

ボツリヌス G 型菌とハスティホルメ菌の生化学的性状に関する研究

武士 甲 一**

札幌医科大学微生物学講座 (主任 小熊恵二 教授)*

北海道立衛生研究所疫学部細菌科**

Biochemical Properties of *Clostridium botulinum* Type G and *Clostridium hastiforme*

Koichi TAKESHI**

Department of Microbiology, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. K. Oguma)

Department of Epidemiology, Hokkaido Institute of Public Health**

Biochemical properties, toxin production and bacteriophages of four type G strains of *Clostridium botulinum* were studied.

All four strains were motile, hemolytic, weakly proteolytic and positive in H₂S production as well as gelatin liquefaction. All strains, however, were nonsaccharolytic and negative in catalase, lecithinase, lipase and indole production as well as nitrate reduction. Many spores were formed only when the organisms were incubated in Tarozzi medium (Cooked Meat Medium containing 2% Bact peptone and 0.4% NaCl). Purified spores (2×1μ in size) were obtained by incubating the Tarozzi medium culture fluid in TBYS medium (Trypticase peptone; 5%, Bact peptone; 0.5%, Yeast extract; 0.1%, NaCl; 0.4%, TGC; 0.1%). Low levels of toxin were produced in regular broth cultures but a high titer of toxin (22,400 mouse 50% lethal doses per ml) was produced by the dialysis tubing method. The toxicity was increased to about 20 times by the treatment with trypsin. These characteristics were different from those of other types of *C. botulinum*.

Lysis of cells was induced by mitomycin C(MC) treatment or ultraviolet(UV) irradiation. In the lysate, no complete phage was observed but many sheath-like rods, the size of which was 200nm long and 25nm wide, were found by electron microscopy. One strain(G-2740) was treated with acridine orange, nitrosoguanidine and MC or UV irradiation in order to get nontoxigenic(and non-lysogenic) variants. Although a total of 600 colonies were checked, no nontoxigenic strain was found.

Characteristics of the four strains of *Clostridium hastiforme* were also studied. They demonstrated the same biochemical properties as those of *C. botulinum* type G except for the toxin production. *C. hastiforme* seems to be a nontoxigenic variant of type G strain. In the MC induced lysates of *C. hastiforme*, complete phages were observed. These data suggest that no relationship exists between the toxigenicity of type G strain and bacteriophages.

(Received September 5, 1986 and accepted October 6, 1986)

Key words : *C. botulinum* type G, *C. hastiforme*, Spore formation, Toxin production, Bacteriophages

1 緒 言

ボツリヌス菌は強力な神経毒を産生し、毒素の抗原性によりA～Gの7型に分類される。A～F型菌に関しては、菌及び毒素の生化学的性状、動物に対する毒性や疫学調査について詳細に報告されているが^{1,2)}、G型菌についてはまだ少ない。

ボツリヌスG型菌は、1969年、Gimenez及びCiccarelli³⁾により、アルゼンチンのトウモロコシ畑の土の中から初めて分離された。その後、この国の土の中から更に一度分離されただけで、以後、土及びヒトや動物の食中毒例からの報告はない。

1980年、スイスのSonnabendら⁴⁾は、1975～1980年の5年間にわたり、原因不明で突然死した成人40例及び乳児11例の剖検を行い、その細菌検査を実施した。成人4例の剖検臓器及び腸内容からG型菌を、また、他の1例からはA型とG型の両菌を検出した。更に、食後2時間で突然死した生後18週齢の1例の男子小腸からG型菌を検出した。これらは、G型菌による突然死あるいは乳児ボツリヌス症を示唆するものであるが、その後、死亡例のあった住居地区の土や参考となる食品等の細菌検査がなされたがG型菌は検出されず、因果関係については今もなお不明のままである。

Ciccarelliら⁵⁾は、1株のG型菌(G-2740)の細菌学的及び生化学的性状を検討した。菌は、レシチナーゼ及びリパーゼを産生せず、ブドウ糖を含めた糖質をいづれも分解できないNonsaccharolyticなものであった。また、通常毒素産生用培地での毒素の産生性は弱いが、産生された毒素はトリプシン処理により数十倍活性化されることを認めた。更に、芽胞形成は何れの培地でも認め難いことを指摘している。彼等により報告されたG型菌の生化学的性状は、A～F型までのボツリヌス菌よりもハスティホルメ菌に類似している。今回、これまでに分離された6株のG型菌の内の4株と4株のハスティホルメ菌を集め、その細菌学的及び生化学的性状を比較、検討した。高力価の毒素や多数の芽胞を作るための培地や方法、更には、菌に溶原化しているバクテリオファージについても詳細に検討したので、ここに報告する。

2 実験方法

2.1 供試菌株

Clostridium botulinum type G, G-2740は、CDC (Centers for Disease Control) のV. R. Dowell博士より分与を受けた。G-89, G-117, G-2739, G-2741

及びG-2742は、FDA(Food and Drug Administration)のD. A. Kautter博士より分与を受けたが、G-2741及びG-2742は死滅していた為、実験に供し得なかった。*Clostridium hastiforme* GAI-6461, GAI-6467, GAI-6470, GAI-6477については、岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設の上野一恵博士より分与を受けた。

送付された菌株は、Cooked Meat Medium (CMM, Difco)で30℃、48時間増菌後、Brain Heart Infusion 寒天培地 (BHI, Difco)で嫌気培養し、雑菌混入のないことを確認した後、凍結乾燥を行い、使用するまで-80℃に保存した。

2.2 細菌学的特性

凍結乾燥保存菌株を各々、CMMで30℃、48時間増菌後、5%ウマ血液加BHI及び5%ウマ血清加BHIで30℃、48時間嫌気培養した。培養後、集落及び溶血性を観察し、グラム染色及び芽胞染色を行って菌の形態を観察した。また、これをGAM半流動培地に穿刺培養し、30℃、7日間培養後、運動性を確認した。

2.3 生化学的性状

常法⁶⁾に従い、以下の試験を行った。

2.3.1 カタラーゼ反応

BHI培養集落に3% H₂O₂水を滴下し、発泡性により判定した。

2.3.2 レシチナーゼ及びリパーゼ反応

5%卵黄加BHIに菌を接種し、37℃で4日間培養した。培養後、レシチナーゼについては乳光反応帯の形成により、また、リパーゼについては真珠層形成の有無により判定した。

2.3.3 インドール反応

0.3%酵母エキス加SIM培地に菌を接種し、37℃で4日間培養した。培養後、エチルエーテルで抽出しコバックの試薬を滴下し、赤変のとき陽性とした。

2.3.4 硫化水素の産生性

3%酵母エキス加SIM培地に菌を接種し、37℃で7日間培養した。培養後、培地の黒変により判定した。

2.3.5 蛋白分解性

菌をCMMに接種し、30℃、7日培養後、肉片の消化により判定した。

2.3.6 牛乳に対する作用

菌を10%スキムミルク溶液(微量の還元鉄を含む)に接種し、37℃で7日間培養後、判定した。

2.3.7 硝酸塩の還元能

0.3% KNO₃, 0.1%ブドウ糖加糖分解用GAM半流動培地に菌を接種し、37℃で4日間培養した。培養後、

スルファニル酸及びクレブス酸を加え、赤変したときを陽性とした。また、無変化のときは Zn 粉末を加え、赤変を陰性、無変を陽性とした。

2・3・8 ウレアーゼ

尿素培地に菌を接種し、37°C で 7 日間培養した。培養後、培地が赤変したものを陽性とした。

2・3・9 ゼラチン液化能

1%ゼラチン加 GAM 寒天培地に菌を接種し、37°C で 4 日間嫌気培養した。培養後、飽和硫酸溶液を重層し、菌苔周囲の透明帯形成により判定した。

2・3・10 エスクリン及びデンプンの加水分解試験

エスクリン及びデンプンを糖分解用 GAM 半流動培地に 1% に加え、菌を接種後、37°C で 7 日間培養した。培養後、エスクリンについては 1% クエン酸鉄アンモニウム溶液を 3 滴加え、黒変したものを陽性とした。また、デンプンについてはルゴール液を 1 滴加え、無変化のときを陽性、青変を陰性とした。

2・3・11 糖質分解能

糖分解用 GAM 半流動培地に各糖質を 1% に加え、菌を接種後、37°C で 7 日間培養した。培養後、各培地の pH を pH メーターで測定し、pH 5.9 以下を陽性、pH 6.0 以上を陰性とした。糖質は、グルコース、マンニトール、ラクトース、ジェクロース、マルトース、サリシン、グリセロール、マンノース、キシロース、ラムノース、アラビノース及びトレハロースの 12 種類を用いた。

2・4 揮発性脂肪酸 (Volatile Fatty Acid, VFA) の同定

常法に従い⁷⁾、以下の方法で産生された VFA を同定した。

PYG 培地 2 ml に菌を接種し、37°C で 7 日間培養した。培養後、チモールブルー液を一滴加え、10% NaOH で pH 9.0 に調整し、オートクレーブで滅菌した。冷却後、20% HCl を加えて pH を 2.0 以下に調整し、直ちにこれを VFA 分析用試料として 2 μ l をガスクロマトグラフィー (GC-6A, 島津) に注入した。3 mm \times 2 m のガラスカラムに、10% に Reoplex を加えた Chromosorb W を充てんし、カラム温度を 130°C、注入口温度を 220°C、検出温度を 220°C とした。キャリアガスは、N₂ 60~70 ml/min、H₂ 60 ml/min、Air 100 l/min とした。

2・5 芽胞

2・5・1 培地の検討

4 株の G 型菌の芽胞形成能を、以下の 5 種類の培地を用いて検討した。A 及び B 型菌の芽胞産生培地であ

る TBY 培地⁸⁾ (Trypticase peptone; 5%, Bact peptone; 0.5%, Yeast extract; 0.1%, チオグリコール酸 Na; 0.1%), E 型菌の芽胞産生培地である TPG 培地⁹⁾ (Trypticase peptone; 5%, Proteose peptone; 0.5%, ブドウ糖; 0.4%, チオグリコール酸 Na; 0.1%), ウェルシュ菌の芽胞産生培地である Duncan and Strong 培地¹⁰⁾ (DS, Proteose peptone; 1.8%, Yeast extract; 0.2%, 可溶性デンプン; 0.4%, チオグリコール酸 Na; 0.1%, Na₂HPO₄·12H₂O; 1.34%), その他 CMM 及び Tarozzi 培地¹¹⁾ (2% Bact peptone, 0.4% NaCl 加 CMM) を用いた。

対数増殖期の CMM 菌液 1 ml を、これら 5 種類の培地 15 ml に接種し、32°C で 15 日間培養した。培養後、各菌液を位相差顕微鏡による観察及び 75°C、10 分の加熱後、10 倍階段希釈し、MPN (Most Probable Number) 法¹²⁾ により培地 1 ml 当りの形成芽胞数を測定した。

次に、Tarozzi 培地で得られた芽胞の発芽、増殖、芽胞形成の過程をみるため、また、芽胞精製のための培地を検討するため、Tarozzi 培地で得られた G-2740 の芽胞液を TB 培地 (Trypticase peptone; 5%, Bact peptone; 0.5%, チオグリコール酸 Na; 0.1%) 及び NaCl を 0.4% に加えた TBS 培地、更に TBY 培地及び NaCl を 0.4% に加えた TBYS 培地の 4 種の培地に接種した。芽胞液を 10 倍階段希釈して約 10³ 個/ml とし、これを 75°C、10 分加熱後、その 1 ml を 40 ml の各培地に接種し、32°C で培養した。毎日 2 ml ずつ採取し、これを位相差顕微鏡による観察、及び 75°C、10 分加熱後、10 倍階段希釈して MPN 法により形成芽胞数を算定した。また、同時に生菌数も測定した。

2・5・2 芽胞の精製

Tarozzi 培地で得られた G-2740 の芽胞液 (約 10⁸ 個/ml) を 75°C、10 分加熱後、その 1 ml を 1 l の TBYS 培地に接種し、32°C で 4 日間培養した。培養後、10,000 g、30 分遠心し、沈渣を 40 ml の滅菌蒸留水に浮遊させ超音波処理 (1.2 A, 15 分) を行った。これを滅菌蒸留水を用い、遠心 (2,000 g, 10 分) により 10 回洗浄した。沈渣に 20 ml の滅菌蒸留水を加え、精製芽胞浮遊液とした。その 1 ml を 75°C、10 分加熱後、10 倍階段希釈し、MPN 法により原液 1 ml 当りの形成芽胞数を算定した。

2・5・3 走査電子顕微鏡による観察

常法¹³⁾ に従い、G-2740 の精製芽胞浮遊液を以下の要領で処理し、走査電子顕微鏡で観察した。2% グルタルアルデヒドで 2 時間、次いで 1% 四酸化オスミウム液で

1時間処理して固定した後、これをアセトン列(50, 70, 80, 85, 90, 95, 99.8及び100%)に各15分浮遊させ、遠心して脱水を行った。次に、酢酸イソアミルを通して液体炭酸ガス臨界面乾燥をした後、白金イオン・スパッタリングにより約5nm蒸着し、観察した。

2.6 毒 素

2.6.1 毒素の産生性

ボツリヌス中毒から分離された菌の毒力を決める場合、通常、CMMが用いられる¹⁴⁾。そこで4株のG型菌を50mlのCMMに接種し、30°Cで7日間培養した。毎日2mlずつ採取し、これを遠心後、10倍階段希釈し、その0.5mlをマウス(ddY系、雄、平均体重20g)の腹腔内に注射し、致死活性によりその力価を判定した。また、この上清に2%トリプシン溶液(pH6.0, 1:250, Difco)を等量加え、37°Cで30分作用させた後、10倍階段希釈し同様にその力価を求め、毒素がトリプシン処理により活性化されるか否かを検討した。

2.6.2 透析培養

力価の強い毒素液を得る目的で、4株のG型菌を透析培養した^{15,16)}。500mlの三角フラスコに450mlのPYG培地(Proteose peptone; 4%, Yeast extract; 0.5%, ブドウ糖; 0.5%, チオグリコール酸Na; 0.1%, pH7.0)を入れ、オートクレーブで滅菌した。これに、予め滅菌しておいた透析膜を入れ、更に、この透析膜に生理食塩水で浮遊した各菌液を50ml(約 10^6 個/ml)入れ、30°Cで7日間嫌気培養した。培養後、透析内液を遠心し、その上清を毒素液として力価を求めた。また、トリプシン処理後の力価も求めた。

2.6.3 毒素投与によるマウスの致死時間と毒力の関係について (Time to Death Test)

G-2740を透析培養して得られた毒素をトリプシンで活性化し、これを10倍階段希釈し、その0.1mlを各々1群5匹のマウスに静注して平均致死時間を測定した。グラフの縦軸に腹腔内注射による毒力の対数を、横軸に静脈内注射による平均致死時間の対数をプロットした。A及びE型毒素に関しては、阪口ら¹⁷⁾の報告を引用した。

2.6.4 抗毒素血清の作製

抗毒素血清を作製するために、まず、G型毒素をトキソイド化した。透析膜にG型毒素液(22,400マウスLD₅₀/ml/ip)を入れ、1%ホルマリン加酢酸緩衝液(0.2M, pH6.0)に対し、37°Cで4日間透析した。毒性が消失していることを確認後、次に、このトキソイド液1mlを1週間隔に4回、3羽の家兎(日本白色種、雄、平均体重2.5kg)に静注し、最終注射より3日目に全

採血を行い血清を分離した。分離血清は非働化後、使用するまで-80°Cに保存した。得られた抗体を用いて中和実験を行った。4株の産生するG型毒素及びA~F型毒素を10MLD/mlに調整し、これに等量の階段希釈したG型抗毒素血清を加え、37°Cで1時間反応させた。これを1群2匹のマウスに腹腔内注射し、生死の判定により中和反応を呈するか否かを検討した。

2.7 無毒株の分離とファージ

2.7.1 菌株の薬物処理

無毒株を分離する目的で、Acridine orange (AO, 和光純薬)、N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG, 和光純薬)及びMitomycin C (MC, 協和発酵)の3種類の変異誘起剤並びに紫外線(15W, UVランプ、松下電器)を用いてG-2740を処理した¹⁸⁾。

滅菌AO溶液を終濃度が50µg/mlになる様にTBY培地10mlに加え、更に、この培地に対数増殖期のG-2740(約 10^7 個/ml)を0.1ml加え、30°Cで一夜培養した。培養後、その1白金耳をBHIで嫌気培養し、生じた100集落について毒性を調べた。同様に、NTGを終濃度が100µg/mlになる様にG-2740の対数増殖期の培養液10mlに加え、30°Cで10分間静置後、5,000g、15分遠心した。沈渣にTBY培地を10ml加え、30°Cで1時間培養した。培養後、その1白金耳をBHIに嫌気培養し、生じた200集落について毒性を調べた。MCは、終濃度が50µg/mlになる様に対数増殖期のG-2740の培養液10mlに加え、30°Cで2時間培養後、5,000g、15分遠心した。沈渣にTBY培地を10ml加えて一夜培養し、その1白金耳をBHIに嫌気培養し、生じた100集落について毒性を調べた。UVは、対数増殖期のG-2740の培養液9mlを径90mmの滅菌ポリシャーレに入れ、50cmの距離で1.5分間照射した。その1白金耳をBHIに嫌気培養し、生じた100集落について毒性を調べた。併せて、無処理の100集落についても毒性を調べた。

2.7.2 ファージ及びファージ様粒子の分離

4株のG型菌と4株のハスティホルム菌の対数増殖期の培養細胞に、UV及びMCを作用させてファージ誘発を試みた。

対数増殖期の各培養液9mlを径90mmのポリシャーレに入れ、UVを50cmの距離で45秒、1分、1.5分及び2分間照射した。各UV照射菌液を中試験管に入れ、37°Cで培養した。これより経時的に1mlを採取し、波長655nmで吸光度を測定した。MCは、終濃度が1µg/mlになる様に対数増殖期の各培養液40mlに加え、30°Cで20分間静置後、10,000g、5分遠

心した。沈渣に TBY 培地を 40 ml 加え、37°C で培養した。これより経時的に 1 ml を採取し、波長 655 nm で吸光度を測定した。溶菌がみられた培養液を 10,000 g、30 分の遠心により菌体を除去し、更に、上清を 60,000 g、60 分遠心した。沈渣に酢酸アンモニウム溶液 (0.1 M, pH 6.8) を 0.5 ml 加え、ネガティブ染色を行った後、電子顕微鏡で観察した。

2.7.3 毒素産生性のファージ変換

MC で処理した 4 株の G 型菌を 40 ml の TBY 培地に浮遊し、37°C で 4 時間培養した。これを 10,000 g、30 分遠心し、上清を径 450 nm の孔を持つメンブランフィルターで濾過した。各濾液 1 ml を 10 ml の対数増殖期の 4 株のハスティホルム菌に加え、37°C で 4 時間反応させた。この反応液 0.2 ml を 10 ml の CMM に接種し、30°C で 4 日間培養した。培養上清をトリブシン処理後、その 0.5 ml をマウスの腹腔内に接種して毒素産生の有無を検討した。

2.7.4 ファージ様粒子のバクテリオシン活性

G 型菌から誘発されたファージ様粒子に、バクテリオシン活性が存在するか否かを検討した。

G-2740 を MC 処理することによって誘発して得たファージ様粒子を超遠心で集め、TBY 培地に浮遊した。その 1 ml を 10 ml の対数増殖期の A-62A, B-40B, C-Stockholm, D-1873, E-Iwanai 及び F-OSU の A~F 型までのボツリヌス菌とスポロゲネス菌野外株、ハスティホルム菌 GAI-6461 に加えた。これより経時間に 1 ml を採取し、波長 655 nm で吸光度を測定した。

3 成 績

3.1 細菌学的特性

G 型菌は、30°C、48 時間の培養で直径約 2 mm の円形集落と、3~4 mm の不定形集落を形成し、いずれも乳灰白色で粘稠性を有した。集落を実体顕微鏡で観察すると、集落全体がモザイク模様を呈した。両集落の毒性の差異は認められなかったが、両集落共、モザイク模様が消失あるいは不鮮明になると E 型菌で報告されている様に、毒性の著しい低下が認められた。

G 型菌は、グラム陽性の桿菌で単在もしくは短連鎖し、平均の大きさは G-2740 で $0.7 \times 3 \mu$ 、他の 3 株は $0.7 \times 5 \mu$ であった。芽胞染色及び位相差顕微鏡による観察では、芽胞形成は認められなかった。運動性があり、ウマ血液寒天培地上で β 溶血を示した。

3.2 生化学的性状

4 株の G 型菌及び 4 株のハスティホルム菌は、Table

1 に示された様に、生化学的性状による差異は認められなかった。供試 8 株はすべて、弱蛋白分解性で硫化水素を産生し、ゼラチンを液化し、牛乳を凝固した。しかし、カタラーゼ、レンチナーゼ、リパーゼ、ウレアーゼ及びインドールを産生せず、硝酸塩の還元能が陰性で、エスクリン及びデンプンを加水分解せず、ブドウ糖を含めた 12 種類の糖質をいずれも分解しなかった。

3.3 揮発性脂肪酸の同定

4 株の G 型菌と 4 株のハスティホルム菌が産生した VFA をガスクロマトグラフィーで同定した (Fig. 1)。G-89, G-117, G-2739, GAI-6470 及び GAI-6477 は、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、正酪酸、吉草酸及びイソ吉草酸を産生した。GAI-6461 及び GAI-6467 は、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、正酪酸及びイソ吉草酸を産生した。また、G-2740 は、酢酸、イソ酪酸、正酪酸及びイソ吉草酸を産生した。以上の VFA の産生性から、供試 8 株は 3 群に分けられた。

3.4 芽 胞

4 株の G 型菌を各々、5 種類の液体培地に接種し、32°C で 15 日間培養後、位相差顕微鏡により観察した。また各培養液の加熱後の増殖性について検討した。Table 2 に示した様に、CMM, TPG, TBY 及び DS では 4 株共、芽胞形成は認められなかった。しかし、CMM に Bact peptone を 2% と NaCl を 0.4% に加えた Tarozzi 培地では 4 株共、芽胞形成が認められた。形成芽胞数は、G-89; 7.5×10^7 個/ml, G-117; 2.3×10^7 個/ml, G-2739; 1.1×10^7 個/ml, G-2740; 9.3×10^8 個/ml であった。

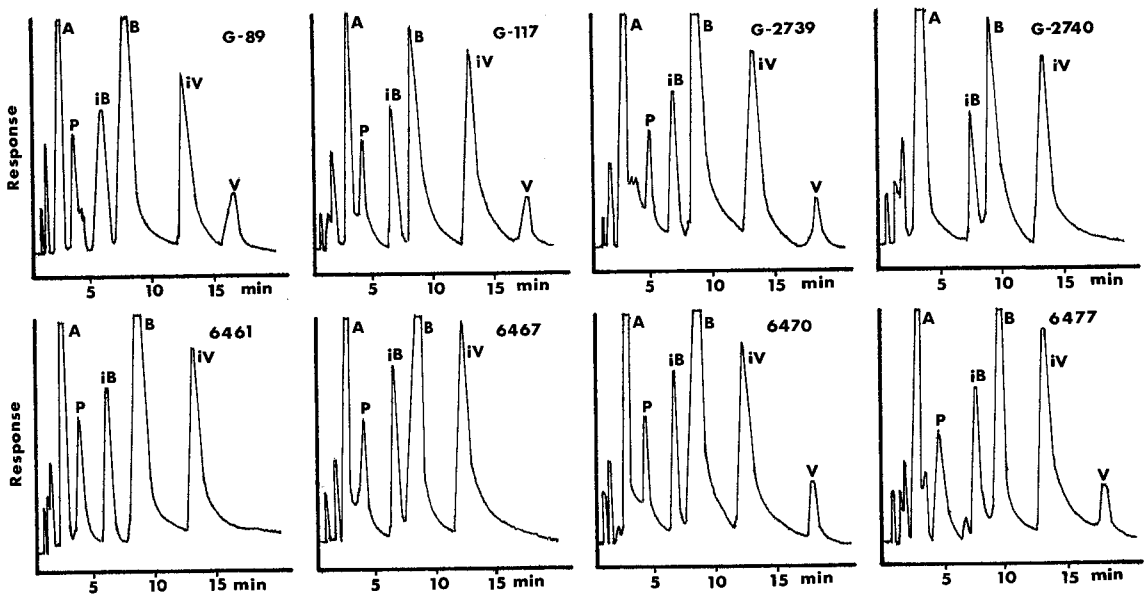
Tarozzi 培地での芽胞形成に 2% Bact peptone, 0.4% NaCl のどちらが必要なのかを検討するため、対数増殖期の G-2740 1 ml を 15 ml の CMM, これに 2% に Bact peptone を加えた CMMP, 0.4% に NaCl を加えた CMMS 及び Tarozzi 培地に加え、32°C で 15 日間培養した。その結果、芽胞形成は Tarozzi 培地でのみ認められた。Tarozzi 培地で得られた G-2740 の芽胞液を以下の 4 種の培地に接種し、32°C で培養した。4 培地とも発芽、増殖、芽胞形成の過程が認められ、4 日で形成芽胞数が最大となった。4 日目の各培地 1 ml 当りの生菌数及び芽胞数は、以下のとおりであった。i) TB 培地; 4.3×10^8 , 1.5×10^8 , ii) TBS 培地; 2.3×10^8 , 1.5×10^8 , iii) TBY 培地; 9.3×10^7 , 2.3×10^8 , iv) TBYS 培地; 4.3×10^8 , 7.5×10^8 ,

Tarozzi 培地では肉片が入っているため芽胞精製には不適であるので、Tarozzi 培地で得られた G-2740 の芽胞液を TBYS 培地に接種して 32°C で 4 日間培養し、こ

Table 1 Biochemical properties of *C. botulinum* type G and *C. hastiforme*.

Test	<i>C. botulinum</i>				<i>C. hastiforme</i>			
	G-89	G-117	G-2739	G-2740	6461	6467	6470	6477
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Milk	C	C	C	C	C	C	C	C
H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation of								
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-

C; Coagulated, +; positive, -; negative,

**Fig. 1** Identification of the volatile fatty acids produced by *C. botulinum* type G and *C. hastiforme* by gas chromatography.

A: acetic, P; propionic, iB; isobutyric, B; butyric, V; valeric, iV; isovaleric,

れより芽胞の精製を行った。その結果、1 l の培養で total 2.4×10^{11} 個の精製芽胞が得られた。

次に、G-2740 から得られた精製芽胞浮遊液を走査電子顕微鏡で観察した。Fig. 2 に示した様に、長軸約 2 μ 、短軸約 1 μ の卵円形の芽胞が認められた。本芽胞の形成位置は端在性で、大きさと形態は A 型菌の芽胞に非常によく類似していた。

3.5 毒 素

3.5.1 毒素の産生性

G-2740 を用い、CMM での毒素の産生性及び透析培養 7 日の毒素力価を測定した結果を Fig. 3 に示す。CMM, 30°C の培養で、1 日目では毒性は認められなかった。2 日目以降、5, 40, 200 MLD/ml と漸次増加したが、7 日目でも 200 MLD/ml であったことから、CMM では 4 日目で毒素産生量が最大になることがわかった。他の 3 株の CMM での毒性は、ほぼ同様であった。これらの毒素はトリプシン処理しても余り活性化されず、20 倍程であった。

透析培養では、7 日目で 22,400 LD₅₀/ml の毒性が得

Table 2 Sporulation of *C. botulinum* type G in different media.

Medium	G-89	G-117	G-2739	G-2740
CMM	-	-	-	-
TPG	-	-	-	-
TBY	-	-	-	-
DS	-	-	-	-
Tarozzi	+	+	+	+

Type G strains were incubated in five different media at 32°C for 15 days. The culture fluids were treated at 75°C for 10 min, diluted into 10-fold serial steps, and then inoculated into BHI broth. Spore numbers were counted by the MPN method. +; 10^7 – 10^8 spores/ml

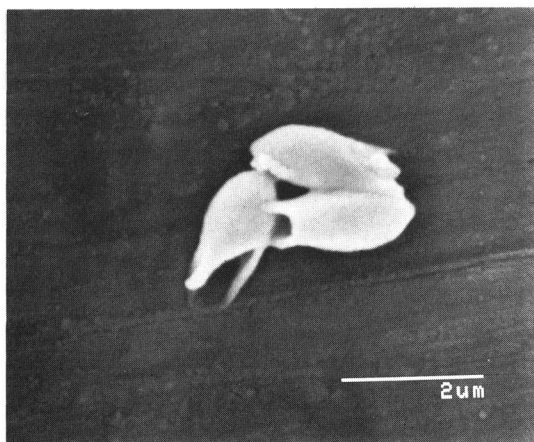


Fig. 2 Scanning electron micrograph of spore in *C. botulinum* type G, strain G-2740 ($\times 25,000$)

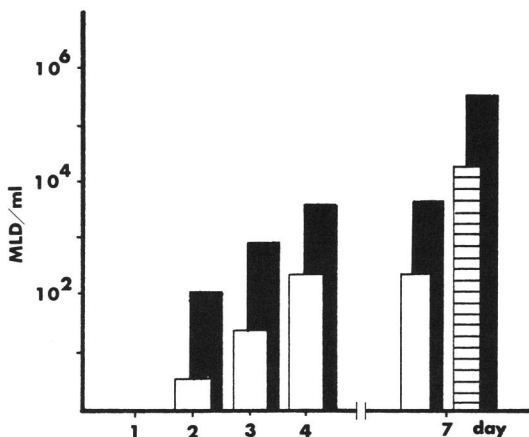


Fig. 3 Toxin production and activation of toxicity by trypsin treatment in *C. botulinum* type G, strain G-2740

The culture was incubated in 50 ml of CMM at 30°C. A portion (2 ml) of the culture fluid was sampled every day, centrifuged and then the toxin titer determined in mice with or without trypsin treatment. Also, the culture was incubated by dialysis tube at 30°C for 7 days to obtain the toxin titer.

- (□); Culture supernatant without trypsin.
- (■); Culture supernatant after trypsin treatment.
- (⊞); Culture supernatant obtained from the dialysis tube without trypsin treatment.

られた。これをトリプシン処理すると、492,000 LD₅₀/ml となった。他の 3 株の透析培養での毒性は、4,000~8,000 MLD/ml であった。しかし、この透析培養の方法は通常の A~F 型菌で行われている方法とは異なり、個々の培養フラスコを嫌気培養しなければならず、また、透析膜の外液に 10 l の培地を用いても得られる毒素液(透析膜の内液)は、100~200 ml のみであり、これを用いて毒素の精製を行うことはできなかった。

3.5.2 毒素投与によるマウスの致死時間と毒力の関係について

A~F 型までのボツリヌス毒素をマウスの静脈内に注射すると、毒素量の対数と致死時間の対数との間に直線関係が成立することがよく知られている¹⁷⁾。

1 群 5 匹のマウスにトリプシン活性化 G 型毒素 10^3 , 10^4 及び 10^5 LD₅₀/ml/ip を静注し、その致死時間を測定した。 10^3 LD₅₀/ml/ip の毒素量を静注したときの致死時間の平均は 172 分であり、 10^4 及び 10^5 LD₅₀/ml/ip の毒素量では、各々、94 分及び 48 分であった。これをグラフに図示すると、Fig. 4 に示した様に、各毒素量の対数と致死時間の対数との間に直線関係が成立した。こ

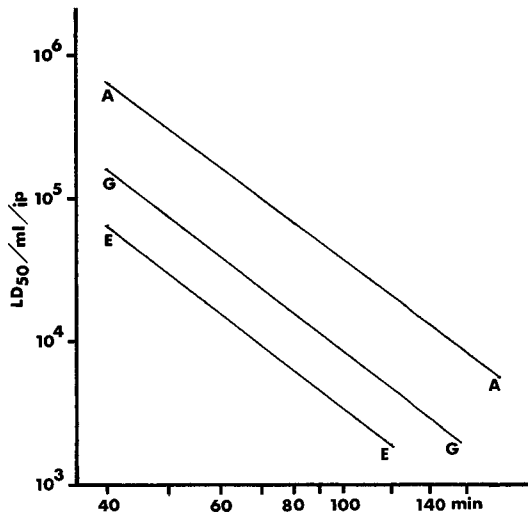


Fig. 4 Relationship between the dose in ip LD_{50} and the time from iv injection to death

の直線の勾配は、A及びE型毒素の直線の勾配と一致し、その座標はA型とE型毒素の中間に位置した。

3.5.3 毒素中和反応

1%ホルマリン処理することにより、G型毒素は4日でトキシイド化された。このトキシイドに対する家兎の抗体産生は良好で、抗毒素血清1mlは約 10^3 MLD/mlのG型毒素を中和した。抗体の中和活性は、4株のG型毒素に対して大きな差異は認められず、また、10

MLD/mlのA~F型毒素を中和しなかった。

3.6 無毒株の分離とファージ

3.6.1 無毒株の分離

AOは、Hirota¹⁹が大腸菌のF因子除去に用いて以来、R因子等のプラスミド除去に対して用いられている。本実験では、この薬剤の変異作用を期待して用いたが、100集落の中から無毒株を分離することはできなかった。NTGは、Mandell及びGreenberg²⁰が細菌の変異剤として報告して以来、種々の変異株の分離に用いられている。本実験では、この薬物の変異作用を期待して用いたが、200集落から無毒株を分離することはできなかった。MCは、特異的にDNA合成を阻害する作用を持ち、テンプレートファージ等を誘発するために用いられている。しかし、MCを作用させても100集落の中から無毒株を分離することはできなかった。更に、UV照射後の100集落及び無処理の100集落を含め、計600集落について毒性を調べたが、無毒株を分離することはできなかった。

3.6.2 ファージ及びファージ様粒子の分離

A~F型までのボツリヌス菌の対数増殖期の培養細胞に、UVあるいはMCを作用させるとファージまたはファージ様粒子が誘発されることはよく知られている²¹。

本実験では、4株のG型菌と4株のハスティホルメ菌の対数増殖期の培養細胞に、UVあるいはMCを作用させたところ、Fig. 5に示した様に、すべての株で溶

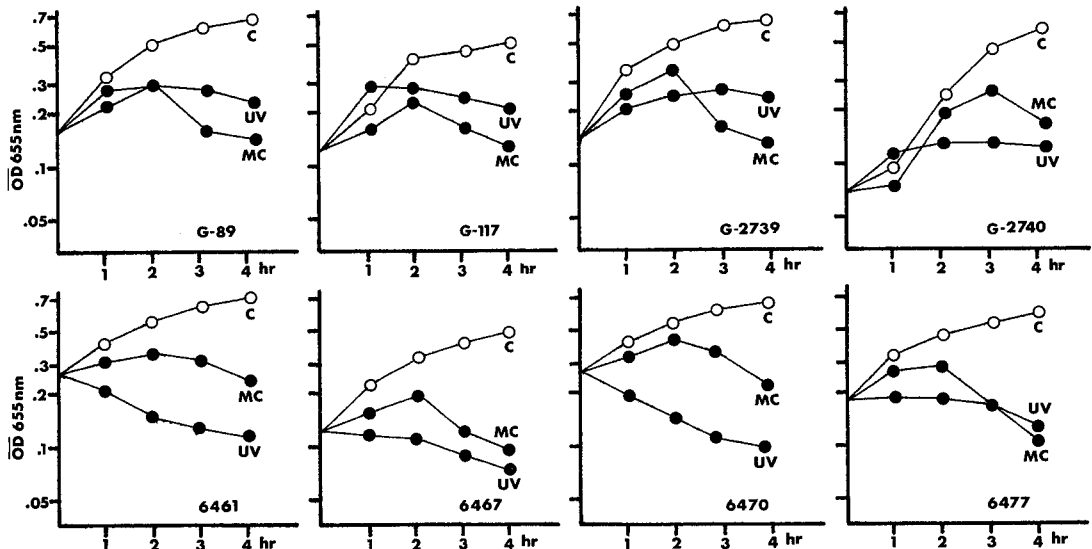


Fig. 5 Changes in the turbidity of *C. botulinum* type G and *C. hastiforme* culture after MC treatment and UV irradiation

The young cultures (50 ml) were treated with MC or UV irradiation. After incubation at 30°C for 1, 2, 3, and 4 hr, each 2 ml was sampled and then the turbidity assayed by photometer with a 655 nm wave length.

菌が認められた。UV については 1.5 分の照射で、また、MC については $1 \mu\text{g/ml}$ の処理により顕著な溶菌がみられた。しかし、UV 照射 45 秒及び 1 分では顕著な溶菌は認められなかった。各々の Induced lysate を電子顕微鏡で観察すると、1 株のハスティホルメ菌 (GAI-6470) のみからは、径約 75 nm の頭部と径約 25 nm、長さ約 160 nm のコアチューブを有する完全なファージ粒子が認められた (Fig. 6)。しかし、この株以外の 4 株の G 型菌と 3 株のハスティホルメ菌からは、GAI-6470 由来ファージ尾部と同様の形及び大きさを有する粒子のみが認められた (Fig. 7)。

3・6・3 毒素産生性のファージ変換

ボツリヌス C 及び D 型菌においては、その毒素産生性はバクテリオファージにより支配されている。

今回、G 型菌より無毒株は得られなかったが、4 株の

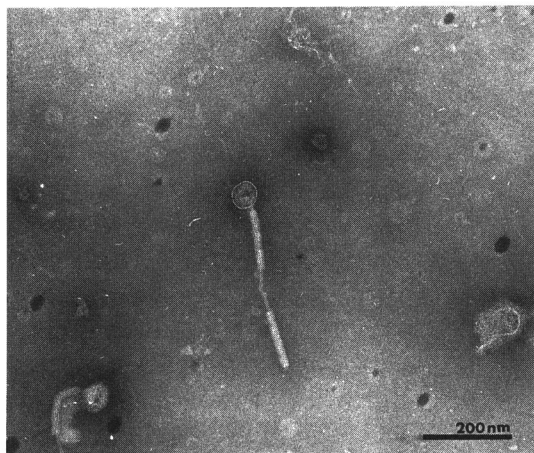


Fig. 6 Bacteriophage in induced lysate of *C. hastiforme*, strain GAI-6470 ($\times 120,000$)

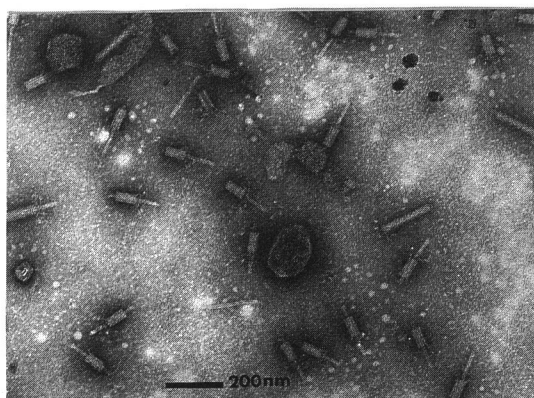


Fig. 7 Bacteriophage-like particles in induced lysate of *C. botulinum* type G, strain G-2740 ($\times 60,000$)

ハスティホルメ菌は G 型菌の無毒変異株とも考えられたので、4 株の G 型菌の MC 誘発液の濾液を作用させた。しかし、いずれの場合においても毒素産生能の伝達は認められなかった。

3・6・4 ファージ様粒子のバクテリオシン活性

緑膿菌におけるピオシン²²⁾、大腸菌におけるコリシン²³⁾あるいは A~F 型までのボツリヌス菌から誘発されるファージ様粒子²⁴⁾については、バクテリオシン活性の存在することが知られている。

G-2740 を MC 処理することによって得られたファージ様粒子を A~F 型までのボツリヌス菌、スポロゲネス菌及びハスティホルメ菌 GAI-6461 の計 8 株に作用させたが、バクテリオシン活性は認められなかった。

4 考 察

G 型菌は、その培養濾液をマウスに接種すると、A~F 型までのボツリヌス毒素を接種したときと同一の症状を呈して死亡することから、これらと共通の薬理作用を示す神経毒を産生すると考えられている。しかし、Ciccarelli ら⁵⁾は、1 株の G 型菌 (G-2740) の生化学的性状を検討したところ、この菌の性状は A~F 型までのボツリヌス菌とは全く異なるものであることを指摘した。この G 型菌の性状は、ハスティホルメ菌の性状に類似していたので、今回、4 株の G 型菌と 4 株のハスティホルメ菌を用いてその性状を詳細に検討した。8 菌株共 A~F 型菌と異なり、レンチナーゼ及びリパーゼを産生せず、また、ブドウ糖を含めた 12 種類の糖質をいずれも分解しなかった。ガスクロマトグラフィーを用いた VFA の詳細な同定結果から 8 株は、1) A, P, iB, B, iV 及び V を産生する株 (G-89, G-117, G-2739, GAI-6470, GAI-6477)、2) A, P, iB, B 及び iV を産生する株 (GAI-6461, GAI-6467)、3) A, iB, B 及び iV を産生する株 (G-2740) の 3 群に分けられた。この VFA の異なりに関しては、今後、菌が新たに分離されたときに注意する必要があると思われる。G 型菌とハスティホルメ菌との相異は、VFA 及び毒素の産生性のみであるので、ハスティホルメ菌は G 型菌の無毒変異株であると考えられた。

G 型菌は、A~F 型菌に用いられている通常の芽胞産生培地では芽胞形成は認められなかった。しかし、CMM に Bact peptone を 2%、NaCl を 0.4% に加えた Tarozzi 培地でのみ豊富な芽胞を形成した。Tarozzi 培地での芽胞形成には 2% Bact peptone と 0.4% NaCl の両方が必須であったが、一度形成された芽胞液を TBYS 培地に接種すると 4 日目 で形成芽胞数が最大

となった。従って、Tarozzi 培地で芽胞形成菌が選択されたものと推察される。

A~F 型菌の毒性株は、UV 照射あるいは MC 処理によってファージあるいはファージ様粒子が誘発される。これらのうち、C 及び D 型菌においては、その毒素産生性がバクテリオファージにより支配されており、有毒株より得られたファージを無毒株に感染させると、これを有毒株へと変換することが知られている²⁰⁾。また、B, C, D, E 及び F 型菌の UV 処理溶菌液が B, E 型菌とスポロゲネス菌の特定の菌株に対してバクテリオシン活性を示すことも報告されている。本実験では、4 株の G 型菌と 4 株のハスティホルメ菌の計 8 株が、A~F 型菌と同様に、UV 照射あるいは MC 処理によって溶菌され、その溶菌液中にはバクテリオファージあるいはファージ尾部様粒子が産生されることを初めて確認した。しかし、これらの粒子を含む溶菌液は A~F 型までのボツリヌス菌、スポロゲネス菌及びハスティホルメ菌に対し、バクテリオシン活性を示さなかった。また、この溶菌液を無毒のハスティホルメ菌に作用させても、毒素産生性の伝達は認められなかった。逆に、無毒のハスティホルメ菌より完全な形のファージが得られたので、G 型菌の毒素産生性はファージとは関係がないものと推察された。

A~F 型菌と異なり、G 型菌の毒素産生量が少ないため、今回は、精製毒素を得ることは困難であったが、今後更に、大量の毒素産生方法を検討したい。

5 結 論

本研究では、4 株の *C. botulinum* type G と 4 株の *C. hastiforme* を用い、以下の結果を得た。

1) 細菌学的特性及び生化学的性状

G 型菌は、レンチナーゼ及びリパーゼを産生せず、ブドウ糖を含めた 12 種類の糖質をいずれも分解しないため、A~F 型菌とは性状が著しく異なっていた。これらの性状は毒素と VFA の産生性を除き、ハスティホルメ菌と全く一致したので、ハスティホルメ菌は G 型菌の無毒変異株であることが示唆された。また、これら 8 株は VFA の産生パターンから 3 群に分けられた。

2) 芽 胞

G 型菌は、通常の芽胞産生培地での芽胞形成は悪いが、CMM に Bact peptone を 2%、NaCl を 0.4% に加えた Tarozzi 培地で、 10^7-10^8 個/ml の芽胞を形成した。また、TBYS 培地に NaCl を 0.4% に加えた TBYS 培地 1 l から、total 2.4×10^{11} 個の精製芽胞が得られ、この芽胞は $2 \times 1 \mu$ の大きさであった。

3) 毒 素

G 型菌は A~F 型菌とは異なり、通常用いられている毒素産生培地での毒素産生量は少なかった。特殊な透析培養法により、少量の高力価の毒素が得られた。また、Time to Death Test では A 型と E 型の中間に位置する直線を形成した。

4) ファージ及びファージ様粒子

G 型菌とハスティホルメ菌は、UV 照射あるいは MC 処理によって溶菌を示し、その溶菌液中にはバクテリオファージあるいはファージ尾部様粒子が産生されることを初めて確認した。しかし、これらの粒子を含む溶菌液は、バクテリオシン活性を示さなかった。G 型菌の無毒変異株と考えられるハスティホルメ菌から完全な形のファージが得られたので、G 型菌の毒素産生性はファージにより支配されていないことが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました北海道大学飯田広夫名誉教授及び本学微生物学講座小熊恵二教授に深謝致します。また、種々、御協力を頂いた北海道立衛生研究所の研究員、更に、菌株の分与を受けた CDC の V. R. Dowell 博士、FDA の D. A. Kautter 博士、岐阜大学上野一恵教授に感謝致します。

本論文のうち、ボツリヌス G 型菌とハスティホルメ菌のファージに関することについては道衛研所報 35, 80-82 (1985). に報告した。

文 献

1. 小熊恵二：ボツリヌス毒素、三輪谷俊夫監集：医学細菌学 1 巻, 211-247, 採根出版, 東京 (1986).
2. 神沢謙三：Clostridium botulinum type E の生態学的研究。道衛研所報 11, 1-39 (1954).
3. Gimenez, D. F. and Ciccarelli, A. S.: Another type of Clostridium botulinum. Zentralbl. Bakteriologie 215, 221-224 (1970).
4. Sonnabend, O., Sonnabend, W., Heinzle, R., Dirnhofer, R. and Krech, U.: Isolation of Clostridium botulinum type G and identification of type G botulinum toxin in humans. J. Infect. Dis. 143, 22-27 (1981).
5. Ciccarelli, A. S., Whaley, D. N., McCroskey, L. M., Gimenez, D. F., Dowell, V. R. and Hathway, C. L.: Cultural and physiological characteristics of Clostridium botulinum type G and the susceptibility of certain animals to its toxin. Appl.

- Environ. Microbiol. **34**, 843-848 (1977).
6. 上野一恵: 嫌気性菌の同定検査法. 鈴木祥一郎, 上野一恵編集: 臨床嫌気性菌マニュアル, 49-54, 日本製薬, 東京 (1970).
 7. 渡辺邦友: バクテロイデスその他の無芽胞嫌気性菌. メディヤサークル **23**, 183-191 (1978).
 8. Brown, W. L., Ordal, Z. J. and Halvorson, H. O.: Production and cleaning of spores of putrefactive anaerobe 3679. Appl. Microbiol. **5**, 156-159 (1957).
 9. Lilly, T. Jr., Harmon, S. M., Kautter, D. A., Solomon, H. M. and Lynt, R. K.: An improved medium for detection of *Clostridium botulinum* type E. J. Milk Food. Technol. **34**, 492-497 (1971).
 10. Joao, C. O. Tortora.: Alternative medium for *Clostridium perfringens* sporulation. Appl. Environ. Microbiol. **47**, 1172-1174 (1984).
 11. Briozzo, J., Lagarde, E. A., Chirife, J. and Parada, J.: Effect of water activity and pH on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type G. Appl. Environ. Microbiol. **51**, 844-848 (1985).
 12. 遠山祐三: 大腸菌群最確数 (M. P. N.) の算出法. 遠山祐三, 川城 巖, 金原松次, 松井武夫編集: 食品衛生ハンドブック, 120-122, 朝倉書店, 東京 (1957).
 13. 大隅正子: 走査電子顕微鏡の応用(26) 酵母細胞. 田中係一, 永谷 隆編集: 走査電子顕微鏡, 266-267, 朝倉書店, 東京 (1982).
 14. 飯田広夫: 昭和32年北海道に発生した4件のいづしによるボツリヌス E 型中毒について. 道衛研所報 **10**, 19-30 (1958).
 15. Ciccarelli, A. S. and Gimenez, D. F.: Cryoprotein produced by *Clostridium botulinum* type G. Infect. Immun. **5**, 985-986 (1972).
 16. Lewis, G. E., Kulinski, S. S., Reichard, D. W. and Metzger, J. F.: Detection of *Clostridium botulinum* type G toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. Appl. Environ. Microbiol. **42**, 1018-1021 (1981).
 17. Sakaguchi, G., Sakaguchi, S. and Kondo, H.: Rapid bioassay for *Clostridium botulinum* type E toxins by intravenous injection into mice. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **22**, 369-376 (1968).
 18. Oguma, K., Iida, H. and Inoue, K.: Observations on nonconverting phage C-n71, obtained from nontoxicogenic strain of *Clostridium botulinum* type C. Jpn. J. Microbiol. **19**, 167-172 (1975).
 19. Hirota, Y. and Iijima, T.: Acriflavine as an effective agent for eliminating F factor in *Escherichia coli*. Nature **180**, 655-661 (1957).
 20. Mandell, J. D. and Greenberg, J.: A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Research Comm. **3**, 575-577 (1960).
 21. Inoue, K. and Iida, H.: Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. J. Virol. **2**, 537-540 (1968).
 22. Ishii, Y., Nishi, Y. and Egami, F.: The fine structure of pyosin. J. Mol. Biol. **13**, 428-431 (1965).
 23. Endo, H., Ayabe, K., Amako, K. and Takeya, K.: Inducible phages of *Escherichia coli* 15. Virology **25**, 469-471 (1965).
 24. Inoue, K. and Iida, H.: Inducible bacteriophages in *Clostridium botulinum*. Proceedings of the First U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms. 416-426 (1968).
 25. Oguma, K., Iida, H., Shiozaki, M. and Inoue, K.: Antigenicity of converting phages obtained from *Clostridium botulinum* types C and D. Infect. Immun. **13**, 855-860 (1975).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市北区北19条西12丁目

北海道立衛生研究所疫学部細菌科 武士甲一