edited by P. H. A. Sneath, p.242, London, The Cambridge University Press, 1962.
- 9) Yamagishi, T., Yoshizawa, J., Kawai, M., Seo, N., & Nishida, S. : Appl. Microbiol., 21, 787 (1971).
- 10) Buttiaux, R., Beerens, H., & Tacquet, A. : Manuel de techniques bactériologiques, 2nd ed., p.436, Paris, Editions medicale flammation, 1966.
- 11) 東 量三 : メディア・サークル, 11, 169 (1966).
- 12) Nagler, F. P. O. : Nature, 153, 496 (1944).
- 13) Nishida, S., & Nakagawara, G. : J. Bact., 88, 1636 (1964).
- 14) 竹松啓一 : 十全医会誌, 83, 775 (1974).
- 15) 小野悌二・唐島田隆・亀山邦男・佐藤 彰・神沢謙三・飯田広夫 : 北海道衛研所報, 17, 1 (1967).
- 16) Hungate, R. E. : Bacteriol. Rev., 14, 1 (1950).
- 17) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayase, M., & Nishida, S. : Internat. J. Syst. Bact., 23, 419 (1973).
- 18) Oakley, C. L., Warrack, G. H., & Clarke, P. H. : J. Gen. Microbiol., 1, 91, (1947).
- 19) Nakamura, S., Takematsu, K., & Nishida, S. : J. Med. Microbiol., 8, 289 (1974).
- 20) Smith, L. DS., & Holdeman, L. V. : The pathogenic anaerobic bacteria, 1st ed., p.325, Illinois, U.S.A., Charles C. Thomas., 1968.
- 21) Mandia, J. W. : J. Infect. Dis., 97, 66 (1955).
- 22) Kiritani, K., Mitsui, N., Nakamura, S., & Nishida, S. : Jap. J. Microbiol., 17, 361 (1973).
- 23) Huang, C. T., Tamai, K., & Nishida, S. : J. Bacteriol., 90, 391 (1969).
- 24) 唐島田隆・小野悌二・飯田広夫・安藤芳明・阪口玄二・阪口澄子・籠田勝基 : 北海道衛研所報, 15, 17 (1965).

- 25) 阪口玄二 : 食品衛生研究, 24, 17 (1974). 14, 87 (1970).
26) Eklund, M. W., Poysky, F. T., & Smith, C. A. : Science, 172, 480 (1971). 28) Eklund, M. W., Poysky, F. T., Meyers, J. A., & Pelroy, G. A. : Science, 186, 456 (1974).
27) Inoue, K., & Iida, H. : Jap. J. Microbiol.,

A b s t r a c t

One hundred and fifty-three (47%) of 325 soil samples that were collected from the shore areas of Lake Kahoku gave rise to lethal toxicity in mice with "wasp-waist" symptom characteristic of *C. botulinum* type C toxicity. The toxic cultures of these soil samples were only neutralized by *C. botulinum* type C antitoxic serum. Further seasonal study throughout the year at a given shore area of Lake Kahoku disclosed that nearly all samples, when cultured, gave rise to toxicity during the autumn. Thirty-three strains that were suspected to be *C. botulinum* type C were isolated from soil samples that had exhibited toxicity. Based on the findings of cultural, biochemical and toxigenic properties, the 14 toxigenic strains were identified as *C. botulinum* type C and 11 strains as *C. novyi* type A. To identify the remaining 8 strains that exhibited all the cultural and biochemical properties of *C. botulinum* type C except the non-toxigenicity, an extensive study to demonstrate the applicability of agglutination method were performed. Consequently, the validity to use the agglutination method was confirmed and the 8 strains were identified as nontoxigenic *C. botulinum* type C.
