

### 3 ボトリヌスE型菌の発育と毒素産生 に及ぼす好気性菌群の影響について

Studies on the Effects of aerobic Bacteria on the Growth and  
Toxin Production of *Clostridium botulinum Type E*

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)  
技師 唐島田 隆  
技師 井上 勝 弘

#### I 緒 論

昭和 26 年以来毎年のように北海道及び東北に発生をみているボトリヌス中毒は、いずれもその原因は「いずし」を摂取することによつて発生している<sup>1-4)</sup>。われわれはこの中毒防止に関する実験的研究に着手し、さきに唐島田ら<sup>5)</sup>は実際に「いずし」を漬け、これにボトリヌスE型菌(以下「ボE菌」と略称す)芽胞を接種して毒素産生の状況を観察した。

その結果、「いずし」の製造過程で毒素の産生されるのは魚肉の水晒し中と漬物の熟成中の二つの時期が考えられることを明らかにした。このうち水晒しの時の毒素産生は5°C以下の低温で行うことによつてこれを防止することが可能であつた。一方、熟成中の毒素産生には極めて複雑な因子が関与することが考えられるのでこの間における毒素産生防止は更に詳細な検討が必要である。われわれはこの因子の一つとして微生物の作用を考えた。

元来、「いずし」は生魚、こうじ及び野菜等を原料とし煮熟、焙焼等加熱処理を受けない一種の漬物であり、これら原料に由来する微生物や「いずし」の醗酵に関与する微生物が多く存在し「いずし」特有の風味を作る一方、ボE菌の発育や毒素産生に極めて深い関係を有するであろうことは推定に難くない。これら種々の菌には「いずし」中においてボE菌の発育や毒素産生を助長するものあるいは逆に阻制的に作用して、ボ菌芽胞が存在しているにもかかわらず発育や毒素産生が見られない結果を生ずる場合もあろう。実際に前記実験において同様な製造過程を経て作られたボE菌芽胞接種「いずし」が一つは強い毒素を産生したが、他方は全く毒素を証明しなかつた例を経験した。このことが必ずしもその「いずし」中の微生物群の動向のみに左右されたとはいえないが、その可能性は考えられる。故に熟成中の毒素産生の機構を検討するには「いずし」中の微生物とボ菌との関係を明らかにする必要がある。

このような点について検討した例はすでに先人のいくつかの報告に見ることができる。すなわち、阻制的に作用するもの

- 1 Sherman<sup>6)</sup>は Infusion Broth にボ A 菌毒素を混ぜ、これに腸内細菌である *B. coli*, *B. aerogenes* 及び *Proteus vulgaris* を植えて 20°C に 2 週間おいた処、無毒化したことを報告している。
- 2 Edmondson<sup>7)</sup> は生乳中にボ菌芽胞を入れても有毒化しないが、殺菌乳では有毒化することをみとめ、これは生乳中に乳酸が生ずるためであると報告した。
- 3 Mahmoud と Ordal<sup>8)</sup> は *Streptococcus lactis* X 13 株が “Precooked frozen food” に附着せしめたボ A 菌の発育を抑制し、従つて毒素産生を阻止することを証明したが、実用化には更に検討を要するという。

助長的に作用するもの

- 1 江原, 大河原<sup>9)</sup>はボA菌及びB菌各々1株と納豆生成菌とを液体培地及び蒸煮大豆に接種し, 好氣的に培養した。ボ菌は単独では発育しないが, 納豆菌を共生せしめると発育して毒素を産生し得ることを認めた。
- 2 Quortrup<sup>10)</sup>はアメリカの Western Duck Sickness の研究において家鴨の腸内に広く分布している *Pseudomonas aeruginosa* がボC菌の発育を助長することを明かにした。これはこの菌が大量の酸素を消費しアルカリを産生する能力を有するためであることがわかった。
- 3 阪口<sup>11)</sup>は秋田県に発生した中毒の原因となつた「いずし」より *Clostridium* に属する No. 13 なる1菌株の酵素様作用によつてボE菌毒素が特異的に増強されることを報告している。

以上の文献についてみるに, 他の菌がボ菌に作用する場合は助長的にせよ, 阻止的にせよ二つある。即ち一つは培地の酸素含量, pH等に変化を与えることによつてボ菌の発育に影響を及ぼす場合と他は酵素的作用等によつて既に出来た毒素を増強乃至は破壊する場合である。菌によつてはいずれか一方のみを有するものもあるであろうし, 両方の作用を持つものもあろう。

われわれは前記のような見解からボE菌岩内株の発育及び毒素産生に対する種々の菌の影響を調べるため, 先づ当研究所保存の好気性菌 15 株の作用を観察し, うち二, 三の菌株については比較的詳細にその作用機構を調べ少しく知見を得たので報告する。

## II 実験材料及び方法

### 1 使用菌株

*Clostridium botulinum* type E strain Iwanai, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 0—102, *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter cloacae*, *Proteus* sp. (以上衛研), *Serratia marcescens* (カニ罐より分離), *Achromobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens* (北大応菌), *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium* (衛研), *Bacillus mesentericus* (北大応菌), *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* (雪印乳業), *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (餛より分離)。

### 2 使用培地

Polypeptone (武田) 1.0%, 肉エキス (極東) 0.5%, NaCl 0.3%を基本培地とし一部は Sucrose を0.5%に加えた。また必要に応じては一部肝タブイオンを使用した。

### 3 培養方法

前記培地をそれぞれ大試験管に約 50cc ずつ分注し, 岩内株芽胞約 1,000 個と各菌株の1白金耳を同時に接種し, 特に嫌氣的操作を加えることなく 37°C に培養した。

### 4 菌の発育及び毒性試験

混合培養のボ菌の発育は顕微鏡による検鏡及び Sucrose の醗酵によるガス産生 (供試菌株のうち *A. aerogenes*, *A. cloacae* を除いてはすべて Sucrose を醗酵せず, ボ菌のみこれを醗酵してガスを産生する) の有無により判定した。毒性は培養濾液 0.5cc をマウスの腹腔内に注射し定型的な症状を呈して斃死するかどうかによつて判定した。

### 5 pH, 揮発性脂肪酸及び揮発性塩基性窒素の測定

pH はガラス電極 (東京理化学工業 K.K. 製) により, 揮発性脂肪酸は試料 20cc をとり, 常法に従つて水蒸気蒸溜し N/10 苛性ソーダで滴定した。揮発性塩基性窒素は Conway の微量拡散法によつた。

## 6 供試菌株の Proteinase 産生能の測定

10% 大豆浸出液に Polypeptone 1%, Glucose 0.5% 及び Yeast Extract 0.5% を加えた培地を用いて 37°C 48~72 時間静置法により培養し、この培養液を遠沈し上清液を供試粗酵素液とした。Proteinase の測定法は Fuld-Gross 法に準じた。この 1 単位は 40°C 1 時間に Casein 溶液 1 cc を完全に酢酸酒精液に可溶性化する酵素力である。

## ■ 実験結果

### 実験 1 普通ブイヨンによる混合培養

ボ E 菌芽胞と好気性菌群 15 株とを普通ブイヨンに同時に植えて、37°C で混合培養した結果は第 1 表に示す通りで、ボ E 菌芽胞は乳酸菌群以外の菌と共存した場合、発芽はするが殆んど発育は見られない (但し、*Bacillus* 属の菌はボ菌と形態が類似しているので証明できなかつた)。又、毒素の産生も培養 6 日後でも認められなかつた。

第 1 表 普通ブイヨンによる混合培養

	発 芽	ガ ス 産 生	毒 素 (M.L.D.)
<i>Escherichia coli</i> 1	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0-102	+	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+	-	-
<i>Aerobacter cloacae</i>	+	-	-
<i>Proteus sp.</i>	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-
<i>Achromobacter sp.</i>	+	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	?	-	-
<i>Bacillus megatherium</i>	?	-	-
<i>Bacillus mesentericus</i>	?	-	-
<i>Streptococcus lactis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-

### 実験 2 サツカロースブイヨンによる混合培養

前記同様にサツカロースブイヨンで混合培養した結果は第 2 表に示すように、ボ E 菌は *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* 及び *Streptococcus faecalis* 等と共生した場合にはガスを産生して旺盛に発育し、培養 6 日目の毒力は 20~2,000 M.L.D. を示した。これに反し、*Aerobacter*, *Achromobacter* 及び *Streptococcus lactis* と共存すると発育するが、毒素の産生はなかつた。また、*Streptococcus cremoris* 及び *Staphylococcus aureus* と共存すると発育は勿論、毒素産生も全く見られなかつた。

### 実験 3 サツカロースブイヨンにボ E 菌と *B. subtilis*, *E. coli*, *Ser. marcescens* と *Staph. aureus*

とを混合培養せる時の pH, 揮発性脂肪酸及び揮発性塩基性窒素の消長

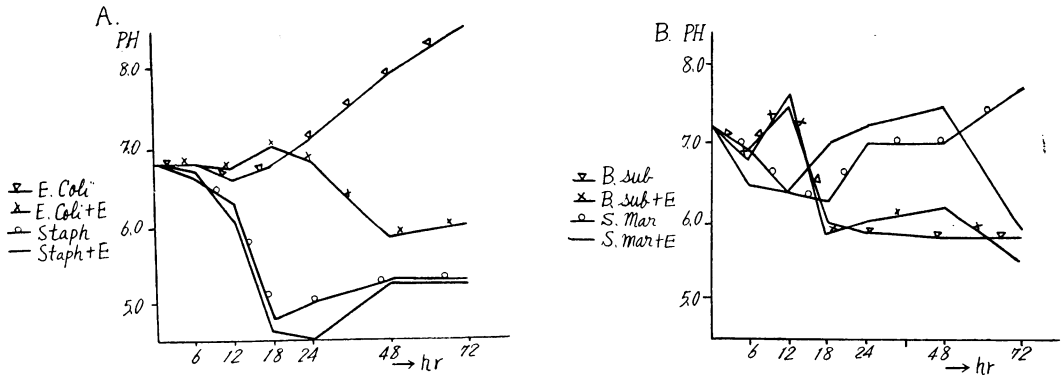
第2表 サツカロースブイヨンによる混合培養

	発 芽	ガ ス 産 生	毒 素 (M.L.D.)
<i>Escherichia coli</i> 1	+	++	200
<i>Escherichia coli</i> 0-102	+	++	200
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+	++	—
<i>Aerobacter cloacae</i>	+	++	—
<i>Proteus sp.</i>	+	++	200
<i>Serratia marcescens</i>	+	++	2,000
<i>Achromobacter sp.</i>	+	++	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	++	200
<i>Bacillus subtilis</i>	?	++	2,000
<i>Bacillus megatherium</i>	?	++	200
<i>Bacillus mesentericus</i>	?	++	200
<i>Streptococcus lactis</i>	+	+	—
<i>Streptococcus cremoris</i>	—	+	—
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	++	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—

実験方法は前記の通りで、経時的に pH, 揮発性脂肪酸及び揮発性塩基性窒素を測定した。

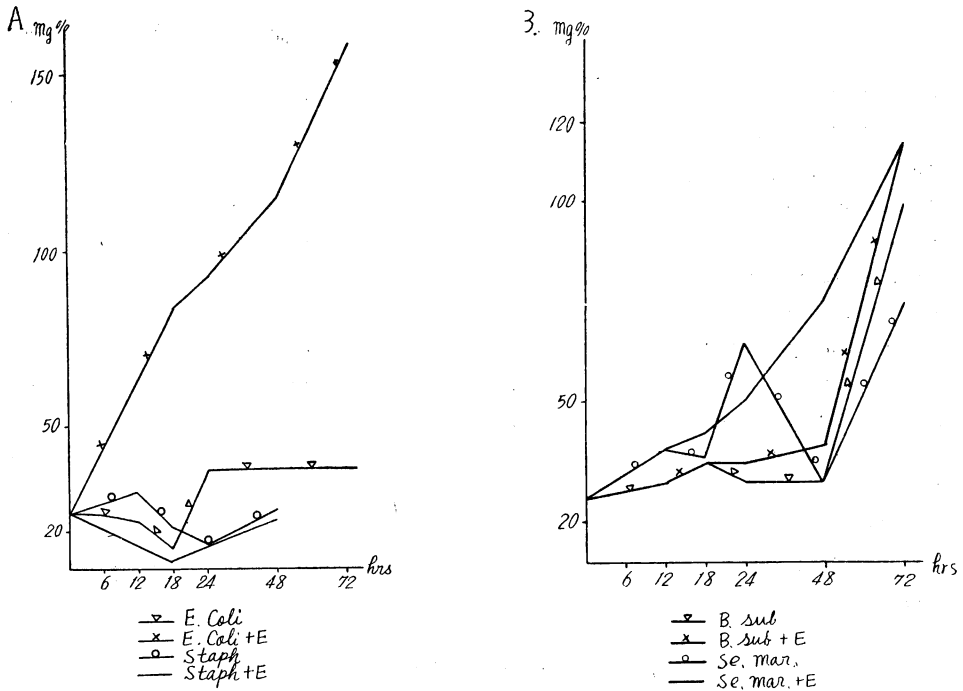
**pH** *E. coli* 及び *Ser. marcescens* 等サツカロース非分解の菌は単独では培地の pH をアルカリ側に転ぜしめるが、ボE菌と共存するとボ菌の発育につれて培地は酸性側に傾く。*Staph. aureus* ではそれが単独であろうと、ボE菌と共存しようと pH の趨移は著しい差がなく培養 18 時間で急激に培地の pH を酸性とする。また *B. subtilis* でははじめは平行しているが、培養 48 時間目では混合培養のものが *B. subtilis* 単独のものに比べてややアルカリ側にあるが、72 時間後には逆になった。また、単独では *Staph. aureus* も *B. subtilis* も培地の pH を酸性側に転ぜしめるが、培養 18 時間後に前者は 4.6, 後者は 5.8 でその程度に著しい差がある。(第 1 図参照)

第 1 図 pH の 変 化



**揮発性脂肪酸** ボ菌が発育すると極めて多量の酪酸のような有機酸を蓄積することが知られている。この実験においても、第 2 図に示すようにボE菌が発育した *E. coli*, *B. subtilis* 及び *Ser. marcescens* との混合培養では揮発性脂肪酸量は多く、発育のみられなかつた *Staph. aureus* との混合培養では少なかつた。

第2図 揮発性脂肪酸の消長



揮発性塩基性窒素 いずれの場合も培養初期から後期にかけて著しい増減は認められなかつた。

実験4 肝タピオンによるボE菌と *B. subtilis* 及び *Staph. aureus* との混合培養

肝タピオンを用い同じ方法で混合培養を行い経時的に毒力を調べた。その結果は第3表に示す

第3表 肝タピオンによるボE菌と *B. subtilis* 及び *Staph. aureus* との混合培養

	時 間	毒 力			
		原	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
<i>B. subtilis</i> との混合培養	12	● ○	○ ○		
	18	● ●	● ●		
	36		● ●	● ●	
	60		● ●	● ●	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○
<i>Staph. aureus</i> との混合培養	12	● ●	○ ○		
	18	● ●	● ●		
	36		● ●	● ○	
	60		● ●	○ ○	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○
ボE菌のみの培養 (対照)	12	○ ○	○ ○		
	18	● ●	○ ○		
	36		● ●	● ○	
	60		● ●	○ ○	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○

註 ●はマウスの斃死, ○はマウスの生存を示す。

通りで、*B. subtilis* との混合培養は 36 時間後に 200M.L.D. に達するが、*Staph. aureus* との混合培養やボ E 菌単独培養では毒力はやや低い。また *Staph. aureus* との混合培養とボ E 菌の単独培養には著しい差異はなかつた。肝タブイオンを用いた場合には *Staph. aureus* の発育による培地の pH の低下はあまり著明ではなく、この点からサツカロースブイオンで *Staph. aureus* が共存するとボ E 菌が発育出来ず、従つて毒素の産生もないのは実験 3 で示されるように *Staph. aureus* がこの培地の pH を急激に酸性とするためと考えられる。そこで一旦 *Staph. aureus* が発育して酸性となつたサツカロースブイオンを 100°C 30 分間加熱滅菌した後、4% 苛性ソーダ液で中性に修正しボ E 菌を植えたところ発育して毒素を産生した。

実験 5 好気性菌の発育に伴う培地の酸化還元電位の低下

細菌の発育により培地の酸化還元電位が低下して好気的な条件下においても嫌気性菌の発育が可能となることは既に知られている。

われわれは *Staph. aureus*, *E. coli* 及び *B. subtilis* の酸化還元電位低下作用を調べた。サツカロースブイオンに酸化還元電位指示薬であるレサズリンを加え、これに上記の 3 菌株をそれぞれ単独及びボ E 菌と混ぜて 37°C に培養し経時的に褪色状況を観察した。その結果は単独の場合も、混合培養の場合も同じで、早いものでは 12 時間、おそくも 24 時間でレサズリンを完全に褪色した (第 4 表参照)。このことは電位が -0.05 volt 以下になつたことを示し、この電位ではボ E 菌の発芽発育は充分に行われる。

第 4 表 好気性菌の発育に伴う酸化還元電位の低下

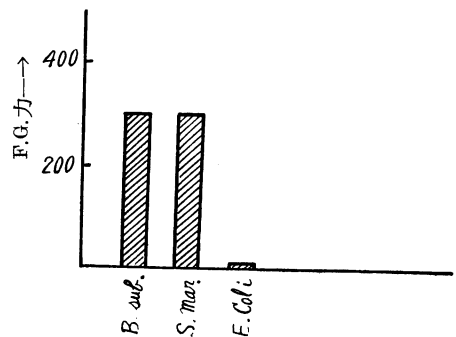
菌種 時間	<i>E. coli</i> +ボ E 菌			<i>B. sub.</i> +ボ E 菌			<i>Staph. aureus</i> +ボ E 菌		
	pH	色素の 変化	菌の発育 (ガス産生)	pH	色素の 変化	菌の発育 (ガス産生)	pH	色素の 変化	菌の発育 (ガス産生)
3	—	変化なし	—	—	変化なし	—	—	—	—
6	7.8	僅かに褪色 殆んど褪色	濁濁	7.90	殆んど変化 なし	—	7.3	僅かに褪色	僅かに濁濁
12	7.7	表面のみ少 し赤色	濁濁 ガス—	7.50	”	僅かに濁濁	5.0	完全に褪色	濁濁 ガス—
24	7.5	完全に褪色	濁濁 ガス+	4.80	完全に褪色	ガス+	5.0	”	”
48	7.7	表面にやや 赤味	”	5.15	表面にやや 赤色	皮膜及び沈 渣ガス+	5.0	”	”

実験 6 *B. subtilis* の Proteinase によるボ菌毒素の活性化

トリブシン<sup>12)</sup>やある *Clostridium* 属菌の産生する酵素様物質<sup>11)</sup> がボ E 菌毒素を活性化することが知られている。実験 2 の結果から *B. subtilis*, *Ser. marcescens* の混合培養が *E. coli* の混合培養より著しく強い毒力を示したのは *B. subtilis* 及び *Ser. marcescens* の Proteinase の作用によることが考えられるので、以下のような実験を行つた。

実験方法 9 によつて *B. subtilis*, *Ser. marcescens* 及

第 3 図 *B. subtilis*, *Se. marcescens* 及び *E. coli* 培養濾液の Proteinase の比較



び *E. coli* の Proteinase を測定した結果は第 3 図の通りで、これら一連の実験に用いた *B. subtilis* 及び *Ser. marcescens* の Proteinase は著しく強いことが判る。

次に *B. subtilis* の 48 時間培養から得た粗酵素液を、ポ E 菌の 24 時間培養の若い菌体を Sørensen 緩衝液 (pH 6.4) に懸濁したものに 37°C で 1 時間作用せしめ毒力が増強されるかどうかをみた。この結果は第 5 表の通りであつてマウスの症状の発現も早く毒力も強くなつた。

第 5 表 *B. subtilis* の Proteinase による毒素の活性化

注 射 後	毒 素	×5	×10	×50	×100
4 時 間	作用させたもの	● ●	● ●	● ●	○ ○
	対 照	● ●	○ ○	○ ○	○ ○
1 週 間	作用させたもの	● ●	● ●	● ●	● ●
	対 照	● ●	● ●	● ●	○ ○

#### IV 考 察

以上の実験結果より二、三の考察を加える。

第 1 に普通ブイヨンのような酸化還元電位の不安定な培地においてポ E 菌は発芽しても増殖出来ないが、これに好気性菌を共生せしめると好氣的条件下でも増殖出来るような電位を保つことが出来る。しかし単にこの条件が満足されたのみでは不充分で、ポ E 菌が増殖し毒素を産生しうするには実験 2 に用いたサツカロースブイヨンのようにエネルギー源として炭水化物の添加が必要である。しかしこの際、共生する好気性菌がこの添加した炭水化物を分解して急激に酸を産生するような菌種であると、培地の pH が速かに酸性になるため電位がポ菌の発育に適當であつても最早ポ菌は増殖し得ない (*Staph. aureus* との共生の例)。これに反してこの炭水化物を利用し得ない菌や酸の産生の弱い菌 (*B. subtilis* の例) では、ポ E 菌の発育を阻止する pH に至る前に培地の電位が低下安定するのでポ E 菌は増殖して毒素を産生すると考えられる。このような現象は「いづし」の熟成の経過中にも考えられることであつて、「いづし」中の毒素産生防止に示唆を与えるものと思われる。既に神沢、飯田<sup>13)</sup>は「いづし」の作成に際して種々の乳酸菌を用い「いづし」の pH を速かに低下せしめることによつてポ E 菌の毒素産生を抑制しうることを報告している。

また「いづし」は北海道及び東北の一部において賞用される独得の食品であるが、これに似たものに近江の「鮎ずし」があり、この醗酵に関与する菌として *Lactobacillus plantarum* と *Lactobacillus pentaceticum* が知られている<sup>14)</sup>。われわれも目下「いづし」より乳酸菌を分離して諸性状、特にポ E 菌に対する作用を検討している。

第 2 にポ E 菌の増殖、毒素産生を助長する菌の作用機序についてみるとこれには二通りが考えられる。すなわち単に培地の電位を低下安定せしめてポ E 菌の増殖毒素産生を可能ならしめるものと、更に進んで産生された毒素を増強するものとのである。前者の例としては *E. coli*、後者の例としては *B. subtilis* 及び *Ser. marcescens* を挙げる事ができる。すなわち *E. coli* は実験 2 及び 5 に示されるように培地の電位を低下安定ならしめてポ E 菌の増殖及び毒素産生を助長するが、一旦産生さ

れた毒素を増強する Proteinase 作用は認められない。これに反して *B. subtilis* 及び *Ser. marcescens* はこの両作用を併せ持つことが実験 2, 5 及び 6 から推測し得る。なお細菌の Proteinase 活性とボ E 菌毒素増強作用との関連性については目下更に検討中である。

第 3 に実験 6 によつてわれわれは *B. subtilis* の培養濾液がボ E 菌の若い菌体に働いて著しく毒素を増強させることを見出した。現在トリプシン等の Proteinase によつて同じくボ E 菌の毒素が活性化されることが明かにされており、本実験における *B. subtilis* や *Ser. marcescens* の毒素増強作用もこれらの菌の Proteinase によるものと推定される。しかしながら実験 2 及び 4 においてボ E 菌と *B. subtilis* を共生せしめた場合、サツカロースブイオンではその増強作用が顕著であつたが、肝タブイオンにおいてはそれ程著明な差異が見られなかつた。このことはボ E 菌毒素と種々の Proteinase との間の作用機序について更に多くの複雑な因子がこれに関与することを示唆するものと思われ、今後の実験によつてこの点を明かにしたいと考える。

## Ⅴ 結 論

われわれは「いずし」中にボ E 菌芽胞が存在するとき、その発育及び毒素産生に関与する因子のひとつとして種々の微生物の作用を考え、当研究所保存の好気性菌 15 株を用いてボ E 菌岩内株に及ぼす影響を調べ、次のような知見を得た。

- 1 普通ブイオンにおいてボ E 菌芽胞は乳酸菌以外の菌と共生すると発芽はするが増殖はし得ない。これに Sucrose を添加すると *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* 及び *Streptococcus faecalis* と共生した場合には発育して毒素を産生する。しかし *Staph. aureus* 及び *Streptococcus cremoris* と共生した場合には発育も毒素産生も認められない。また *Aerobacter*, *Achromobacter* 及び *Streptococcus lactis* と共生した場合には発育はするが毒素の産生は見られない。
- 2 *Staph. aureus* の阻止作用はこの菌が Sucrose を分解して酸を産生し、短時間で培地の pH をボ E 菌の発育可能以下に低下せしめるためであると考えられる。
- 3 *E. coli* の助長作用は培地の酸化還元電位を低下安定させると共に培地の pH をアルカリにするためであると考えられる。また *B. subtilis* と *Ser. marcescens* は更に進んで産生されたボ E 菌毒素を自己の Proteinase によつて増強するものと考えられる。

撰筆に当り、御校閲を賜つた中村所長、御指導、御助言下さつた飯田疫学科長に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 中村豊, 飯田広夫他: 本誌, 特報 3, 1~37 (1954)
- 2) 斎藤精一郎他: 秋田県医師会雑誌 6, 26 (1953)
- 3) 飯田広夫, 栗城篤治他: 本誌 7, 57 (1955)
- 4) 飯田広夫, 唐島田隆他: 本誌, 特報 5, 32 (1956)
- 5) 唐島田隆他: 本誌, 特号 5, 17 (1956)
- 6) Sherman, I. M. et al: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 24, 546 (1926)
- 7) Edmondson, R. B. et al: Am. Food. J., 18, 143 (1923)
- 8) Mahmoud, A. S. et al: Food Research 20, 332 (1955)



- 9) 江原勇藏, 大河原真雄: 糧食研究 198, 16 (1943)
- 10) E. R. Quortrup et al: J. Bact. 45, 55 (1943)
- 11) G. Sakaguchi et al: Jap. J. Med. Scien. & Biol. 8, 247 (1955)
- 12) James T. D. et al: J. Bact. 72, No. 4 (1956)
- 13) 神沢謙三, 飯田広夫: 本誌 8, 33~38 (1957)
- 14) 宮路憲二: 応用微生物学, 上卷, 371 (1949)