

Clostridium botulinum の毒素原性

1. Cl. botulinum type B 菌の nontoxicogenic substrains の解離

金沢大学医学部微生物学教室(主任 西田尚紀教授)

河合 康 守

(昭和41年3月8日受付)

Clostridium botulinum が nontoxicogenic substrain を生じやすいことに関しては既によく知られている。Smith¹⁾ はその著書の中で「colony につきその substrains について toxigenic と nontoxicogenic strain の関係を検索しようとしてもその努力はむしろ exasperating である」と記述している位であり、Dolman²⁾ も Cl. botulinum の toxigenesis を知る手懸りのないことを認めている。しかし Dolman³⁾ は Cl. botulinum type E. が、brain heart infusion agar での培養集落の特徴を指標として、TOX phase (縞模様集落を形成し、毒素を産生する)、TP phase (平滑で透明な集落を形成し、proteolytic ではあるが毒素産生能がない)、及び OS phase (opaque な集落を形成し、microscopic には主として spore から成り、毒素産生能がない) に分類し、これによつて毒性、生物性状が律されていることを述べて以来、我が国でもこの追試⁴⁾⁵⁾ が行なわれ、確認されるに至っている。これらの現象は私の同僚⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ の clostridia の各株について各 species の toxigenesis や生物性状が孢子形成能によつて強く影響を受けていることと関連するよう思えたので、私は Cl. botulinum の toxigenesis を支配する因子を求め、先ず本報では type B (NIH 株)の子孫株についてその toxigenesis を検討した結果について述べる。

実験方法

1. 使用菌株: 国立予防衛生研究所坂口玄二博士より供与され、当教室において肝、肝ブイオンで継代保存された、Clostridium botulinum type B (NIH) 株

2. 毒素産生試験

i) 培地 brain heart infusion broth (Nissan) を使用した。これを 10 ml ずつ中試験管に入れたが、本培地には既に 0.2% に glucose を含有しているので更に最終濃度が 1% になるように菌を植える直前に glucose を加え aerobic のまま使用した。始発 pH は 7.0~7.2 とした。

ii) 毒素液の作製 上記の培地に cooked meat broth で 37°C 24時間、前培養した菌液を肉カスが含まれないように注意して 0.5 ml 植菌し、これを 37°C 24時間培養した。この培養液を 3000 r.p.m. 15分間遠心し、この遠心上清にトルエンを加え充分振盪し一昼夜室温に放置した後、水で濡した濾紙で濾過してトルエンを除きこれを毒素液とした。

iii) 毒素の測定 上記の毒素液を生理食塩水かまたは酢酸緩衝液 (pH=6.0) によつて 10倍稀釈法で稀釈し、各稀釈段階の毒素液の 0.5 ml ずつを、重量約 20g の 2匹のマウスの腹腔内に各々注射し 3日間観察し 2匹のマウスを死に至らしめた M.L.D./ml を求めた。

また trypsin によつて毒素が活性化されることを Bonventre ら¹³⁾ が報告したのでこれに従つて、0.1% に trypsin (Difco) を含有する酢酸緩衝液 (pH=6.0) を毒素液と等量に加え 37°C の水浴で 1時間作用させ活性化を行なつた。この活性化毒素液についても同様の方法でその M.L.D./ml を測定した。

3. 孢子形成能の測定 (耐熱性の定量的試験)

石田¹²⁾ の Cl. welchii, 玉井¹⁴⁾ の Cl. sordellii 及び Cl. bifermentans における耐熱性の定量的分析によつて詳細に報告されている如く、その菌の耐熱性菌数と総生菌数との割合によつて孢子形成能を測定した。即ちその方法は、cooked meat broth で 37°C 24時間の前培養をした菌液を、中試験管に 10 ml ず

Toxigenicity of *Clostridium Botulinum*. I. Dissociation of Nontoxicogenic Substrains from a Toxicogenic Parent Strain of *C. Botulinum* type B-NIH. Yasumori Kawai Department of Bacteriology, (Director Prof. S. Nishida) School of Medicine, Kanazawa University.

つ入れた brain heart infusion broth (0.2% glucose 含有, (pH=7.0) に 0.5 ml ずつ植菌し 37°C 24時間培養後, 滅菌小試験管にこの培養液を 1 ml 採り 80°C 30分間加熱し, この加熱に耐えて生存する菌の数と原培養液中の総生菌数を, most probable unumber (M.P.N.) 法¹⁵⁾によつて測定した. なお M. P. N. 法によつて菌数測定を行う際, 生死を判定する培地について色々検討し 1% glucose 加 cooked meat broth が最適であつたのでこれを使用し 37°C 72時間培養後判定した.

4. 蛋白分解能の測定

玉井⁸⁾の行なつた gelatinase activity によつて測定した. 即ち, cooked meat broth で 37°C 24時間の前培養をした菌液の 0.5 ml を, 中試験管に 10 ml ずつ入れた brain heart infusion broth (1.0% glucose 含有, (pH=7.0) にそれぞれ植菌し, 37°C で 6, 12, 18, 24時間培養し, その菌液を 3000 r. p. m. 15分間遠心し, その上清を 1% ポリペプトン水によつて 2倍稀釈法で稀釈し, この各稀釈段階の菌上清液と等量の 1% ゲラチン液を加え, よく振盪して 37°C で 6時間作用させ, 氷室に一夜放置した後, その液化の状態を観察し完全に液化する最高稀釈倍数で判定した. なお培養後の操作は無菌的ではないので, 雑菌が混入し 6時間の作用時間内に起る急激な菌の増殖に留意したが, かかる例は全くなかつた.

5. 解糖能の測定

i) 培地内に残存する glucose の定量

cooked meat broth で 37°C 24時間の前培養された菌液 0.5 ml を, 1.0% glucose 加 brain heart infusion broth (pH=7.0) に植え, 37°C で 24, 48時間培養し, その培地内に残存する glucose の量を酸化酵素法¹⁶⁾ (使用した glucose oxidase は Boehringer 製) で定量し解糖消費された glucose 量を求めた.

ii) Warburg 検圧計による測定

brain heart infusion broth (1.0% glucose 含有, pH=7.0) にて 37°C 18時間培養の菌を採取し, Krebs Ringer Solution (K. R. S.) で 2回洗滌した後, 同じ K.R.S. で 1 mgN/ml に調製浮遊させた菌液 0.5 ml を検圧計の主室に入れ, 側室の 1側には 10% に glucose を含有する K.R.S. を 0.3 ml, 他の 1側には 3N の H₂SO₄ を 0.2 ml 入れた. 気相は 5% CO₂ 加 N₂ で, NaHCO₃-CO₂ 緩衝系, pH=7.4 を用いた. これらの方式はすべて Umbreit ら¹⁷⁾に従つた.

実験結果

I Substrains の毒素酸性性能の安定性

Cl. botulinum はその毒素酸性性能に関して極めて不安定であり, 有毒株が容易に無毒株に変異し, 有毒株の colony 分析によつて安定した有毒株や無毒株を選び出すことができるかどうかを見るために, 元来有毒株である type B (NIH) 株を cooked meat broth で前培し, これを Zeissler 血液寒天平板に拡げ, 37°C 48時間嫌氣的に培養し形態学的に差異のない 20個の colony を釣菌して, これらを substrains として cooked meat broth に培養保存し必要に応じて実験に使用した. この 20株の substrains について毒素産生能を測定し, 続く 7カ月間にわたつて 6回の毒素産生試験を行なつた.

表 1 NIH 原株とその substrains 20株の毒素産生試験

	実 験 回 数					
	I	II	III	IV	V	VI
	施 行 年 月 日					
	1 9 6 3		1 9 6 4			
	24/X	30/IX	14/I	20/II	10/IV	14/V
NIH 原株	+	+	+	+	+	10 ¹ (10 ²)
1	-	-	-	-	+	0 (10 ⁰)
2	-	-	-	-	+	0 (0)
3	-	-	-	-	-	0 (0)
4	-	-	-	-	+	0 (0)
5	-	-	-	-	-	0 (0)
6	-	-	-	-	-	0 (0)
7	-	+	+	+	-	10 ⁰ (10 ¹)
8	-	-	-	-	-	0 (0)
9	-	-	-	-	-	0 (0)
10	-	-	-	-	-	0 (0)
11	-	-	-	-	-	0 (0)
12	-	-	+	+	-	10 ⁰ (10 ¹)
13	-	-	-	-	-	0 (0)
14	-	-	-	+	-	0 (0)
15	+	+	+	+	+	10 ¹ (10 ¹)
16	-	-	-	-	-	0 (0)
17	-	-	-	-	-	0 (0)
18	-	-	-	-	-	0 (0)
19	+	+	+	+	+	10 ² (10 ²)
20	-	-	-	+	-	0 (10 ⁰)

(+), (-)は毒素産生の有無を示し, 数値は毒素の M.L.D./ml

() 内の数値は活性化した毒素の M. L. D./ml を示す.

表 1 に示す如く 6 回の毒素産生試験の結果

i) 原株と同様に $10^2 \sim 10^1$ M.L.D./ml の毒素を常に産生する substrains として No. 15, 19,

ii) 時には原株よりやや低い 10^0 M.L.D./ml の毒素を産生するが、毒素を産生しない場合もある substrains として No. 1, 2, 4, 7, 12, 14, 20

iii) 有毒株から採つたにもかかわらず、常に毒素を産生しない substrains として No. 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 18, の 3 種類に分類されることを知つた。従つて Smith¹⁾ の「毒性に関して安定した有毒株、無毒株を colony 分析によつて得ることはできない」という記述とは異なり、substrain No. 15, 19, の如く安定した毒素産生能を持つ株や、substrain No. 3, 5, 6, その他の如く安定した無毒株を得ることができた。

また第 6 回目の実験では、trypsin による毒素の活性化を試みたが、substrain No. 1 及び No. 20 のように活性化の処置によつて毒素を証明し得る場合もあつた。これらの株は以前の 5 回の実験で 1 回以上毒素産生を証明された株でありこのような株 9 株のうち、活性化によつて毒素を証明された株は 6 株であり、残りの 3 株は活性化によつても毒素を証明することはできなかつた。また前 5 回の実験で全く毒素産生を証明されていない 11 株は活性化によつても毒素を証明することはできなかつた。

以後の実験において、常に毒素を産生する有毒株として substrain No. 15, 19 の 2 株 (このうち No. 19 は常に 10^2 M.L.D./ml を示したのに対して、No. 15 は 10^2 M.L.D./ml を示すことは殆んどなく、 $10^0 \sim 10^1$ M.L.D./ml を示した。) 常に毒素を産生しない無毒株として substrain No. 5, 6, の 2 株を使用して有毒株と無毒株の生物学的差異を究明したいと考えた。

II 孢子形成能と毒素産生能

毒素産生能と関係が深いと考えられている孢子形成能を有毒株、無毒株について測定した。

表 2 に示す如く、3 回にわたつた同じ方法で耐熱菌の定量分析による孢子形成能の測定実験を繰り返して行なつた。また同時にその毒素産生能も定量的に測定した。その結果、有毒株である substrain No. 19, 15, と無毒株である substrain No. 6, 5, の孢子形成能の間には、耐熱性試験法を用いる限り有意なる差異を認めることはできなかつた。

III 蛋白分解能及び解糖能

Townsend¹⁸⁾ は「無毒株は有毒株よりも saccharolytic であり proteolytic ではない」と述べているので、有毒株と無毒株の蛋白分解能と解糖能について検討した。先ず蛋白分解能については、表 3 で示す

表 3 Substrains 4 株の gelatinase activity

		有 毒 株		無 毒 株	
		No. 19	No. 15	No. 6	No. 5
培 養 時 間 (時)	6	0*	0	0	0
	12	1	1	2	2
	18	0	4	4	4
	24	1	2	2	2
	48	1	1	1	1

* gelatin の液化を示した最高稀釈倍数

如く、強い毒素産生能を持つ有毒株 substrain No. 19 を除いて他の 3 株は共に増殖の進行につれて活性化が上昇し、18 時間目で培養液の 4 倍稀釈まで陽性を示し、培養の継続につれてその活性化値が下降した。有毒株 substrain No. 19 は前記の 3 株と異なりその活性化値は培養時間に関係なく低い値を示し、Townsend の意見と相違する様相を示した。

次に解糖能を 1% に glucose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) を含有する brain heart infusion broth (実測値 912

表 2 Substrains 4 株の毒素酸性能と孢子形成能

		実 験 I			実 験 II			実 験 III		
		毒 素	孢 子 形 成 能		毒 素	孢 子 形 成 能		毒 素	孢 子 形 成 能	
		M.L.D./ml	総生菌数/ml	耐熱菌重/* ml	M.L.D./ml	総生菌数/ml	耐熱菌重/ml	M.L.D./ml	総生菌数/ml	耐熱菌重/ml
有 毒 株	No.19	10^1	1.7×10^8	3.3×10^5	10^2	2.4×10^6	2.2×10^5	10^1	2.3×10^7	1.7×10^6
	No.15	10^1	2.2×10^8	1.7×10^6	10^1	7.0×10^7	2.2×10^5	10^0	4.9×10^7	1.3×10^6
無 毒 株	No.6	0	1.2×10^8	1.3×10^6	0	1.3×10^7	9.5×10^5	0	2.4×10^8	1.7×10^6
	No.5	0	2.2×10^8	4.9×10^6	0	4.9×10^6	1.1×10^4	0	4.9×10^7	4.9×10^5

* 30分加熱後、1% glucose 加 ooked meat broth に発育してきた菌数

mg/dl glucose) に菌を培養し、経過中に消費される糖の量を測定することによつて検討した。表4で示されている如く、有毒株及び無毒株は始めの24時間まで両者共 glucose の消費量に殆んど差はなかつた(12時間までのそれにも差はなかつた)。しかし48時間目に至るとき、有毒株 substrain No. 19 の解糖能は極端に落ち、他の3株はほぼ等しい解糖値を示した。

表4 Substrains 4株の glucose 消費量

		有毒株		無毒株	
		No. 19	No. 15	No. 6	No. 5
培養時間	24	648*	648	567	648
	48	822	906	884	912
備考**		134	358	317	264

* 912 mg/dl の glucose を含有する B.H.I.B. で培養し、培地内に残存する glucose の定量により消費量を計算した。

** 備考欄の数値は24時間目から48時間目の間に消費された量を示した。

更に解糖の際に発生する CO₂ の量を Warburg 検圧計によつて測定し、有毒株と無毒株の解糖能の差を追求した。表5に示す如く、同一の条件で2回の実験を繰り返して行なつた。30分間に発生する CO₂ 量は毒素産生能の強い有毒株 substrain No. 19 において低く、他の3株においてはほぼ同様に高い値を示した。

表5 4株の Substrains の glucose 解糖による CO₂ の発生量

	有毒株		無毒株	
	No. 19	No. 15	No. 6	No. 5
Expt I	84.2*	159.1	119.7	147.2
Expt II	96.1	118.7	103.2	117.7

* warburg 検圧計を使用した際の CO₂ 発生量 (cmm/30min)

考 察

「ボトリヌス菌の毒素を産生する株を平板の上に開き、数十個の colony を substrains として釣菌し、その毒素産生を試験すればそのうちのかなりの substrains は親株と異なつて無毒であり、有毒の substrains はわずかに存在する。更にこの有毒の substrains を colony に開き毒素産生を試験すれば再び違つた毒素産生能を示す。従つてこのような毒素

産生の変異関係を追跡することは exasperating である。」と Smith¹⁾ は述べている。私はこのうち前半の部分を確認できたが、その substrains の toxigenicity は必ずしも “fickle” ではなく毒性株は安定して有毒であり、無毒株は安定して無毒であるものを得ることができた。従つて以後私はこの両群の差異点を明らかにすることによつてその toxigenesis を明確にしたいと考えている。

Dolman²⁾ によれば type B の OS colony は無毒で、TOX colony は有毒であると述べているが、私の用いた blood agar 上では colony の型態による差は全く見ることができなかつた(私の substrains は生物性状の上でも差はなかつた)。しかし私は colony の解析をする場合、brain heart infusion agar が blood agar より優れていることを type E で確かめているので今後は colony 型態との関係は適した培地で行ないたいと考えている。

Townsend¹⁸⁾ は fermentation の強いもの (saccharolytic) が弱毒で proteolytic ではないと述べているが、これも私の得た無毒株と有毒株にはあてはまらないことが判つた。本報ですでに toxigenic strain が持ち fermentation 力や gelatinase 活性が低いと述べたが、この株は発育に関しては nontoxigenic strain と殆んど差を見ることがないことから別に degenerated strains のようには見えなかつた。本報では耐熱性を指標として孢子形成能を調べたが、clostridia における孢子形成能の重要性から考えて更に形態学的見地から検討したいと考えている。

結 論

Clostridium botulinum type B NIH 株の substrains 20株について毒素原性の分析を試み、安定した有毒株と無毒株を得ることができた。これらの代表株をそれぞれ2株ずつ選びその孢子形成能、蛋白分解能及び解糖能を検索した。孢子形成能には有意なる差異を見ることができなかつたが、蛋白分解能及び解糖能に関しては有毒株のうちでも毒性の強い株の gelatinase 活性は低く、glucose の醱酵能も弱いことを知つた。

稿を終るにのぞみ、終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師西田尚紀教授並びに御協力下さつた山岸高由氏及びその他の教室員の皆様に、心より謝意を表します。

文 献

- 1) Smith, L. Ds. : Introduction to the pathogenic anaerobes 1st ed., p. 108, Chicago,

- Univ. Chicago Press., (1955). 2) Dolman, C. E., Murakami, L. : J. Infect. Dis., 109, 197 (1961). 3) Dolman, C. E. : Canad. J. Public health., 48, 187 (1957). 4) 小野悌二 : 北海道衛研報, 13, 28 (1962). 5) 飯田広夫 : 北海道衛研法, 15, 10 (1965). 6) Yamagishi, T., Ishida, S., & Nishida, S. : J. Bact., 88, 646 (1964). 7) Nishida, S., Tamai, K. & Yamagishi, T. : J. Bact., 88, 1641 (1964). 8) Tamai, K., Nishida, S. : J. Bact., 88, 1647 (1964). 9) Nishida, S., Nakagawara, G. : J. Bact., 88, 1636 (1964). 10) Nishida, S., Nakagawara, G. : J. Bact., 86, 993 (1965). 11) Sanada, I., Nishida, S. : J. Bact., 89, 626 (1965). 12) Bonventre, P. F., Kempe, L. L. : J. Bact., 78, 892 (1959). 13) 石田勝一 : 十全医会誌, 69, 67 (1963). 14) 玉井健三 : 十全医会誌, 70, 365 (1964). 15) Hoskins, J. K. : Pub. Health Rep., 49, 393 (1934). 16) Huggett, A. St. G., Nixon, D. A. : Biochem. J., 66, 12 (1957). 17) Umbreit, W. W., Burris, B. H., Stauffer, J. F. : Manometric techniques and tissue metabolism, Minn., Burgess Publishing Co., (1949). 18) Townsend, C. T. : J. Infect Dis., 45, 87 (1929).

Abstract

Twenty substrains of a *Clostridium botulinum* type B strain (NIH) were analyzed for their toxigenicity and the substrains with consistent toxigenicity as well as those with consistent nontoxigenicity were established. Their sporulating potencies, when examined by the heat resistance test, did not show any significant difference among each other of both groups, whilst both proteolytic and fermentative abilities were weaker in the toxigenic than in the nontoxigenic substrains.