

4 E型ボトリヌス菌の増殖並びに毒素産生におよぼす好気性菌の影響

4 Studies on the effects of several 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

第1章 緒 言

ボトリヌス中毒症“Botulism”はヨーロッパにおいて古くから注目されていたが、まずドイツにおいて1735年に観察され、Kerner (1820, 1822) は Württemberg で1793年以降に発生した患者数は174名に達することを記載している。これらのドイツにおける病例の原因食品としては本疾患に対する命名の由来が *botulus* (L) となつたように主としてソーセージがあげられている。

しかしながらボトリヌス中毒を原因学的に確立したのは Van Ermengem である。氏は1894年ベルギーの Ellezeles に発生した食中毒を検索した際、その原因食品となつたハム並びに死亡者の脾臓と腸内容から一種の偏性嫌気性菌を分離し、この菌の培養濾液を種々の実験動物に注射すると人のボトリヌス中毒と全く同じ症候群を惹起してこれらを斃死せしめることを観察し、該菌に対して *Bacillus botulinus* なる最初の命名を行つた。

その後ボトリヌス中毒およびその原因菌である *Clostridium botulinum* に関する研究はアメリカの Dickson, Meyer 等の広範な研究によつて著しく発展し、本中毒が文明世界の到る処に発生していることおよび本菌が広く全世界の土壤に分布していることが明らかにされた。

この *Clostridium botulinum* はその産生する毒素の免疫学的性状によつて現在5つの型に分類され、それぞれ *Clostridium botulinum* Type A, B, C (Ca, Cβ), D および E と呼ばれている。このうち人に中毒を起すものはA型、B型およびE型の3種のみで、C型は主として鳥類に、D型は主として家畜に中毒を起すことが明らかになつた。

最近に至るまでわが国にはボトリヌス中毒の報告は皆無であり、土壤中のボトリヌス芽菌胞検索成績からも一応本菌の存在は否定される状況にあつた。しかしながら中村、飯田、佐伯 (1952) は1951年5月、北海道岩内郡島野村において4名の死亡者を出した鯀の「いずし」による食中毒例を検索した結果、遂にこの原因食品中より *Clostridium botulinum* Type E の毒素および菌を検出し、わが国最初のボトリヌス中毒例を発見するに至つた。その後、北海道においては毎年のようにボトリヌス中毒例が発生し、各中毒例については中村、飯田、神沢、唐島田 (1956)、飯田、中村、中川、唐島田 (1958)、飯田、唐島田、斎藤 (1961) が詳

細な調査報告を行つている。これらの報告によると、1951年から、1960年に至るまでの10年間に北海道においては20回のE型ボトリヌス中毒が発生しており発病者は140名、うち死亡者39名に達する状況である。その個々の発生例についての主要な点は第1表に示した通りである。

第1表 北海道に発生したE型ボトリヌス中毒例 (1951—1960)

番 号	発生年月		発 生 地	原 因 食 品	摂 取 者	患 者	死 亡 者
	年	月					
1	1951	5	岩内郡島野村	鯀のいずし	24	14	4
2	1952	11	紋別郡興部村	鯀のいずし	8	4	0
3	"	12	網走郡女満別町	鯀およびウグイのいずし	7	5	2
4	1953	10	常呂郡佐呂間町	鯀のいずし	12	5	1
5	1954	8	網走市	鯀のいずし	7	5	1
6	"	12	白糠郡音別村	ハタハタのいずし	3	2	1
7	1955	7	北見市上常呂	鱒のすじこ	2	2	1
8	"	10	小樽市	鯖のいずし	7	5	1
9	"	10	原田郡望来	鮭のいずし	32	11	2
10	"	11	亀田郡神山	サンマのいずし	4	3	3
11	1956	9	釧路市別保	ヤマベのいずし	16	12	3
12	"	10	亀田郡銭亀沢村	ハタハタのいずし	33	11	4
13	"	10	稚内市曲淵	鯀のいずし	18	5	2
14	1957	3	野付郡別海村	ハタハタのいずし	7	4	0
15	"	9	稚内市豊浜	鯀のいずし	7	5	4
16	"	11	枝幸郡枝幸町	鯀のいずし	20	1	1
17	"	11	増毛郡増毛町	ハタハタのいずし	60	35	9
18	1959	11	様似郡様似町	ハタハタおよび鯀のいずし	13	4	0
19	1960	1	札幌市	ハタハタのいずし	8	4	0
20	"	7	山越郡八雲町	イワシのかゆこずし	3	3	0
合 計					291	140	39

E型ボトリヌス中毒はまた東北地方にも屢々発生をみている。青森県衛生部 (1957) の報告によれば、同県においては既に5例の「いずし」による食中毒が発生しており、そのうち3例はE型ボトリヌス中毒であることが確定されている。秋田県においては、小松・田井・藤沢・児玉 (1958) がE型ボトリヌス中毒と確定された4例の何れも「いずし-

による食中毒例を報告している。

この原因菌である *Clostridium botulinum* Type E は初めてロシアにおいて鱈鮫から分離され、アメリカの Meyer のもとに送られて、Gunnison, Cummings & Meyer (1936) により従来の何れの型とも異なるものとして新しく E 型と命名されるに至つたものである。その後 E 型ボトリヌス菌によるボトリヌス中毒は北半球の各地で認められるようになり、1960 年までの世界における E 型ボトリヌス中毒は Dolman (1960) の総説によれば 50 例におよんでいるが、そのうち 32 例はわが国で発生したものでうち 19 例が北海道、13 例が東北地方で発生をみたものである。その他の諸国における E 型中毒の発生例は第 2 表に示すように、カナダに 7 例、北アメリカに 9 例、ロシアに 1 例、デンマークに 1 例、計 18 例でこれらは何れも北半球にのみ発生をみることが特異である。

第 2 表 E 型ボトリヌス中毒発生地の地理的分布

発 生 場 所	発生数	患 者	死亡者
日 本 : 北 海 道	19	137	39
本州北部	13	50	21
Canada : British Columbia	6	13	9
Labrador	1	8	6
U. S. A. : Alaska	6	18	6
New york	2	6	2
California	1	3	1
U. S. S. R. : Leningrad	1	1	1
Denmark : Frederiksberg	1	6	0
計	50	242	85

註] 第 2 表 Dolman の総説には第 1 表 20 番を含まず

この E 型ボトリヌス中毒は 1941 年サンフランシスコで発生したユーゴスラビヤ産の Mushroom の罐詰を原因食品とした中毒が唯一の例外で、それ以外のすべてが水産食品によつて起つている。即ち諸外国ではイワシ、鯷、鮭、鱈等の燻製、罐詰および酢漬、鮭の卵等を原因食品とし、わが国の発生例では鱈の筋子を原因とした 1 例以外はすべて鯷、鯷、ウグイ、ハタハタ、鯖、ヤマメ、鮭等の魚肉を原料とする「いずし」を摂取することによつて惹起されている。この事実は Dolman, Chang, Kerr & Shearer (1950) の指摘するように E 型中毒が所謂“Fish-Borne-Botulism”なる呼称によく適合することを裏書きするものである。

このようにわが国におけるボトリヌス中毒のすべてが E 型菌によるものであるということおよびその原因食品が 1 例を除いては悉く生魚を原料とする「いずし」という食品によつて起つていることは、わが国のボトリヌス中毒の極めて著しい疫学的特徴であると考えられる。この特異な疫学的特徴が、いかなる理由によるものであるかを究明することは、この中毒の対策を考える場合にも極めて重要な問

題となる。

ある特定の食品がある特定の食中毒菌による食中毒を惹起し易いという傾向は主として 2 つの因子によつて左右されるであろう。即ち一つはその食品がその細菌によつて汚染を受け易いということ、他の一つはその食品がその細菌の増殖に好適な条件を具えているということである。

既に中村、飯田、佐伯、神沢 (1954) はオホーツク海岸および網走湖畔の砂或いは泥から、神沢 (1960) は石狩川沿岸の泥土から E 型ボトリヌス菌を分離しており、本菌の芽胞は広く北海道の沿岸或は河川の岸に分布しているものと推定される。このことから魚が陸揚げに際して土壤中の E 型ボトリヌス菌芽胞に汚染される機会の多いであろうことは容易に想像される。

次に一旦 E 型菌によつて魚が汚染された場合、魚の体内においてこの菌は容易に発芽増殖し、毒素を産生し得るであろうか。これが可能とたるためには魚という培地が E 型ボトリヌス菌の発芽増殖に必要な栄養素を含んでいると共に、その水素イオン濃度 (pH)、酸化還元電位 (Eh) が本菌の増殖可能な範囲内になければならない。これらについては既に安藤・井上 (1957) (1958) が詳細な検討を試み、その何れの点においても生魚は E 型ボトリヌス菌の発芽増殖および毒素産生にとつて好適な培地となり得ることを明らかにしている。

さきに著者 (1956) はこの生魚を原料とする「いずし」による E 型ボトリヌス中毒防止に関する実験的研究を行い、実際に「いずし」を日常民家に行われている方法によつて漬け、これに E 型ボトリヌス菌岩内株の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」の製造過程において毒素の産生される時期は魚肉の水出し(「血出し」一とも称される) 時期と樽に漬け込まれてからの「熟成」期間の 2 つが考えられることを明らかにした。

もともとこの「いずし」は生魚を主とし、こうじ、米飯および野菜等を原料とした一種の漬物であつて、人に摂取されるまでに煮熟、焙焼等の加熱処理を受けない食品である。従つてこれら原料に由来する細菌は広範な種類にまたがり、これらの細菌が原料を汚染した E 型ボトリヌス菌芽胞の増殖並びに毒素産生と極めて深い関係を有し、惹いては中毒の発生に大きな影響を及ぼすことが推定される。これら種々の細菌中には E 型ボトリヌス菌の発育や毒素産生を助長するもの、或いは逆に発育を抑制し、又産生された毒素を不活性化する等の作用を営むものが考えられる。実際に、著者は前記実験において同様な製造過程を経て作られた E 型ボトリヌス菌岩内株芽胞接種「いずし」で原料の魚肉の鮮度を人為的に低下せしめたものは E 型ボトリヌス毒素を含有するに至つたが、新鮮な魚肉を用いたものには全く該毒素を証明し得ない成績を得た。この魚肉の鮮度低下と E 型毒素産生の関連性については必ずしもその「いずし」中の

細菌群の動向のみに左右されるものとは断定し得ないが、この場合における汚染菌の意義は極めて重要なものと思われる所以は、既に安藤、井上 (1957) が報告したように、魚肉の鮮度低下は著しい酸化還元電位 (Eh) の低下を伴う。新鮮な魚肉において発芽、増殖の不可能な E 型ボトリヌス菌が、魚肉の鮮度低下に伴って発芽、増殖し更に毒素を産生し得るのはこの魚肉中の Eh の著明な低下が原因として考えられ、この Eh の低下には魚肉の自己消化と共に魚肉に附着する種々の細菌群の活性が主要な原因となることが推定される。

既にボトリヌス菌の発育に及ぼす好気性菌の影響については、本菌の発見者である Van Ermengem (1897) が Pickled ham を原因とするボトリヌス中毒に際して *Sarcinae* と *Micrococci* が何れも共生的役割を果すと報告しており、又 Proca (1907) は本菌を培養する際に予め大腸菌を発育せしめて酸素を除いたブイオンに本菌がよく増殖し得ることを記載しており、更に Hall & Peterson (1923) は土壌中の本菌芽胞の分布を調査するに際して、ボトリヌス菌の試験管内毒素産生には好気性菌の共生作用が関係することを認めている。また Quortrup & Holt (1941), Quortrup & Sudheimer (1943) は北アメリカの Western Duck Sickness に関する研究において野鴨の腸内に広く分布している *Pseudomonas aeruginosa* が大量の酸素を消費しアルカリを産生して C 型ボトリヌス菌の発育を助長することを観察し、この好気性菌の存在が C 型ボトリヌス中毒の発生に重要な役割を有するものと見做している。又 Francillon (1925) は更に進んで発育および毒素産生の面のみに限らず、既に産生された毒素に対して *Bacterium pyocyaneum*, *Bacterium coli*, *Bacterium proteus vulgare*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus pyogenes aureus* および *Streptococcus pyogenes* が如何なる影響を及ぼすかを調べている。本報告によると *Bacterium pyocyaneum* 以外の菌種はブイオン中で好氣的条件下で A 型ボトリヌス菌の発育および毒素産生を可能にするに反し、*Bacterium pyocyaneum* は発育抑制的に更に A 型菌菌体を溶解する如く作用するが、これらの菌種は何れも毒素を僅かに減弱するのみであつたと報告している。一方わが国でも江原、大河原 (1942) は納豆菌が共生すると A 型および B 型ボトリヌス型が液体培地および蒸煮大豆を使用して製造した納豆内において好氣的条件下でも容易に発育してボトリヌス毒素を含有するに至ることを観察し、わが国で広く食用に供されている納豆によるボトリヌス中毒例が未だに見られないのはわが国に本菌が分布していない一証左であると述べている。これとは対照的に Duck (1956) はその著書 “Food Poisoning”, 中にアメリカ合衆国において日本移民の間に発生した 2 例の納豆を原因食品とするボトリヌス中毒を記載している。

上述の如く、好気性菌がその増殖に伴う酸素の消費によってボトリヌス菌の発育を助長するという報告の見られる

反面、或る種の好気性菌は酸を産生することによつてボトリヌス菌の増殖を阻止することが知られている。例えば前記の Hall & Peterson (1923) はある酸産生好気性菌がブドウ糖ブイオン中でボトリヌス菌の発育を抑制すること、また Edmondson *etal* (1923) は生乳中にボトリヌス菌芽胞を入れても有毒化しないが、殺菌乳中では毒素を産生することを認め、生乳のボトリヌス毒素産生阻止作用は乳酸菌によつて出来た乳酸の作用であることを報告している。更にこの乳酸菌の作用によつて Mahmoud & Ordal (1955) は実験的に “Precooked frozen Food” に附着した A 型ボトリヌス菌の発育を抑制し、従つて毒素産性を阻止し得ることを証明し、又神沢、飯田 (1957) は乳酸菌が「いずし」中の E 型ボトリヌス毒素の産生を阻止する上にかかなりの効果を示すことを認めている。

もともと E 型ボトリヌス菌は他の型の菌に比べその発見の歴史も浅く、且つその中毒例も地理的に限局されしかも少いため、現在までに本菌に関する研究は寥寥たる有様である。

ここにおいて著者は、わが国に発生を繰返しつつある E 型ボトリヌス中毒が煮熟、焙焼等の加熱処理を被らず従つて多くの種類の細菌に汚染される可能性のある「いずし」を主なる原因食品として発生している事実、および従来の好気性菌がボトリヌス菌の発育、毒素産生に及ぼす影響についての研究は主に A および B 型菌に限られており、殆んど E 型菌についての研究は行われていない等の理由から、各種の好気性菌が E 型ボトリヌス菌の発芽、増殖および毒素産生に及ぼす影響を詳細に検討し、これらが本中毒の発生に際し、如何なる役割を果すかについて実験的研究を実施した。

即ち本研究は E 型ボトリヌス中毒の殆んどすべてが魚乃至は海産物を原料として起つているという顕著な疫学的特徴に注目し、E 型菌が魚の体内で容易に発芽、増殖して毒素を産生するという事実を、魚に広く分布すること考えられる各種好気性菌との共生という面から究明しようという企図のもとで行われたものである。

既に著者ら (1956) は「いずし」の製造過程における E 型ボトリヌス毒素の産生状況を検討して「いずし」の原料としては新鮮な魚肉を用いるよりも鮮度の低下したものを用いた方が毒素の産生の強いことを観察した。この事実は鮮度の低下に伴つて E 型菌の増殖が促進され、且つ毒素の毒性が増強される可能性を示唆するもので、この間に当然魚に附着している諸種の細菌の作用が大きく影響しているものと考えられる。この点を詳細に検討することによつて本中毒発生の機作の一端をうかがい知ることが出来ると共に、本中毒の防止上有効な所見を得ることが出来るであろうと推測される。

本論文は以上のような企図のもとに行われた諸実験により、新たに得られた 2, 3 の興味ある知見を一括報告する

次第である。

第2章 実験材料および方法

1 使用菌株

本研究に使用した菌種、菌株は次に示す通りである。

E型ボトリヌス菌：

岩内株 (1951年5月北海道岩内郡島野村の食中毒例より分離された菌株)

好気性菌：

Escherichia coli I, *Escherichia coli* O-102,
Aerobacter aerogenes, *Aerobacter cloacae*, *Proteus* SP.,
Serratia marcescens, *Bacillus subtilis*, *Bacillus*
megaterium, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus*
aureus, *Rettgerella* SP.

(以上の菌株は北海道立衛生研究所が保存中のもの)

Achromobacter SP., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus*
mesentericus. (以上の菌株は北海道大学農学部応用菌学
教室より分与された)

Streptococcus lactis, *Streptococcus cremoris* (以上の菌
株は雪印乳業株式会社より分与された)

Pseudomonas fluorescens, *Pseudomonas aeruginosa*,
Achromobacter cycloclastes, *Flavobacterium ewanense*.

(以上の菌株は東京大学応用微生物研究所より分与された)

以上の好気性菌菌株をピジョンに 37°C および 25°C に
3日間培養しその遠心上清 (8,000rpm 15分間) 0.5ml を
体重15~20gのマウスの腹腔内に注射して7日間観察した
が何れも毒性を認めなかった。唯例外として *Pseudomonas*
aeruginosa の培養液の遠心上清は原液でマウスを斃死せし
めるが、これを生理食塩水で5倍に稀釈したものは無毒で
あつた。

2 使用培地

本研究に使用した主なる培地は下記の通りである。

A 普通ピジョン：Polypeptone (武田) 1.0%, 肉エ
キス (Difco) 0.3% および食塩 0.3% を含有するものであ
る。pH 7.2。

B 糖加ピジョン：上記の普通ピジョンに蔗糖ないし
はブドウ糖を 0.5% に加えたものである。pH 7.2。

C 緩衝ピジョン：普通ピジョンに Na_2HPO_4 0.66%
および KH_2PO_4 0.27% を加えたものである。pH 7.2。

D 肝々ピジョン普通ピジョン100ml に新鮮な馬の肝
臓 30gr をぶつ切りにして加え、100°C で1時間浸出し、
濾過する。肝臓は囊の目に細切して洗いで汚物を洗い落す。
濾液の反応を pH 7.8 に修正し、大試験管に分注しこれに
上記の肝片を加え、120°C 30分間高压滅菌した。

E チオグリコレート培地：本培地は一般に生物学的
製剤や注射液等の無菌試験に使用されるものであつて、好
気性菌並びに嫌気性菌が発育可能である。本研究ではE型
ボトリヌス菌岩内株の芽胞数の計算に使用した。本培地1

lの処方は次の通りである。

L-シスチン	0.75gr
寒天	0.75gr
塩化ナトリウム	2.5 gr
ブドウ糖	5.0 gr
酵母エキス	5.0 gr
ペプトン	15.0 gr
チオグリコール酸ソーダ	0.5 gr
0.1% レサズリン溶液	1.0 ml
pH 7.2	

F 液毒素産生用培地：Duff, Wright & Yarinsky
(1956) の処方に準じ、Proteose Peptone (Difco) 2.0%,
チオグリコール酸ソーダ (Difco) 0.1%, Yeast extract
(Difco) 2.0% およびブドウ糖 0.5% を含有し、pH 7.2 に
調整したものである。

3 E型ボトリヌス菌の発芽および増殖の観察

混合培養中のE型ボトリヌス菌芽胞の発芽は培養液の遠
心沈渣を鏡検することによつて判定した。(但し *Bacillus*
属の菌はその形態がボトリヌス菌のそれと類似しているの
で、これらの菌種との混合培養では鑑別できなかつた。)ま
た増殖はボトリヌス菌が糖を醗酵して産生するガスの有無
および混合培養液のグラム染色標本の鏡検によつて判定し
た。

4 E型ボトリヌス毒素の毒力測定

供試毒素は培養濾液ないしは培養液の遠心上清 (8,000
rpm 15分間) を 0.2% ゲラチン加生理食塩水で稀釈した。
各稀釈度毎に体重 15~20gr のマウス 3匹宛使用し、各稀
釈毒素液 0.5ml をマウスの腹腔内に注射してマウスが定型
的なボトリヌス中毒の症状、即ち腹壁の陥凹、後肢麻痺お
よび呼吸困難等を呈して斃死するかどうかによつて判定し
た。この観察は注射後4日間行つた。従つて 1ml 当りの
最小致死量 (M.L.D./ml) は致死作用を示した最大稀釈倍
数を2倍した数値で表わした。

5 pHの測定

pH は各培養液の遠心上清 (8,000rpm 15分間) 約 5 ml
をとりガラス電極 pHメーター (東京理化学工業株式会社製)
を用いて測定した。

第3章 実験成績

第1節 E型ボトリヌス菌の増殖に及ぼす好気性 菌の影響 I (培地の酸化還元電位)

1 普通ピジョンにおける混合培養

E型ボトリヌス菌は単独で普通ピジョンには全く発育し
ない。これは普通ピジョンがE型菌の増殖を可能ならしめ
る低い酸化還元電位を有しないためであろうと考えられ
る。そこで著者はまず好気性菌と混合培養された場合のE
型ボトリヌス菌の増殖態度を知るため、岩内株の芽胞約 1,0
00個 (芽胞数の測定はチオグリコレート培地によつて行つ

た。)と上述の好気性菌各種 15 株の夫々斜面培養 1 白金耳を普通ブイオンに同時に接種し 37°C で混合培養し、6 日後 E 型ボトリヌス菌の発芽、増殖および毒素産生の有無を観察したが、その成績は第 3 表に示す通りである。

即ち E 型ボトリヌス菌芽胞を普通ブイオンで夫々 *Escherichia*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* および *Staphylococcus* と混合培養すると好気性菌の増殖によつて普通ブイオンは濁濁するが一方 E 型ボトリヌス菌は鏡検上発育型のみが少数検出され増殖している傾向はない。これに反し *Streptococcus* 属の菌との混合培養では普通ブイオンは濁濁せず且つ発育型の E 型ボトリヌス菌を認め得ず芽胞のまま残存するのが観察された。又 *Bacillus* 属の菌との混合培養の例ではこの *Bacillus* の形態がボトリヌス菌のそれに酷似しているため、E 型ボトリヌス菌の増殖の有無の判定は困難であつたが芽胞を認め得なかつたので発芽したものと判定した。

以上 15 種の菌種を用いてこれらを E 型ボトリヌス菌の芽胞と共に普通ブイオンに夫々混合培養する場合には *Streptococcus* 3 種を除いて芽胞の発芽は許されるがそれ以上進んで E 型菌の増殖は不可能であり従つて E 型菌によるガス産生も行われず又毒素の産生も行われなことを明らかにした。

本成績から大部分の好気性菌は普通ブイオンに発育して E 型ボトリヌス菌芽胞の発芽を可能ならしめるが、E 型菌の増殖は起り得ないことを知つた。

第 3 表 普通ブイオンにおける各種好気性菌と E 型菌の混合培養

混合培養菌種	E 型菌の発育		
	発芽	ガス産性	毒素産生
<i>Escherichia coli</i> I	+	-	-
<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 megaterium</i>	+	-	-
<i>Bacillus mesentericus</i>	+	-	-
<i>Streptococcus lactis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-

2 0.5%蔗糖ブイオンにおける混合培養

前項において E 型ボトリヌス菌芽胞は普通ブイオンに好気性菌と混合培養された場合、発芽は起るが増殖し得ない

ことが明らかにされた。そこで後述する如く E 型菌が発育のエネルギー源として該菌が醗酵し得る糖の存在を必要とするという点から 0.5%蔗糖ブイオンを用いて好気性菌との混合培養による E 型菌の増殖態度を検討した。元来 E 型ボトリヌス菌は 0.5%蔗糖ブイオンに単独では普通ブイオンにおけると同様発育し得ない。これはボトリヌス菌が偏性嫌気性菌であつて、その増殖のためには十分なる栄養素が培地に含有されていると同時に、培地の酸化還元電位 (Eh) が十分に低いことを必要とするためである。0.5%蔗糖ブイオンは前者の条件を満足するが、これに何等かの還元物質を添加しなければ菌の発育は起り得ない。

E 型ボトリヌス菌岩内株芽胞約 1,000 個と上述の好気性菌種 15 株の普通寒天斜面培養 1 白金耳を 0.5%蔗糖ブイオンに同時に接種し 37°C 6 日間培養した。かくして E 型ボトリヌス菌の増殖については培養液の塗抹標本、ガス産生の有無によつて判定し、E 型毒素の産生についてはマウス腹腔内接種によりその毒力を測定した。之等の成績は第 4 表に示す通りである。

本成績によると、E 型ボトリヌス菌は *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* 属の 3 菌種および *Streptococcus faecalis* と共に混合培養された場合に蔗糖ブイオン中でガスを産生して発育し、グラム染色標本によつて菌体の著しい増数が認められ旺盛な発育、増殖を示した。この場合産生されるガスが E 型ボトリヌス菌の増殖によるものであろうと推定した根拠は、混合培養した各好気性菌が蔗糖非分解乃至はガス非産生の菌株であるからである。又その産生された毒素即ち蔗糖ブイオンの遠心上清 (8,000 rpm 15 分間) の毒力は培養 6 日後に *Bacillus subtilis* 及び *Serratia marcescens* との混合培養例では 2,000 M.L.D./ml の毒力に達して最高を示し、*Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus megaterium* および *Bacillus mesentericus* との混合培養例では 200 M.L.D./ml, 又 *Streptococcus faecalis* との混合培養例では 20 M.L.D./ml を示し最低であつた。なおこれらの菌を蔗糖ブイオンに単独で培養した上清はマウスに毒性を示さなかつた。

Aerobacter, *Achromobacter* および *Streptococcus lactis* との混合培養においては染色標本により僅かに E 型ボトリヌス菌の増殖を証明し得たが毒素は検出し得なかつた。一方 *Streptococcus cremoris* は単独でも蔗糖ブイオンに発育せず従つて E 型菌との混合培養においても何等影響を及ぼさなかつた。又 *Staphylococcus aureus* は単独で蔗糖ブイオンに旺盛に発育して培地の pH を著しく低下せしめこのため混合培養例では E 型ボトリヌス菌の発芽、増殖ひいては毒素産生は全く阻止される成績を示した。

上述の通り蔗糖ブイオンにおける好気性菌と E 型ボトリヌス菌岩内株の混合培養は一部の菌種では両者共によく発育、増殖してガス並びに E 型毒素が産生されるのに反し、一部の菌種では僅かに E 型ボトリヌス菌の増殖を許す程度で

毒素は産生されず、又一部の菌種はE型ボトヌリス菌の発芽増殖を許さず、従つてE型毒素の産生もみられなかつた。このように好気性菌もその種類によつてE型ボトヌリス菌の発芽増殖に重大な影響を及ぼすことを知つた。好気性菌の共存が嫌気性菌の増殖に良好な影響を及ぼすのは、前者の増殖により培地の酸化還元電位 (Eh) が低下し後者の増殖が可能になるためと考えられる。例外的に *Streptococcus cremoris* は0.5%蔗糖ブイオンに増殖せず、従つて混合培養を行つてもE型ボトヌリス菌の増殖には何等の影響もおよびさなかつた。

第4表 蔗糖ブイオンにおける各種好気性菌とE型菌の混合培養

混合培養菌種	E型菌の発育		
	発芽	ガス産生	毒素産生 (M.L.D.)
<i>Escherichia coli</i> I	+	++	200
<i>Escherichia coli</i> 0-102	+	++	200
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+	±	0
<i>Aerobacter cloacae</i>	+	±	0
<i>Proteus sp.</i>	+	++	200
<i>Serratia marcescens</i>	+	++	2,000
<i>Achromobacter sp.</i>	+	+	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	++	200
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	2,000
<i>Bacillus megaterium</i>	+	++	200
<i>Bacillus mesentericus</i>	+	++	200
<i>Streptococcus lactis</i>	+	+	0
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	-	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	++	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	0

3 好気性菌の発育による酸化還元電位の低下安定

嫌気性菌の発育は培地の酸化還元電位 (Eh) によつて支配され、*Clostridium* 属の菌は培地の Eh が低い時のみ代謝を営むことが出来るのは周知の事実である。この Eh は培地中の還元物質の量、細菌自体の代謝系の変動および周囲の酸素圧によつて支配され、一般に細菌が接種されてその代謝系が活動し始めると Eh は急激に低下する。これ

は細菌が一種の生体触媒として培地中の酸化還元系を支配するからであろう。しかし *Clostridium* 属の発育可能 Eh については多くの研究があるが、安藤、井上(1957)はE型ボトヌリス菌岩内株が発育し得る Eh は略々-0.15~-0.2volt 附近であると報告している。

著者は上述の実験において0.5%蔗糖ブイオンにおいてはE型ボトヌリス菌が単独では発育出来ないが、これに好気性菌が発育すると特殊な嫌気的条件を設定する操作なしにE型ボトヌリス菌が発育して毒素を産生するに至ることを明らかにしたが、その理由としてこれらの好気性菌が培地中のEhを低下安定せしめる作用のあることを証明した。

0.5%蔗糖ブイオンに酸化還元指示薬としてレサズリンを添加(0.1%溶液を培地1lに1ml)し、これに *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* の3菌種をそれぞれ1白金耳宛、単独に或はE型ボトヌリス菌岩内株芽胞約1,000個と混合接種して37°Cで培養し、経時的にレサズリンの褪色状況によつてEhを測定すると同時にE型ボトヌリス菌によるガス産生を観察した。

その成績は第5表の通りで、レサズリンの褪色は好気性菌の単独培養とE型ボトヌリス菌との混合培養の間に差異を認めなかつた。即ち培養開始前にはEhが高いため赤色を呈していた0.5%蔗糖ブイオンは、*Staphylococcus* の増殖に伴つて次第に褪色し12時間後には完全褪色した。又 *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* の培養ではやや遅れて24時間後に完全褪色を示した。またE型ボトヌリス菌の発育によるガスの産生は *Staphylococcus aureus* との混合培養においては認められなかつたが、*Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* との混合培養においては24時間後にその産生が認められた。*Staphylococcus aureus* との混合培養において培地の Eh が低下しているにも拘らずE型ボトヌリス菌の増殖が認められなかつたのは後に述べるように0.5%蔗糖ブイオンにおいては *Staphylococcus aureus* は蔗糖を速かに分解して培地の pH を低下せしめるため、Eh は低下してもE型菌の増殖は起らないものと考えられる。これに反して *Escherichia coli* 及び *Bacillus subtilis* との混合培養においてはこのような pH の低下が起らないため培地の Eh 低下に伴つてE型菌の増殖が起り得るのである。

第5表 0.5%蔗糖ブイオンにおける好気性菌の発育による酸化還元電位の低下

時 間	E. coli + E 型 菌			B. subtilis + E 型 菌			Staph. aureus + E 型 菌		
	pH	レサズリン色調の変化	ガス産生 (E型菌) の発育	pH	レサズリン色調の変化	ガス産生 (E型菌) の発育	pH	レサズリン色調の変化	ガス産生 (E型菌) の発育
3	—	変化なし	—	—	変化なし	—	—	変化なし	—
6	7.8	僅かに褪色	—	7.0	殆んど変化なし	—	7.3	僅かに褪色	—
12	7.7	殆んど褪色表層のみ赤色	—	7.5	殆んど変化なし	—	5.0	完全に褪色	—
24	7.5	完全に褪色	+	4.8	完全に褪色	+	5.0	完全に褪色	—
48	7.7	表層は赤色	+	5.2	表層少し赤色	+	5.0	完全に褪色	—

このように培地に添加されたレサズリンが完全に褪色するのは Eh が -0.05 volt 以下になったことを示すもので本実験からこの Eh で E 型ボトリヌス菌の発芽、増殖は充分行われ得ることを知り得た。

以上の成績から本実験に供試した 3 菌種は共に 0.5% 蔗糖ブイオンの Eh を低下安定せしめて E 型ボトリヌス菌の増殖を可能ならしめるものと考えられるがただ *Staphylococcus aureus* のみは後述するように蔗糖を分解して培地の pH を速かに低下せしめるので、蔗糖ブイオンにおいては E 型菌の増殖が起らないものと解せられる。

第 2 節 E 型ボトリヌス菌の増殖に及ぼす好気性菌の影響 II (培地の水素イオン濃度)

1 好気性菌の単独培養および E 型ボトリヌス菌との混合培養における蔗糖ブイオンの pH の変化

凡そ各種細菌の発育上培地の pH が重要な影響を及ぼすことは論ずるまでもない。

著者は前 3-1-2 において蔗糖ブイオンにおいては *Staphylococcus aureus* と混合培養されると E 型ボトリヌス菌の発育が認められないことを知つたのでこの作用の機作を明らかにするため、まず好気性菌を単独で培養した場合および好気性菌を E 型ボトリヌス菌と混合培養した場合の 0.5% 蔗糖ブイオンとの pH の推移を経時的に測定した。即ち 0.5% 蔗糖ブイオンに *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* および *Staphylococcus aureus* を別個に 1 白金耳宛接種し 37°C に単独培養したもの、およびこれらの試験管にそれぞれ E 型ボトリヌス菌岩内株芽胞約 1,000 個を加えて 37°C で混合培養したものについて培地

の pH の推移を観察した。(第 1 図参照)

本研究に使用した *Escherichia coli* は蔗糖非分解性で単独培養では接種後 24 時間から蔗糖ブイオンの pH をアルカリ域に転ずる。また *Serratia marcescens* の単独培養では、はじめやや酸性に傾き培養 18 時間にしてその限界値 pH 6.4 に達し、次いで徐々にアルカリ域に移行する。これら 2 種の菌を別々に E 型ボトリヌス菌と混合培養した場合には、E 型ボトリヌス菌の発育に伴つて前者の場合には、18 時間後に、後者の場合には 48 時間後に酸域に移行する。また *Bacillus subtilis* の例では、単独培養と混合培養との間に著しい差がなく、培養 12 時間ではアルカリ域に止るが、18 時間後には酸性となり (pH 5.8) 単独培養のものは 72 時間後もそのままの状態を維持するのに対し混合培養では酸性を強める傾向を示す。

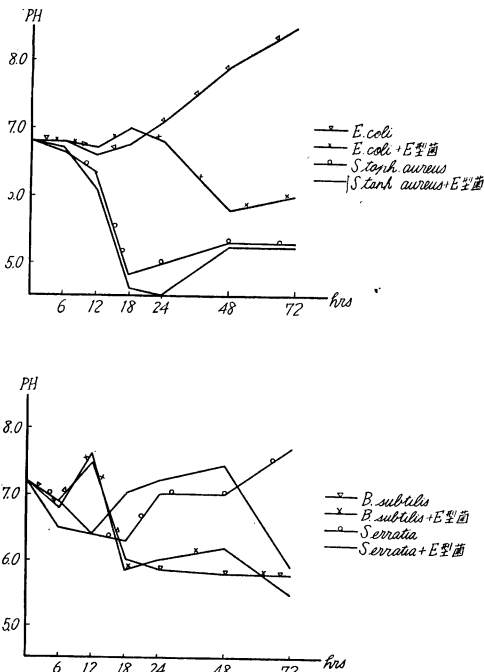
これらの菌種と異つて *Staphylococcus aureus* は単独培養では培養 18 時間後に培地(起始 pH 6.8)の pH は 4.6 に低下し、*Bacillus subtilis* が同時間で僅かに 5.8 に低下する程度に止まる態度に比べ両者の間に著明な差のあることを知つた。混合培養においても同様に *Staphylococcus aureus* は速かに培地の pH を低下することが観察された。

以上の成績から、糖培地にそれらの糖を分解する菌が発育してもその培地の酸度の上昇並びに時間は菌種によつて著しい懸隔の存することおよび E 型ボトリヌス菌の発育抑制作用を呈する *Staphylococcus aureus* は抑制作用の認められない *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* および *Bacillus subtilis* に比べ酸産生が著しく、このため E 型菌の発育に要する pH 域とは大きく懸隔するため E 型菌の発育を完全に阻止するものと解せられる。既に神沢・飯田(1957)は肝マブイオンに酢酸を加えてその pH を 4.4, 4.6, 4.8 ……6.6 とし、これらに E 型ボトリヌス菌岩内株を接種して培養したところ、pH 5.6 以上ではじめて毒素が産生されることを報告している。*Staphylococcus aureus* は培養後 18 時間以前に既に蔗糖ブイオンの pH を 5.6 以下に低下せしめるから E 型菌の発育の阻止されることは当然と考えられる。

2 肝マブイオンにおける混合培養

E 型ボトリヌス菌は蔗糖ブイオン中では単独では発育できないがこれに好気性菌が混合培養されると菌種によつては共生を示し両者共に旺盛に増殖が行われるが菌種によつては E 型菌の発育を阻止することを実証した (3-1-2)。著者は前者の代表として *Bacillus subtilis* を後者の代表として *Staphylococcus aureus* を選び、培地としては E 型ボトリヌス菌が単独で発育増殖して毒素を産生し得る肝マブイオンを用いてこの 2 種の好気性菌の各々を E 型菌芽胞と共に混合培養を試みた。方法としては夫々の好気性菌 1 白金耳と岩内株芽胞約 1,000 個を同一試験管に接種して 37°C に培養し、経時的に培地の濾液をマウス腹腔内に接種して毒力を測定した。得られた成績は第 6 表に示す如くである。

第 1 図 蔗糖ブイオンの pH の変化



第6表 E型ボトリヌス菌と *B. subtilis* および
Staph. aureus の混合培養
(肝タブイオン)

菌種	時間	稀			釈
		1 : 1	1 : 10	1 : 100	
B. subtilis + E型ボトリヌス菌	12	● ●	● ○		
	18	● ●	● ●		
	36		● ●	● ●	
	60		● ●	● ●	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○
Staph. aureus + E型ボトリヌス菌	12	● ●	○ ○		
	18	● ●	● ●		
	36		● ●	● ○	
	60		● ●	○ ○	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○
E型ボトリヌス菌	12	○ ○	○ ○		
	18	● ●	○ ○		
	36		● ●	● ○	
	60		● ●	○ ○	○ ○
	84		● ○	○ ○	○ ○

註 ● : マウス斃死, ○ : 生残

表に見られる如く E型ボトリヌス菌の肝タブイオン単独培養では培養に 12 時間では毒素は未だ検出されず 18 時間に至つて僅かに 2 M.L.D./ml, 36~60 時間にして漸く 20 M.L.D./ml に達した。これに反し *Bacillus subtilis* との混合培養では 12 時間にして既に有毒となり, 2 M.L.D./ml の毒力を示し, 18 時間後には 20 M.L.D./ml 以上, 36~60 時間では, 200 M.L.D./ml, 84 時間後には少しく減弱して略々 20 M.L.D./ml の毒力を許した。一方 *Staphylococcus aureus* との混合培養においても 12 時間後に 2 M.L.D./ml の毒力を示し, 18 時間以上 84 時間に至るまで略同程度の毒力 20 M.L.D./ml の力価を維持した。

このような成績から肝タブイオンにおいては *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 共に E型ボトリヌス菌と共生して発育増殖し, その毒素産生を促進するものと解し得る。

かくの如く肝タブイオンでは *Staphylococcus aureus* は E型ボトリヌス菌の増殖を阻止することなくむしろ毒素産生を促進する傾向を有するが, 上述の蔗糖パイオン中では E型ボトリヌス菌の増殖は阻止されて毒素の産生が行われなかつた。その理由としては単に *Staphylococcus aureus* が培地の pH を急速に酸性化することがまず考えられる。

この考えの妥当性を検するために, 一旦 *Staphylococcus aureus* が発育して培地中の糖を分解しその pH を著しく低下せしめた 0.5%蔗糖パイオンを 100°C 30 分間加熱滅菌した後, 4% NaoH 液中に中性に修正し新たに E型ボトリヌス菌芽胞を接種し培養した結果, E型ボトリヌス菌は正常に発育して毒素が産生されることを知つた。このことから蔗

糖パイオンを用いての E型ボトリヌス菌と *Staphylococcus aureus* の混合培養においては, *Staphylococcus aureus* が蔗糖を分解し培地の pH を急速に低下せしめるため E型ボトリヌス菌の発育が抑制され従つて毒素産生も行われなことが明らかにされた。

既に述べた如く, 蔗糖パイオンは E型ボトリヌス菌の増殖に必要な栄養素を含有してはいるが, その培地の酸化還元電位 (Eh) の不安定なため E型菌の増殖を許さない。これに何等かの還元性物質 (Na-thioglycollate 或いは cysteine) を添加すれば E型ボトリヌス菌はよく増殖する。従つて蔗糖の分解による培地の pH の低下が起らなければ或いは一旦 pH が低下してもこれを E型菌の増殖可能な pH 域に修正すれば *Staphylococcus aureus* との混合培養によつて培地の Eh は低下し E型菌の増殖し得ることは当然予想されるところである。

3 培地の pH および E型ボトリヌス菌の増殖に及ぼす腐敗細菌の影響

上述の実験結果から各種好気性菌が E型菌の増殖に及ぼす影響として培地の Eh 低下と共に培地の pH に与える影響を看過し得ないことを知つた。そこで広く魚体に分布すると考えられる各種の腐敗細菌が培地の pH 並びに E型菌の増殖に及ぼす影響を及ぼすかを明らかにしようとした。

魚体に分布する細菌種については既に多くの研究者によつて観察がなされた結果, 魚体は毎常 *Pseudomonas*, *Flavobacterium* および *Achromobacter* の如き水由来の腐敗細菌と *Micrococci* が検出されることが知られている〔木俣 (1948)〕。一方前述の如く E型ボトリヌス中毒は魚およびその加工品と密接な関係があることから, これらの腐敗細菌は魚肉を汚染した E型ボトリヌス菌の増殖に対して多少にかかわらず関連を有することが推定される。

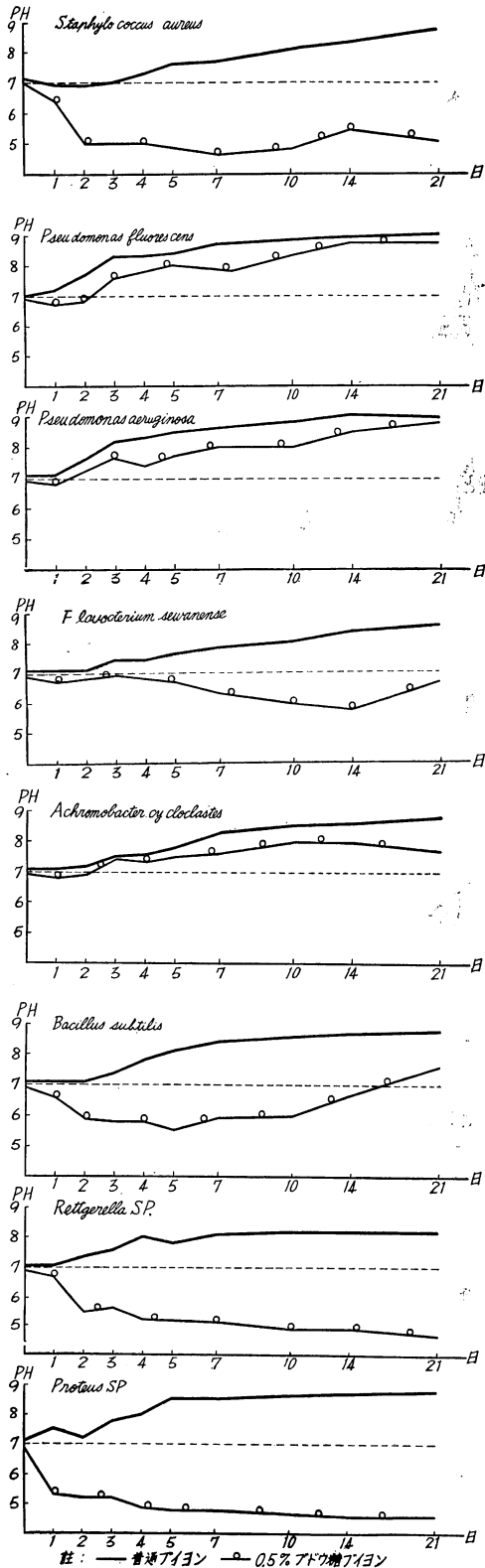
そこで著者はこれら魚肉常在菌を含め, 一般に所謂腐敗細菌として知られている *Bacillus subtilis* および *Proteus* が培地の pH および E型ボトリヌス菌の増殖並びに毒素産生におよぼす影響を検討するため以下に述べる実験を試みた。

使用菌株は下記の通りである。

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas fluorescens*,
Pseudomonas aeruginosa, *Flavobacterium sewanense*,
Achromobacter cycloclastes, *Bacillus subtilis*,
Rettgerella sp., *Proteus* sp.

これらの菌の夫々について pH 7.1 の普通パイオンおよび pH 6.9 の 0.5%ブドウ糖パイオンに接種し, 25°C で培養し, 21 日間経時的に培地の pH を測定した。その成績は第 2 図に示したがこれらの腐敗細菌は普通パイオンに発育すると何れも培地のアルカリ度を高め, 菌種によつて差異はあるが培養 21 日後に, 培地の pH は 8~9 に達する。一方 0.5%ブドウ糖パイオンにおいては大部分の菌に酸産生作用を認めた。しかし酸産生の程度は菌種によつて異り,

第2図 腐敗細菌の増殖によるブイオンの pH の変化



Staphylococcus aureus が最も強く、培養2日後に pH 5.0 となり7日後には 4.6 に達するが、これを限度として10日

以降再び pH の値は上昇する。これに次ぐものは *Proteus* および *Retigerella* で培養2日後にそれぞれ pH 5.2 および 5.5 を示し、その後徐々に pH を下降せしめて 4.6 および 4.7 となる。*Bacillus subtilis* は培養7日後に pH 5.5 に達するのが限度で、その後 pH は上昇し 21 日後には pH 7.6 とアルカリ域に転じた。*Flavobacterium sewanense* は遅れてブドウ糖を分解し培養5日後にその pH 曲線は下降し始め、14 日後に 5.6 に達するが、その後 pH は上昇する。また *Pseudomonas* の2菌種および *Achromobacter* は終始培地の pH を酸性に移行せしめなかつた。

また E 型ボトリヌス菌は単独で 0.5%ブドウ糖ブイオンに発育し得ないが、上記の8菌種とそれぞれ混合培養すると本培地で増殖して毒素を産生する。

要するにこれらの腐敗細菌は 25°C で培養された場合、何れも酸の産生が緩徐乃至は陰性で E 型ボトリヌス菌の増殖を可能ならしめる。これは主として 3-1-3 において述べたように、培地の酸化還元電位 (Eh) を低下せしめることによるものと考えられる。

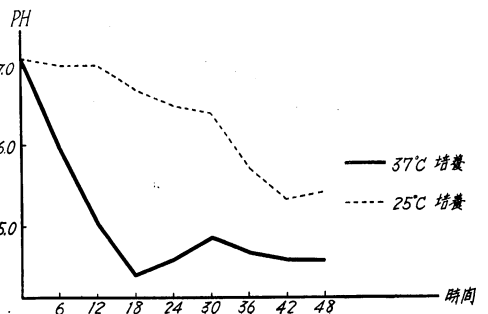
第3節 E 型ボトリヌス菌の増殖に及ぼす好気性菌の影響 (培養温度)

0.5%ブドウ糖ブイオンにおける *Staphylococcus aureus* の E 型ボトリヌス菌増殖に及ぼす培養温度の影響

著者は 3-1-2 および 3-2-1 において糖加ブイオンに E 型ボトリヌス菌と *Staphylococcus aureus* を同時に接種して 37°C で混合培養すると *Staphylococcus aureus* が E 型ボトリヌス菌の増殖を阻止することを明らかにしたが、これはその急速な酸産生作用によるものと考えられる。この点を明らかにするため、培養温度を変えて *Staphylococcus aureus* の発育を遅延し酸産生を緩除ならしめた場合には、E 型ボトリヌス菌の発育および毒素産生の可能性が生ずる。著者はこの点を更に検討した。

まず 0.5%ブドウ糖ブイオン (E 型ボトリヌス菌は本培地に単独では発育できない) に *Staphylococcus aureus* を 1 白金耳接種し、37°C および 25°C で培養した場合の培地の pH を経時的に検討すると第3図に示す如き推移をたどる。

第3図 *Staph. aureus* の発育による 0.5%ブドウ糖ブイオンの pH の変化



即ち 37°C 培養では起始 pH 7.2 から培養 12 時間後に早くも E 型ボトリヌス菌の発育が不可能である pH 5.0 に低下する。次いで 18 時間後に 4.3 となり 24~48 時間では多少の弛張はあるが何れも pH 4.5~4.8 に止つた。このような急激な pH の低下に比べ 25°C 培養では、pH の下降は極めて緩慢で培養 12 時間後に 7.0, 18 時間後に 6.7, 24 時間後 5.7, 42 時間後に 5.3, 48 時間後に 5.4 を示した。従つて *Staphylococcus aureus* が酸の産生によつて E 型ボトリヌス菌の発育を阻止するには、37°C 培養の場合には 12 時間以内であるのに反し、25°C 培養の場合には 42 時間以上を要するわけである。

0.5%ブドウ糖ブイオンに *Staphylococcus aureus* 1 白金耳と E 型ボトリヌス菌岩内株の Duff *et al* (1956) の培地の 24 時間培養 2 白金耳を同時に接種し、2 日後にガス産生と塗抹標本の鏡検によつて増殖の有無、マウス接種によつて E 型ボトリヌス毒素産生の有無および培地の pH を調べた。

その成績は第 7 表に示す通りで、37°C 培養では E 型ボトリヌス菌の発育は甚だ微弱で、かつその遠心上清 0.5ml を 3 匹のマウスの腹腔内に注射しても全く毒性を証明し得なかつた。これに反して 25°C 培養のものでは E 型ボトリヌス菌は旺盛に増殖し、毒素産生は陽性であつた。また培地の終末 pH は 37°C 培養のものは 4.1 に低下するのに対して 25°C 培養のものは 5.0 に止つた。培養 6 日後においても 37°C 培養のものには全く毒素を証明し得なかつたが、25°C 培養のものは有毒であつた。

第 7 表 0.5%ブドウ糖ブイオンにおける *Staph. aureus* の E 型ボトリヌス菌増殖 (培養 2 日後) に及ぼす温度の影響

培養温度	培 養	培 養 終 末 時 の pH	濁 濁	ガ ス	塗 抹 鏡 検	毒 素
37°C	混合培養	4.1	+	-	1視野1個	-
	対 照	6.6	-	-	-	-
25°C	混合培養	5.0	+	+	1視野多数	+
	対 照	6.6	-	-	-	-

本成績から *Staphylococcus aureus* は 0.5%ブドウ糖ブイオンで E 型ボトリヌス菌と混合培養されると、37°C で培養された場合は急速な培地の pH の低下によつて E 型ボトリヌス菌の発育を阻止するが、25°C で培養された場合にはこのような急速な pH の低下は起らずむしろ E 型ボトリヌス菌の発育並びに毒素産生を可能ならしめることが明らかになつた。

元来、*Staphylococcus aureus* の発育至適温度は 37°C であつて、この温度で培養されると発育極めて旺盛で、糖加培地において第 3 図に示す如く培地の pH を急速に低下して E 型ボトリヌス菌の発育を阻止するのに反し、25°C で

培養した場合は pH の低下作用が緩徐であるため、E 型ボトリヌス菌の発育および毒素産生を可能ならしめるものと解される。

第 4 節 E 型ボトリヌス菌の増殖による揮発性脂肪酸の消長

0.5% 蔗糖ブイオンにおける混合培養の揮発性脂肪酸の消長

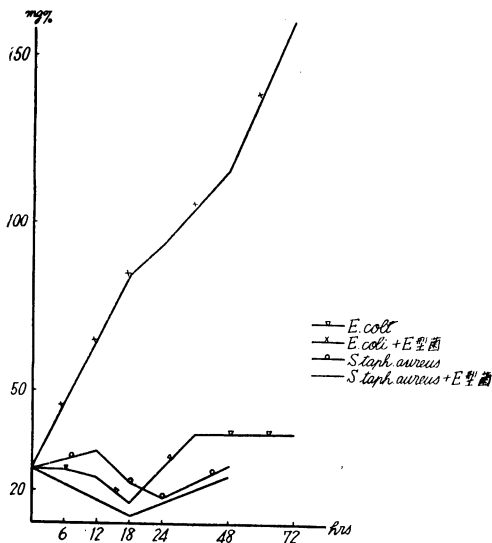
著者は北海道に発生した E 型ボトリヌス中毒を検索する機会を得てその都度成績を報告して来た。その際原因食となつた「いずし」が正常の「いずし」に比べ外見上殆んど異常を認め得ないが、よく注意すると異臭即ち不快な酪酸臭を放散する点に気がつく。一般に魚肉の腐敗過程においては種々の細菌が関与し、発育につれて揮発性酸の生成が増加することは衆知の事実である。そこで好気性菌の単独培養と E 型ボトリヌス菌との混合培養において E 型ボトリヌス菌が発育した場合と発育しない場合の揮発性脂肪酸量を経時的に定量してその産生状況を検討した。

混合培養は E 型ボトリヌス菌岩内株芽胞約 1,000 個と *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *serratia marcescens* および *Staphylococcus aureus* の 1 白金耳を夫々 0.5% 蔗糖ブイオン培地に接種して 37°C に培養した。この培養液 20ml を容量 200ml の丸底コルペンに採り、2 孔を有するゴム栓を附し、その 1 孔に上端は水蒸気発生用のコルペンと連結し下端は殆どコルペンの底部に達するガラス管を挿入する。他孔にはリーピツヒ冷却器と連絡するガラス管を挿入する。かくして激しく水蒸気を通じて揮発酸を蒸溜し、溜出後溜液 300ml をとる。溜液はフェノールフタレインを指示薬として N/10 苛性リタダによつて滴定し、全揮発酸を酢酸として表わした。(本法によれば蟻酸よりカプリル酸までの系列の脂肪酸はすべて定量される。)成績は第 4 図に示したが、*Escherichia coli* は単独培養で 0.5% 蔗糖ブイオンの揮発性脂肪酸 (起始 26mg%) の量を培養 18 時間後に 12mg% と減少し、次いで再び増量して 36 時間後には 37mg% と上昇しそのままの状態で推移する。本菌と E 型ボトリヌス菌の混合培養では培養時間の経過と共に脂肪酸量は順次増加する成績を示した。即ち 18 時間後には 85mg%, 24 時間後には 93mg%, 48 時間後には 115mg%, 72 時間後には 160mg% にも達した。*Staphylococcus aureus* の場合は単独培養では 12 時間後に 32mg% に達し、24 時間後には 17mg% と減少し、48 時間後には 27mg% ともとの量に戻ることを認めた。この菌と E 型ボトリヌス菌の混合培養では 18 時間後に 12mg% となり、48 時間後には 24mg% となつた。*Bacillus subtilis* の単独培養は培養 48 時間までは著しい増減が見られないがその後急激に増加して 100mg% に達した。かくの如く *Bacillus subtilis* と E 型ボトリヌス菌の混合培養では *Escherichia coli* と E 型ボトリヌス菌の混合培養時に認められたように培養時間の経過と共に増加した。即ち培養 12 時間後には 30mg%, 24 時間後に

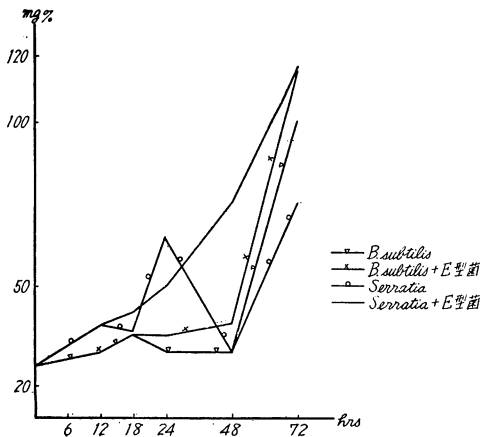
は35mg%, 48時間後には39mg%, その後急激に増加して72時間後には115mg%に達した。また *Serratia marcescens* は単独培養では2時間まで漸増して38mg% になり, 18時間後には減少して36mg% となり, 24時間後には65mg%, 48時間後には30%, 72時間後には75mg% と起伏が激しい。一方, E型ボトリヌス菌との混合培養では *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* の混合培養例に見られるように時間と共に脂肪酸量は増加した。即ち培養12時間後に38mg%, 18時間後に42mg%, 24時間後に50mg%, 48時間後に75mg%, 72時間後には117mg% に達した。

以上の成績を要約するにE型ボトリヌス菌の増殖が招来された *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* および *Serratia marcescens* との混合培養では発育のみられなかつた *Staphylococcus aureus* との混合培養およびこれら4種の好気性菌それぞれの単独培養時に比べ揮発性脂肪酸の産生量が著しく多いことが明らかになった。(第4図その1, その2参照)

第4図 揮発性脂肪酸の消長 その1



第4図 揮発性脂肪酸の消長 その2



最近安藤・井上(1958)はE型菌の栄養要求をしらべ, E型菌はA型菌又はB型菌と全く異り“Stickland reaction”によるエネルギー代謝は行わずむしろ糖の醗酵に依存していることを明らかにし, 更に安藤, 井上(1960)はE型ボトリヌス菌がその正常な代謝産物として酢酸および酪酸を著しく産生することを明らかにし, 更に中毒を起した「いずし」からは何れも酪酸を検出したが, 無毒の市販品には酪酸が証明されず酢酸のみ検出されることを報告している。

このように揮発性脂肪酸の著しい増量はE型ボトリヌス菌の増殖を示す一面の証拠であると言ひ得る。

第5節 E型ボトリヌス毒素に及ぼす好気性菌の影響

1 *Bacillus subtilis* の培養上清におけるE型ボトリヌス毒素の増強

既に実験3-1-2および3-2-2において, E型ボトリヌス菌岩内株が *Bacillus subtilis* と或いは *Serratia marcescens* と混合培養された場合は他の菌種との混合培養よりもその毒力が常に約10倍増強されることを観察した。(第4表および第6表参照)

既に阪口, 遠山(1955)は秋田県に発生したE型ボトリヌス中毒を検索した際, E型ボトリヌス菌と共に分離された *Clostridium* に属する一菌種(No. 13株)がE型ボトリヌス毒素を増強することを認め, この増強作用はNo. 13株の培養濾液中に含まれる酵素様物質がE型ボトリヌス菌々体にある前駆物質に作用して毒素を誘出するものであることを証明している。

このような業績に鑑み著者は *Bacillus subtilis* のE型ボトリヌス毒素増強作用が菌体を除去した培養液中に含まれるか否かについて検討を試みた。

本実験に用いた培地は10%大豆浸出液を基本として, これにPolypeptone 1.0%, Yeast extract およびブドウ糖をそれぞれ0.5%に加えpHを中性に調整したものである。本培地に *Bacillus subtilis* を接種し37°Cで2日間培養した後この培養液を8,000rpm 15分間遠心分離して菌体を除去し上清を得た。

一方E型ボトリヌス菌岩内株をチオグリコレート培地に37°C 24時間培養し, 遠心分離して上清を除去し, 菌体をpH 6.4のSørensen緩衝液に懸濁せしめた菌浮游液と上記の *Bacillus subtilis* の大豆培地培養上清とを等量に混じ37°C 1時間加温後, 混合物の毒力の増強の有無をマウス腹腔内接種によつて検討した。

その成績は第8表に示す通りで, *Bacillus subtilis* の培養上清を添加した混合液では接種後4時間にして50倍稀釈までマウスを斃すが, 上清非添加混合液(対照として上述の大豆培地を等量添加した)では5倍稀釈に止まり, 接種後7日では上清添加混合液では100倍稀釈, 非添加混合液では倍稀釈まで致死せしめる成績を得た。即ち上清を添加したものは非添加に比べ明らかに毒力の増強が認められ,

阪口等の No. 13 株を用いての毒力増強作用と同一傾向の成績が得られた。

第 8 表 E 型ボロ菌体浮游液に *B. subtilis* 培養上清を添加した場合の E 型毒素の増強
注射後 4 時間のマウスの斃死状況

毒素	稀釈	1 : 5	1 : 10	1 : 10	1 : 100
上清加		● ●	● ●	● ●	○ ○
上清なし		● ●	○ ○	○ ○	○ ○

注射後 7 日のマウスの斃死状況

毒素	稀釈	1 : 5	1 : 10	1 : 10	1 : 100
上清加		● ●	● ●	● ●	● ●
上清なし		● ●	● ●	● ●	○ ○

註 ● : マウス斃死, ○ : 生残

2 *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* および *Escherichia coli* の蛋白質分解能

上述の如く阪口、遠山 (1955) は初めて *Clostridium* に属する一菌株 (No. 13 株) の産生する酵素様物質が E 型ボトリヌス菌の毒素増強作用を有することを明らかにしたが、次いで Duff, Wright & Yarinsky (1956) はトリプシンが、また中川 (1960) は蛋白質分解能の強い *Clostridium sporogenes* および A 型ボトリヌス菌が E 型ボトリヌス毒素を増強することを報告するに至つた。

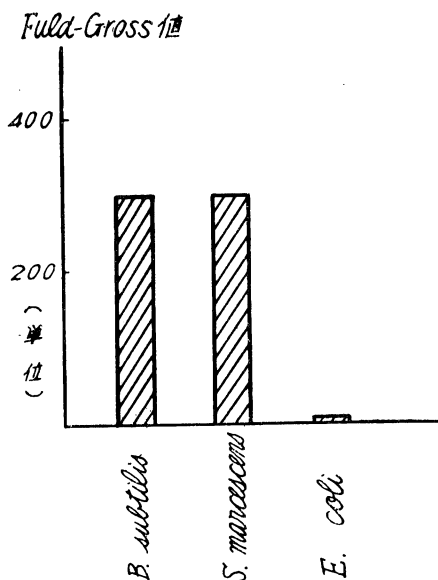
著者は 3-1-2 および 3-2-2 に述べたように E 型ボトリヌス菌と好気性菌との混合培養において、*Bacillus subtilis* および *Serratia marcescens* が E 型ボトリヌス毒素を増強することを認め、更にこの毒素増強作用は *Bacillus subtilis* の培養上清に含まれることを証明したが、この作用は恐らく該菌の蛋白質分解酵素によるものと推定し、*Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* および *Escherichia coli* の培養上清の蛋白質分解を Fuld-Gross 法によつて測定した。

本研究では Fuld-Gross 法は次の如く実施した。即ち上記大豆培地に *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* および *Escherichia coli* を夫々接種し 37°C 48 時間培養した。これらの培養液を 8,000rpm 15 分間遠心して得た上清を供試液とした。小試験管数本に適当に稀釈した供試液を 0.1, 0.2, …… 1.0ml 宛加え更に蒸留水を加えて全容を 1ml とする。この小試験管を 37°C の恒温槽に 30 秒おきに逐次浸し、約 3 分間経過後 37°C に加温した 0.12% カゼイン溶液 (カゼインはメルク製品を使用、M/10 の磷酸ソーダ液に溶解後 pH を 6.8 に調節) 5ml 宛同じく 30 秒おきに吹き込んで直ちに振盪し、反応を開始する。0.12% カゼイン溶液添加後正確に 1 時間開を経た後、酢酸酒精液 (48% のエタノール溶液 99ml と酢酸 1ml の混合液) 1ml を吹き込み反応を停止させると共に濁濁状態を観察し、完全に濁濁を認めなくなるまで分解するに要した最小酵素量を求めた。

本実験では上記条件下で 0.1% カゼイン溶液 1ml を完全に酢酸酒精液に可溶化する酵素力を 1 単位とした。

その成績は第 5 図に示す如く、*Escherichia coli* の上清は蛋白質分解能を殆んど欠除するのに反し、*Bacillus subtilis* および *Serratia marcescens* の Fuld-Gross 値は 300 単位を示し、蛋白質分解能が顕著であることが認められた。即ち *Bacillus subtilis* および *Serratia marcescens* の毒素増強作用と Fuld-Gross 値 (蛋白質分解能) との間には平行関係が成立し、蛋白質分解酵素が E 型ボトリヌス菌体内に存する阪口の言う “Precursor” 又は Duff らの言う “Protoxin” を活性化して毒素を産生するという諸説に支持を与えるものと思う。

第 5 図 *B. subtilis*, *S. marcescens* および *E. coli* の蛋白質分解能の比較



3 E 型ボトリヌス毒素の安定性に及ぼす pH の影響

細菌の発育に伴い、その代謝産物によつて培地の pH に変動を来たすことは前実験によつて既に明らかである。従つて E 型ボトリヌス毒素に対する各種好気性菌の影響即ち E 型毒素を含有する培地に細菌が発育することにより、該毒素が如何に変化するかを検討する前に、まず E 型ボトリヌス毒素の安定性に及ぼす pH の影響を明らかにする必要がある。

この方面の研究では A および B 型毒素については既に 2, 3 の報告がみられる。

Bronfenbrenner & Schlesinger (1924) はボトリヌス毒素が経口投与で毒性を発揮する唯一の菌体外毒素であることから、胃液および腸液の影響を明らかにするため、各段階の pH における A 型ボトリヌス毒素の変化を検討し、該毒素がアルカリ側で不安定であるのに反し、酢酸性域では破壊もされず減弱もしないことから、ボトリヌス毒素は胃と十二指腸上部より吸収されるものと推定した。また E 型ボトリ

ヌス毒素について三宅 (1957) はAおよびB型同素と同じように酸に対してはアルカリ対するよりも安定であることを報告している。しかしながらその実験は1規定の塩酸および炭酸ソーダでE型ボトリヌス毒素を処理した成績であつて弱アルカリおよび弱酸の作用についてはなお検討の余地がある。

著者はE型ボトリヌス菌岩内株を Duff *et al* (1956) の培地に接種し 20°C で7日間培養し、これをザイツ濾過器で濾過して、E型ボトリヌス毒素を得た。この毒素液1に対し各pHを有する Sørensen 緩衝液9を混合してpH5.4, 6.5, 7.4 および8.4に調整し、これを25°Cに保ち経日的にそれぞれの毒力をマウス接種によつて測定した。

その成績は第9表に示す通りで、pH8.4では当初約320 M.L.D./mlの毒力を示した毒素は急速に不活性化され1日後には80M.L.D./ml以下となり、2日後には20M.L.D./ml以下となつた。pH7.4では経日的に漸減し、1日後には80M.L.D./ml、2日後と4日後には40M.L.D./ml、7日後には20M.L.D./ml、10日後には20M.L.D./ml以下に低下した。これに反し、酸性域のpH6.5および5.4では7日後も略々原毒力を維持するが、10~14日後には軽微ながら減

第9表 E型ボトリヌス毒素の安定性におよぼす pHの影響

pH	稀釈日	稀釈					
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
8.4	0				●●●●	●●●●	○○○○
	1			○○○○	○○○○	○○○○	○○○○
	2	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○		
7.4	0				●●●●	●●●●	○○○○
	1			●●●●	○○○○	○○○○	○○○○
	2	●●●●	●●●●	○○○○	○○○○		
	4	●●●●	●●●●	○○○○	○○○○		
	7	●●●●	○○○○	○○○○			
	10	○○○○	○○○○				
6.5	0				●●●●	●●●●	○○○○
	1			●●●●	●●●●	●●●●	○○○○
	2		●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	
	4		●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
	7	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○
	10	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○
	14	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
5.4	0				●●●●	●●●●	○○○○
	1			●●●●	●●●●	○○○○	○○○○
	2		●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	
	4		●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
	7	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○
	10	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
	14	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	

注 ●：マウス斃死，○：生残，⊗：発症せるも生残

弱する傾向を示した。またアルカリ域においてはpHの差異，即ちpH8.4と7.4においてE型ボトリヌス毒素の安定性に顕著な差異が認められるが，酸域即ち6.5と5.4では頗る安定した態度が認められた。

本成績からE型ボトリヌス毒素も従来の報告にみられるAおよびB型毒素と同様にアルカリ域では著しく不安定で酸域では安定であることが明らかになつた。

4 E型ボトリヌス菌全培養に及ぼす腐敗細菌の影響

前述の如く，阪口，遠山 (1955) はE型ボトリヌス中毒の原因となつた「いずし」からE型菌と共にNo. 13株なる*Clostridium*に属する一非病原菌を分離し，この菌がE型ボトリヌス菌と共生するとE型ボトリヌス毒素産生を増強することを報告しており，また中川 (1960) は*Clostridium sporogenes* およびA型ボトリヌス菌のそれぞれの培養をE型ボトリヌス菌岩内株の培養と混合して，更に培養するとE型毒素が増強することを報告している。

かくの如くE型ボトリヌス菌の全培養におよぼす嫌気性菌の影響については既に2, 3の研究が行われたが，好気性菌については未だ報告がない。

著者は3-5-1および3-5-2において蛋白分解性を有する好気性菌がE型菌毒素を増強することを明らかにし得たが，更に進んで各種の腐敗細菌がE型ボトリヌス菌の全培養に如何なる影響を及ぼすかを検討した。

E型ボトリヌス菌岩内株を Duff *et al* (1956) の培地に接種し 37°C 3日間培養して菌体が沈下した後，上清を捨て濃厚菌液を得た。腐敗細菌は緩衝ブイヨンに接種し 25°C 3日間培養した。かくしてE型ボトリヌス菌岩内株の濃厚菌液と腐敗細菌の培養をそれぞれ1:9の割合に混合し25°Cに4日間保つた後，これを遠心して上清を得た。この上清についてpHおよびマウス接種による毒力測定を実施した。対照はE型ボトリヌス菌岩内株の濃厚菌液1に対し菌を接種していない緩衝ブイヨン9を加え25°C4日間培養したものである。その成績は第10表に示す通りで，対照の毒力は混合直後に160 M.L.D./ml，培養後には40 M.L.D./mlを示したが，E型ボトリヌス菌と*Achromobacter cycloclastes*の混合培養の毒力は320M.L.D./mlを示し明らかに毒力の増強を認め得たが，*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* および *Retterella sp.*との混合培養では160 M.L.D./mlに止まり，原毒力を維持することが観察され，又 *Staphylococcus aureus* および *Proteus sp.*との混合培養の毒力は80M.L.D./mlを示し毒力の増強ないしは維持する作用を認めなかつたが，対照に比べ毒力の低下は遅延する傾向がみられた。腐敗細菌のみの対照は *Pseudomonas aeruginosa*を除いてはいずれもマウスを斃さなかつた。

またこれらE型ボトリヌス菌と腐敗細菌の混合培養液のpHはすべてボトリヌス毒素が不活性化されるpH域即ち中性乃至はアルカリ性を呈するにもかかわらず，なお原毒

力を維持するか更に増強する傾向が認められた。

このようにE型ボトリヌス菌が腐敗細菌と共生する場合には培地のpHがE型毒素を破壊するpH域にあるにも拘わらずなお原毒力或いはそれ以上を維持する成績を示したことについてはその機序を未だ明らかになし得ないが、恐らく腐敗細菌の産生する酵素によってE型菌体内に含まれる“Protoxin”の活性化が毒素の補給に役立つているも

の如く想像される。

この実験では培養によるE型ボトリヌス菌の増殖を測定し得なかつたので毒性の増強がProtoxinの活性化によるものか或いは夫々の腐敗細菌との混合培養による菌の増殖の差異によるものかを決定することは出来なかつた。しかし後述の実験(3-5-6)からこれらの腐敗細菌がE型菌のProtoxinを活性化する作用を有することは明らかである。

第10表 E型ボトリヌス菌全培養に及ぼす腐敗細菌の影響

菌種	pH		稀				積	
	混合直後	3日培養後	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Staphylococcus aureus	6.9	7.0	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○	
Pseudomonas fluorescens	7.4	8.2	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
Pseudomonas aeruginosa	7.3	8.0	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
Flavobacterium sewanense	6.9	7.0	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
Achromobacter cycloclastes	7.0	7.2	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●○○○
Bacillus subtilis	6.9	7.5	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
Rettgerella sp.	6.9	7.5	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○	
Proteus SP.	7.0	7.5	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○	○○○○	
対照 (混合直後)	6.9		●●●●	●●●●	●●●●	●●○○	●○○○	
(培養後)			●●●●	●●●●	○○○○	○○○○	○○○○	

註 ●：マウス斃死，○：生残，⊗：発症せるも生残

5 E型ボトリヌス菌全培養に及ぼす腐敗細菌培養上清の影響

阪口、遠山(1955)は前述のNo.13株のE型ボトリヌス毒素活性化物質はその培養濾液に存在し、その作用機序および蛋白質様の性状から、このものは酵素であろうと報告している。

著者は前実験3-5-4において腐敗細菌の培養にE型菌濃厚浮遊液を混じた場合に毒素量は低下せずむしろ増量するという成績を得たので或いは培養上清中に毒素の活性化物質が含まれるのではないかと考え腐敗細菌の培養上清についてこの活性化作用の有無を追及するため次の如き実験を行った。

Duff et al (1956)の処方からチオグリコール酸ソーダを除去した培地を作り腐敗細菌を接種して25°C7日間培養し、これを遠心して腐敗細菌の培養上清を得た。E型ボトリヌス菌の全培養はDuff et alの培地に岩内株を接種し、25°C3日間培養して得た。

このE型ボトリヌス菌岩内株の全培養と腐敗細菌の培養上清を等量混合し、混合直後および25°C2時間保つた後、遠心分離を行い、その上清を用いてpH並びにマウス接種によって毒力の測定を行った。

成績は第11表に示す通りで、E型ボトリヌス菌全培養とPseudomonas aeruginosaの培養上清との混合液のpHは7.7を、Achromobacter cycloclastesの培養上清との混合液は7.0を示した以外はpH5.2~6.5であつてすべて酸

性を呈した。またその毒力は、混合直後にすべての混合液が対照(80 M.L.D./ml)と略々同程度乃至それ以下、即ち40~80 M.L.D./mlであつたのに対し、25°C2時間加温後にはStaphylococcus aureus Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa および Bacillus subtilisの上清との混合液の毒力は各々160 M.L.D./mlを示し若干毒力の増強する傾向が認められた。Flavobacterium sewanense, Achromobacter cycloclastes, Rettgerella sp. および Protous sp.の上清との混合液の毒力は80 M.L.D./mlで毒力の増強は著明には認められなかつた。かくの如く、これら腐敗細

第11表 E型ボトリヌス菌全培養に及ぼす腐敗細菌培養上清の影響(混合直後) その1

菌種	稀			
	1:10	1:20	1:40	1:80
Staphylococcus aureus	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○
Pseudomonas fluorescens	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○
Pseudomonas aeruginosa	●●●●	●●●●	○○○○	○○○○
Flavobacterium sewanense	●●●●	●●●●	○○○○	○○○○
Achromobacter cycloclastes	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○
Bacillus subtilis	●●●●	●●●●	○○○○	○○○○
Rettgerella sp.	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○
Proteus sp.	●●●●	●●●●	●○○○	○○○○
対照	●●●●	●●●●	●●●●	○○○○

註 ●：斃死，⊗：発症せるも生残，○：生残

第11表 E型ボトリヌス菌全培養に及ぼす腐敗細菌培養上清の影響 (25°C 2時間後) その2

菌種	pH	稀				積	
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.2	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ○ ○	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6.5	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ○ ○	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.7	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	○ ○ ○	
<i>Flavobacterium sewanense</i>	6.4	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ○	○ ○ ○	
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	7.0	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ○ ○	○ ○ ○	
<i>Bacillus subtilis</i>	5.8	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●	○ ○ ○	
<i>Rettgerella sp.</i>	6.5	● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ○ ○	○ ○ ○	
<i>Proteus sp.</i>	5.7	● ● ●	● ● ●	● ● ○	○ ○ ○	○ ○ ○	
対照	6.1	● ● ●	● ● ●	● ● ●	○ ○ ○	○ ○ ○	

註 ● : 斃死, ○ : 生残

菌の培養上清をE型ボトリヌス菌培養と混合した場合、その毒力を増強する作用が混合直後にはなく、これを一定時間加温した後に初めて認められるのは注目すべき点であつて、おそらく腐敗細菌培養液の上清中に含まれる酵素様物質がE型菌菌体に作用して毒素活性化作用を営む結果と推定される。

6 E型ボトリヌス毒素に及ぼす腐敗細菌の影響

Dack (1926)はA型ボトリヌス毒素をBeef heart mediumに加え、これに*Cl. sporogenes*を接種して37°Cで培養するとA型毒素が徐々に減弱することを観察し、かかる毒素不活化作用は他の数種の蛋白質分解性および非分解性の*Clostridium*にも認められるが、この作用はpHの変化によるものではないことを報告している。またShearman, Stark & Stark (1927)はInfusion brothにA型毒素を加えて、これに腸内細菌を接種して20°Cで培養するとA型毒素は破壊され無毒になると報告している。更に同氏等(1928)は*Streptococcus lactis*および*Lactobacillus casei*が同様の作用を有することを明らかにしている。これらの研究にもとづいて著者は菌体を除いたE型ボトリヌス毒素を2, 3の培地に加え、これに腐敗細菌が発育した場合、E型毒素が減弱するか否かを検討した。

Duff *et al* (1956)の培地にE型ボトリヌス菌岩内株を接種し、25°Cで3週間培養した後、ザイツ濾過器を用いて濾別したE型毒素1容と緩衝ブイオン、普通ブイオンおよび0.5%ブドウ糖ブイオン9容をそれぞれ混合した培地を作り、これに腐敗細菌を接種して25°Cで培養した。かくして緩衝ブイオンは2日および7日後、普通ブイオンおよび0.5%ブドウ糖ブイオンは7日後にそれぞれの培養を遠心し、その上清についてpHおよびマウス接種による毒力の測定を行つた。

その成績は第12表、第13表および第14表に示した。

本成績によると、毒素加緩衝ブイオンにおいて対照はpH7.0で混合直後にその毒力は1,000M.L.D./ml、培養2日後に200M.L.D./ml、7日後に100M.L.D./mlであつたが、

Rettgerella sp. および *Proteus sp.* の発育した毒素加緩衝ブイオンの毒力は培養2日後に2,000M.L.D./ml、7日後に1,000 M.L.D./mlを示し、明らかに毒力の増強が認められた。また *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* および *Pseudomonas aeruginosa* の発育したものは培養2日後に、1,000M.L.D./ml、7日後に200M.L.D./mlの毒力を示し、*Achromobacter cycloclastes* および *Flavobacterium sewanense* の発育したものは培養2後および7日の後共に200M.L.D./mlの毒力を示して、これらの菌に原毒力を維持する傾向を認めた。一方、*Bacillus subtilis* の発育した毒素加緩衝ブイオンにおいては培養2日後に200M.L.D./ml、7月後に20 M.L.D./mlの毒力を有し、毒素の著しい減弱を認めた。またこれらの培養液のpHは *Staphylococcus aureus* の2日間培養が6.8、*Flavobacterium sewanense* の7日培養が6.9と酸性を示した以外すべてが7.0~7.8であつて弱アルカリ性を呈した。

上述の如く、毒素加緩衝ブイオンに腐敗細菌が発育すると、その反応はE型ボトリヌス毒素が減弱するアルカリ性を呈するにもかかわらずその毒力が増強ないしは維持されるが、これは腐敗細菌が阪口、遠山(1955)の所謂毒素前駆体を活性化し、アルカリで不活化された毒素を補うものと解される。

毒素加普通ブイオンにおいては、対照の毒力は混合直後は80M.L.D./ml、7日後は40M.L.D./mlであつた。一方 *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium sewanense*, *Rettgerella sp.* および *Proteus sp.* の発育したものでは培養7日後にその毒力は160M.L.D./mlで毒力の増強が認められ、*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* および *Bacillus subtilis* の発育したものでは7日後に何れも80 M.L.D./mlを示し毒力は維持されたが、*Achromobacter cycloclastes* の発育したものでは、40 M.L.D./mlとなり毒力は対照と同様に低下した。

毒素加ブドウ糖ブイオンにおいては、対照はpH6.7となりその毒力は混合直後に80M.L.D./ml、培養7日後に20M.L.D./

第12表 E型ボトリヌス毒素に及ぼす腐敗細菌の影響 (毒素加緩衝ブイオン)

菌種	培養日数	pH	稀 釈				
			1 : 10	1 : 50	1 : 100	1 : 500	1 : 1,000
Staphylococcus aureus	2	6.8	●●●	●●●	●●●	●●○	○●○
	7	7.0	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
Pseudomonas fluorescens	2	7.3	●●●	●●●	●●●	●●○	○●○
	7	7.7	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
Pseudomonas aeruginosa	2	7.3	●●●	●●●	●●●	●○○	○●○
	7	7.6	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
Flavobacterium sewanense	2	7.1	●●●	●●●	●○○	○●○	○●○
	7	6.9	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
Achromobacter cycloclastes	2	7.1	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
	7	7.2	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
Bacillus subtilis	2	7.1	●●●	●●●	●●●	○●○	○●○
	7	7.4	●●●	○●○	○●○	○●○	○●○
Rettgerella sp.	2	7.2	●●●	●●●	●●●	●●●	●●○
	7	7.8	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○
Proteus sp.	2	7.2	●●●	●●●	●●●	●●●	●○○
	7	7.3	●●●	●●●	●●●	●●○	○●○
対 照	0		●●●	●●●	●●●	●●●	○●○
	2	7.0	●●●	●●●	●●●	●○○	○●○
	7		●●●	●●●	○●○	○●○	○●○

註 ●：斃死，○：生残

ml となり日数の経過と共に次第に毒力低下を示した。かかる毒素加培地に *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter cycloclastes*, *Bacillus subtilis* および *Rettgerella sp.* が発育すると培養7日後に 160M.L.D./ml となつて対照に比べ

第13表 E型ボトリヌス毒素に及ぼす腐敗細菌の影響 (毒素加普通ブイオン)

菌種	pH	稀 釈			
		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Staphylococcus aureus	7.1	●●●	●●●	●●○	●○○
Pseudomonas bluorecens	7.5	●●●	●●●	●●○	○●○
Pseudomonas aeruginosa	7.3	●●●	●●●	●●●	●●○
Flavobacterium sewanense	6.8	●●●	●●●	●●●	●●●
Achromobacter cycloclastes	7.0	●●●	○●○	○●○	○●○
Bacillus subtilis	6.9	●●●	●●●	●●○	○●○
Rettgerella sp.	7.1	●●●	●●●	●●●	●●○
Proteus sp.	6.9	●●●	●●●	●●●	●●●
対 照	6.5	(混合直後)	●●●	●●●	○●○
		(培養後)	●●●	○●○	○●○

註 ●：斃死，○：生残，⊗：発症せるも生残

第14表 E型ボトリヌス毒素に及ぼす腐敗細菌の影響 (毒素加ブドウ糖ブイオン)

菌種	pH	稀 釈			
		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Staphylococcus aureus	4.8	●●●	●●●	⊗○○	○○○
Pseudomonas bluorecens	7.3	●●●	●●●	●●○	○●○
Pseudomonas aeruginosa	7.3	●●●	●●●	●●○	●●●
Flavobacterium sewanense	6.3	●●●	●●●	○●○	⊗○○
Achromobacter cycloclastes	7.1	●●●	●●●	●●○	●●○
Bacillus subtilis	6.7	●●●	●●●	●●●	●●●
Rettgerella sp.	4.9	●●●	●●●	●●●	●●●
Proteus sp.	4.8	●●●	●●●	●●○	○●○
対 照	6.7	(混合直後)	●●●	●●●	○●○
		(培養後)	●●○	○●○	○●○

註 ●：斃死，○：生残，⊗：発症せるも生残

著しく毒力は増強しており、*Pseudomonas fluorescens* および *Proteus sp.* が発育すると培養7日後に 80M.L.D./ml となつて原毒力を維持しており、*Staphylococcus aureus* および *Flavobacterium sewanense* は7日に 40M.L.D./ml と

なり緩慢な毒力低下がみられた。

以上種々な毒素栽培地に腐敗細菌を发育せしめた結果、対照が培地のアルカリ性によつて毒力の低下を示したにも拘わらず菌の種類によつては培養7日後において原毒力の維持もしくは増強が認められ、これら腐敗細菌が培地に添加した毒素液中に含まれ Protoxin を活性化すると解せられる成績を示した。

7 腐敗細菌の蛋白質分解能

現在E型ボトリヌス毒素の産生機序はまず菌体内に毒素の前駆体である無毒の所謂“Protoxin”が形成され、このものが活性因子“Activator”によつて活性化され毒素に変化するものと解されているが、この活性因子として細菌の産生する蛋白分解酵素およびトリプシンが明らかになっている。(阪口、遠山(1955), Duff, Wright & Yarinsky (1956))

著者は上述の実験成績から腐敗細菌がE型ボトリヌス毒素の減弱を防止しないしは増強する作用、即ち活性化作用を有することを認めたのでその原因を追究するためこれらの菌の蛋白質に対する作用を検討した。その方法は下記の培地に腐敗細菌を接種し25°Cで1カ月間にわたり、培養期間中の水分蒸発を防ぐため、綿栓をゴムキャップで被覆して培養を続けた。

A ゲラチン：腐敗細菌の发育した普通ブイヨンに硬化ゲラチンを入れ、更に培養を続ける。ゲラチン液化陽性の場合には炭末が流出する〔坂崎、波岡(1956)〕。

B 凝固血清：新鮮な馬血清と普通ブイヨンを3：1の割合で混合し、中試験管に分注して斜面とし85°C1時間3回間歇滅菌した。陽性の場合凝固血清が融解して斜面が崩壊する。

C 卵白：普通ブイヨンに凝固卵白の細片を加え120°C20分間高圧滅菌した。卵白片を透明化するものを陽性とした。

D 牛乳：脱脂粉乳を10%に溶解し100°C15分間3回間歇滅菌した。ペプトン化して本培地を透明にするものを陽性とした。

E カゼイン：腐敗細菌の25°C48時間培養を数回凍結乾燥を繰返し、この遠心上清を供試酵素液とした。基質はカゼイン(Merk)1.2gr.を0.05M Na₂HPO₄溶液160mlに溶解しpH6.3に調整した。かくして酵素液1mlを基質溶液5mlと混合し25°Cで48時間保つた後、未分解のカゼインを沈澱せしめて濾別した。この濾液にFolin試薬を加えて発色させ、分光光度計を用いて産生された低級ペプチドおよびアミノ酸量を測定した。かくして対照と比較しアミノ酸および低級ペプチドの増量を認めたものを蛋白質分解能陽性と判定した。

その成績は第15表に示す通りで、*Staphylococcus aureus* 及び *Proteus sp.* はゲラチン及びカゼインを、*Pseudomonas fluorescens* はゲラチン、凝固血清及び牛乳を、*Pseudomonas*

aeruginosa および *Bacillus subtilis* は本実験に供されたすべての蛋白質を分解することが明らかになった。また *Flavobacterium sewanense* は凝固血清のみを、*Retterella sp.* はカゼインのみに作用することが判つた。*Achromobacter cycloclastes* には上記の実験方法で蛋白質分解能を認め得なかつた。

以上の成績から、供試された腐敗細菌は *Achromobacter cycloclastes* を除き、何れも蛋白質分解能を有する。本成績を実験3-5-4, 5および6の成績と対比すると多種類の蛋白質に作用する性状を有する菌種程、E型ボトリヌス毒素を活性化する傾向が強いことを示した。即ちこれら腐敗細菌のE型ボトリヌス毒素活性化作用はその蛋白質分解能に密接な関連を有するものと解し得る。この点を更に実証する目的で次項において微生物より純粋に得られた蛋白分解酵素である Pronase-AS を用い毒素の活性化作用の有無を検討した。

第15表 腐敗細菌の蛋白質分解能

菌種	ゲラチン	凝固血清	卵白	牛乳	カゼイン
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>Flavobacterium sewanense</i>	-	±	-	-	-
<i>Achromobacter cycloclastes</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Retterella sp.</i>	-	-	-	-	+
<i>Proteus sp.</i>	+	-	-	-	+

8 *Streptomyces griseus* の精製蛋白分解酵素によるE型ボトリヌス毒素の活性化

Duff, Wright & Yarinsky (1956) はトリプシンがE型毒素を活性化することを、また Bonventre & Kempe (1959) はトリプシン並びにペプシンがAおよびB型毒素を活性化することを報告している。一方著者は上述の実験において蛋白質分解能を有する好気性腐敗細菌にE型ボトリヌス毒素を活性化する傾向を認めたが、次いで *Streptomyces griseus* の産生する蛋白分解酵素を精製した Pronase-AS (科研化学株式会社) がE型ボトリヌス毒素を活性化するか否かを検討した。

供試酵素液は市販の Pronase-AS を0.25%にpH6.3のSørensen緩衝液に溶解した。また比較のため、トリプシン(Difco, 1:250)を同じ緩衝液に2%に溶解した。この2種の酵素液および対照として酵素を含まない緩衝液をそれぞれE型ボトリヌス菌岩内株のDuff *et al* (1956)の培地37°C24時間培養と等量に混合し、37°C1時間保つた後、マウスを用いて毒力を測定した。

その成績は第16表に示す通りで、酵素の作用を受けない毒素液の毒力は10M.L.D./ml以下であつたのに対し、トリ

ブシンの作用を受けたものは2,000M.L.D./ml, Pronase-ASの作用を受けた毒素液の毒力は200M.L.D./mlに達した。即ち Pronase-AS もまたトリブシン同様E型ボトリヌス毒素を活性化することが明らかになった。唯その作用は本実験に用いた条件ではトリブシンより弱い。即ち Pronase-AS のE型ボトリヌス毒素活性化作用は37°C 2時間で原毒力を約100倍増強することが知られた。更にE型ボトリヌス菌岩内株を Duff *et al* (1956) の培地に37°C 48時間培養し、この培養液と上記の Pronase-AS 溶液を等量混合し、37°C に保つて経時的にその毒力をマウス接種によつて測定した結果、混合直後に200M.L.D./mlを示した毒力が作用後1時間で2,000 M.L.D./ml, 作用後2時間で20,000 M.L.D./ml, 作用後2時間では同じく20,000M.L.D./ml, に達した。(第17表参照)

第16表 Pronase-AS による E 型ボトリヌス毒素の活性化

処置	稀釈	1 : 10	1 : 100	1 : 1,000	1 : 10,000
Pronase AS		●●●●	●●●●	○○○	○○○
Jrypsin		●●●●	●●●●	●●●	○○○
捕処置		○○○	○○○	○○○	○○○

註 ●：斃死，○：生残

第17表 Pronase-AS の E 型ボトリヌス毒素活性化に及ぼす作用時間の影響

時間	稀釈	1 : 10	1 : 100	1 : 1,000	1 : 10,000	1 : 100,000
1		●●●●	●●●●	○○○		
1		●●●●	●●●●	●●○		
2		●●●●	●●●●	●●●	●●○	○○○
4		●●●●	●●●●	●●●	●●●	○○○

註 ●：斃死，○：生残

本成績から *Streptomyces griseus* の精製蛋白分解酵素もトリブシン同様、著しくE型ボトリヌス毒素を活性化することが明らかになった。

「いずし」の原料である魚および野菜等はその取扱いの上から土壌由来の菌に汚染され易いことは想像に難しくなく、従つて土壌細菌たる *Streptomyces* 属菌による汚染も当然考えられ、「いずし」中のE型毒素産生に大きな影響を及ぼすことが推定される。

第4章 総括並びに考按

E型ボトリヌス菌は最初ロシアにおいて蝶鮫より分離され、Gunnison, Cummings & Meyer (1936) によつて同定された。

その後、世界において本菌によるE型ボトリヌス中毒は1960年までに51件におよんでいるが、所謂“Fish-Borne

Botulism”と称されるように、1941年サンフランシスコにおいて mushroom の罐詰を原因食品として発生した一例を唯一の例外として、すべて水産物を原料とする食品を介して発生している。このうち、わが国では中村、飯田、佐伯(1952)の報告以来、北海道および東北地方に33例の発生をみたが、その殆んどが「いずし」を原因食品として

わが国のE型ボトリヌス中毒が何故このように「いずし」によつて起り易いかについては3つの原因が考えられる。第1に「いずし」は生の魚肉を原料とするものであり、この魚肉は容易にE型ボトリヌス菌芽胞によつて汚染される。既に中村、飯田、佐伯、神沢(1954)は北海道の海岸地方の砂中にE型菌芽胞が高率に検出されることを報告している。また神沢(1960)は北海道の河川の流域の土壌中にもE型菌芽胞の広く分布していることを明らかにした。これらの土壌が魚の陸揚げに際して容易に魚肉を汚染し得ることは十分考え得る。

第2に一旦E型菌芽胞によつて汚染された魚肉は、本菌の発芽、増殖および毒素産生に好適な培養基となり得る。特に鮮度の低下に伴つて魚肉の酸化還元電位が速かに低下し、本菌の発芽、増殖に好適な条件を与えることは安藤・井上(1957)によつて報告されている。もともと「いずし」には魚肉をはじめ野菜、こうじ等に附着している多数の細菌が含有され、これらが「水晒し」乃至「熟成」の過程においてE型菌の増殖および毒素産生に影響をおよぼす可能性のあることは当然考え得る。

第3に「いずし」という食品は一種の漬物でその製造から摂取までの全程において全く加熱処理を受けないという事実が、本中毒の発生を容易にしているものと考えられる。E型ボトリヌス毒素が他の型のボトリヌス毒素と同様加熱によつて容易に不活性化されるという事実は Prévot & Brygoo (1953) その他の報告並びに著者が北海道に発生したE型ボトリヌス中毒を検索した際、原因食品の「いずし」の生食塩水乳剤の遠心上清はそのままではマウスの腹腔内に注射するとE型ボトリヌス毒素によつてマウスを斃死せしめるが、これを80°C 20分間加熱したものは全く中毒作用を示さなかつた成績からも明らかである。

この3つの原因のうち第1、および第3の原因については既に上記の文献に報告されたような詳細な研究がある。しかしながら第2の原因、即ち魚肉がE型ボトリヌス菌の増殖、毒素産生に好適な条件を具えていることに関しては、必ずしもその全貌が明らかにされていないこれは魚肉の含有する各種栄養素の問題と共に、これに分布する各種好気性乃至嫌気性細菌の活性という面からも詳細に検討されなければならない問題であろう。即ち種々の材料と共に「いずし」の中に混入する各種の好気性並びに嫌気性の細菌がE型ボトリヌス菌の発芽、増殖および毒素産生に如何なる影響をおよぼすかについては僅かに阪口、遠山(1955)お

よび中川 (1960) が一部の嫌気性菌について観察しているに過ぎない。

著者はこの点に注目して E 型ボトリヌス菌岩内株の増殖、毒素産生および毒素に対する各種の好気性菌の影響を詳細に検討した。

第1にこれら好気性菌の増殖が培地の酸化還元電位に及ぼす影響である。

普通ブイヨンのような酸化還元電位の高い培地において E 型ボトリヌス菌は単独で発芽、増殖出来ないが、この培地に好気性菌が発育すると好氣的条件下でも E 型ボトリヌス菌が増殖し得るような酸化還元電位の低下安定を来たすようになる。このような現象は既に、1861 年 Pasteur が最初の偏性嫌気性菌として分離された *Vibrio butyricus* を発見したときに注目した点である。その後 Roux (1887) は hay-bacillus を用いて *Vibrio septique* を培養し、Novy (1898) は *Bacillus novy* の培養に共生菌として *Bacterium acidilactici* および球菌を用い、良好な成績を得たと述べている。また Smith (1898) (1908) はジフテリア毒素を得る際、ブイヨンの滅菌を耐過した破傷風菌の芽胞がジフテリア菌の菌膜形成後に発芽増殖することを報告している。その後も Proca (1907), marino (1910), Torry (1917), Koser & McClelland (1918), Wilson & Steer (1918), Sturges & Rettger (1919), Dickson & Burke (1918) および Adamson (1919) 等が好気性菌を混合培養することによって偏性嫌気性菌を分離している。

しかし E 型ボトリヌス菌が増殖し毒素を産生し得るには単に培地の酸化還元電位の低下のみでは不充分で、蔗糖乃至はブドウ糖のように E 型ボトリヌス菌が醗酵し得る糖類を培地が含有していることが必要である。従つて E 型ボトリヌス菌は好気性菌と混合培養されても普通ブイオンにおいては増殖し得ないが、蔗糖ブイオン乃至はブドウ糖ブイオンでは増殖して毒素を産生する。この点 Hall & Peterson (1923) の普通ブイオンに A 型ボトリヌス菌と好気性菌を混合培養して A 型毒素を産生せしめ得たという成績とは異なる。これは安藤、井上 (1958) が指摘するように E 型菌の栄養要求が A および B 型菌のそれと異なるためであると解し得る。即ち彼等は E 型ボトリヌス菌がその増殖のエネルギーを A および B 型菌に比べ強く糖の醗酵に依存することを明らかにし、醗酵し得る糖類の培地に存在しない場合には E 型菌の増殖の起らないことを報告している。

第2に好気性菌の増殖が培地の pH に及ぼす影響である。上述の実験成績から明らかなように混合培養に用いた好気性菌が *Staphylococcus aureus* の如く 37°C において培地の糖を分解して急激に酸を産出する菌種である場合には酸化還元電位の条件が満足されても E 型ボトリヌス菌は増殖することが出来ない。これは培地の pH が速かに E 型ボトリヌス菌の発育し得ない pH 以下に達するためである。このことは次のような条件下で E 型ボトリヌス菌の増殖およ

び毒素産生が認められる事実から推定し得る。

1 肝マブイオンに E 型ボトリヌス菌と *Staphylococcus aureus* を混合培養した場合。

2 *Staphylococcus aureus* が発育して酸性となつた蔗糖ブイオンの pH を中性に修正して、これに E 型ボトリヌス菌を接種した場合。

3 0.5 % ブドウ糖ブイオンに E 型ボトリヌス菌と *Staphylococcus aureus* を混合培養し 25°C に保つて *Staphylococcus aureus* の酸産生を緩徐にした場合。

これに反して培地の糖を分解しない菌或いは分解しても酸産生の弱い菌との混合培養では E 型ボトリヌス菌は増殖して毒素を産出するが、このような好気性菌の一部のものには更に産生された E 型ボトリヌス毒素の毒力を増強する傾向を認めた。

次に E 型ボトリヌス菌の増殖に伴う揮発性脂肪酸の産生の問題である。

著者は北海道において発生した E 型ボトリヌス中毒を検索する機会に屢々遭遇し、その都度検索成績を報告し来つた。その際、原因となつた「いずし」が正常のものに比べ酪酸様の不快臭を放つ事実を認め得たが、本実験においても好気性菌との混合培養において E 型ボトリヌス菌が発育した場合、多量の揮発性脂肪酸が蓄積し酪酸臭を発することを観察した。

さて次には一旦産生された E 型ボトリヌス毒素に及ぼす各種好気性菌の影響である。上述の諸実験の成績の如く混合培養されると好氣的条件下において E 型ボトリヌス菌の発育および毒素産生を可能ならしめる菌種には、魚の常在菌である *Pseudomonas*, *Flavobacterium* および *Achromobacter* 属の菌が含まれ、*Bacillus subtilis*, *Proteus* および *Staphylococcus* 等一般に腐敗細菌と認められている好気性菌もまた同様の作用を有することを認めた。

即ちこれらの腐敗細菌は 0.5 % ブドウ糖ブイオンにおいて 25°C で E 型ボトリヌス菌の増殖および毒素産生を可能ならしめるのみならず、更に蛋白質分解能を有し、既に産生された E 型ボトリヌス毒素を活性化することが判つた。また *Bacillus subtilis* には活性化作用と共に毒素を破壊する傾向も認められたが、これは次のような理由によるものであろう。

現在ボトリヌス毒素は菌の発育に伴う代謝産物ではなくて菌体そのものの中に無毒の前駆物質 Precursor 又は Protoxin として産生され、これが蛋白分解酵素によつて毒素に変更し更に作用が進むと破壊されて毒力が減弱することが既に解明されている。即ち阪口、遠山 (1955) は *Clostridium* 属の雑菌 No. 13 株の E 型毒素産生増強の機構について研究した結果、E 型ボトリヌス菌は菌体中には毒素前駆体を産生するがこれが毒素に変化するには“活性化”なる機構が必要であり No. 13 株は E 型毒素の活性化に必要な酵素を提供するという結論に達した。この活性化なる新

しい概念は更に Duff, Wright & Yarinsky (1956) のトリプシンによる同じ作用の発見で確認された。

また E 型毒素が A および B 型毒素と異なる点の一つとして、E 型毒素の Protoxin の状態にある期間が A および B 型毒素のそれに比べ長いことがあげられる。この証左として Bonventre & Kempe (1959) はトリプシンおよびペプシンが 8 時間および 12 時間という幼若培養の A および B 型ボトリヌス毒素の毒力を増強するが、96 時間培養より得られたこれら両毒素にペプシンおよびトリプシンを作用せしめてもこの増強作用は認められず逆に毒力の減弱を来たすことを明らかにした。しかし 8 時間培養が活性化される比率は 12 時間培養のそれに比べ遥かに高いことおよびこれらの酵素は長時間作用すると毒素を破壊して毒力を減弱するが、この破壊作用はペプシンよりトリプシンの方が強力であることを報告している。更に *Clostridium sporognes* およびその他の *Clostridium* 属の菌は Daek (1926) によると A 型毒素を破壊すると報告されているが、一方中川 (1960) は *Clostridium sporognes* が E 型毒素を増強すると報告している。この相違した実験成績も両毒素の Protoxin の期間の長短に基因するものであると解し得る。既に Daek (1956) その他の成書に見られる如く、A および B 型菌の多くは強い蛋白質分解能を有するのに対し、E 型菌はすべて蛋白質分解能が著しく弱い。これは A および B 型菌の Protoxin が速かに Toxin に変化するのに対し、E 型菌の Protoxin の大部分は長く活性化を受けない状態に止まることの主なる原因と解される。事実 E 型菌の毒力を増強し得る各種の菌は一般に蛋白質を分解する性能を有しており、この蛋白質分解酵素が E 型菌の Protoxin を Toxin に活性化すると考えられる。微生物に由来する蛋白質分解酵素がこの活性化作用を有することは *Streptomyces griseus* の精製蛋白質分解酵素である Pronase-AS が著明な活性化作用を示すことから推定される。

要するにボトリヌス毒素が蛋白質分解酵素の作用を受けた場合、その中に Protoxin の状態のものが多ければその毒力は増強し、少なれば減弱するものと考えられる。

従つて *Bacillus subtilis* の作用はまず Protoxin を活性化して毒力を増強し、次いで毒素を破壊して毒力を低下せしめるものと解される。既に E 型の Protoxin を活性化する場合、trypsin は pH 6.0 附近において最も著明に活性化作用を示すが、本酵素の経過 pH であるアルカリ側の pH ではむしろ毒性の減弱を来す。これは至適 pH において trypsin が一旦 protoxin を活性化し、活性化された毒素が速かに分解されて不活性化されてゆくためであろうと解される。同じような現象が *Bacillus subtilis* の蛋白質分解酵素についても考え得るのではないかと推定される。

上述の如き種々な実験成績から「いずし」における好気性菌の果たす役割を推測するならば、これら好気性菌は魚肉内においてそれ自体の発育による酸素の消費によつて酸化

還元電位の低下安定を来たしこれが魚肉の自己消化による同様の現象と協力して E 型ボトリヌス菌の増殖を可能ならしめるものと考えられる。

このことは著者 (1956) がさきに E 型ボトリヌス菌岩内株芽胞を接種した魚肉を用いて実際に「いずし」を漬け、E 型ボトリヌス毒素の産生状況を観察した際、同じ方法で漬けられた「いずし」でも魚肉の鮮度を低下せしめたものには毒素が証明され、新鮮な魚肉を用いたものには毒素産生が見られなかつた事実からも裏書きされよう。

一方また *Staphylococcus aureus* の如く E 型ボトリヌス菌が必要とする糖を予め分解して酸を産生し、培地の pH を急速に低下せしめて E 型ボトリヌス菌の増殖を阻止する菌も存在する。更にこの増殖阻止は培養温度に左右されることが知られた。即ち 37°C においてはこの阻止作用は著明にみられるが、25°C においては認められなかつた。かくの如く培養温度が酸産生による E 型ボトリヌス菌の増殖阻止作用を支配することは、既に神沢、飯田 (1957) によつて一部行われている食品特に「いずし」における E 型ボトリヌス菌の増殖を乳酸菌によつて阻止せんとする試みにおいて、温度の影響を無視し得ぬという点で重大な示唆を与えるものと言えよう。

要するに材料と共に「いずし」の中に混入されるある種の好気性菌は、或いは魚の「水晒し」の時期に、或いは「いずし」の熟成の時期に魚肉の酸化還元電位、pH 等に影響を与えることにより E 型ボトリヌス菌の発芽、増殖を可能にし、且つ産生された毒素の前駆物質を活性化することによつてその毒性を高めるであろうことが十分に推測される。通常「いずし」から分離される E 型ボトリヌス菌が肝マブイオンその他の人工培地では A 型、B 型に比べ遥かに弱い毒素より産生し得ないのに対し、その実際の中毒の致命率が A 型或いは B 型の中毒と殆ど差異のない事実は人工培地中の毒素前駆体 Protoxin の大部分が活性化されない状態に止まっているのに対し、「いずし」中のそれは種々の嫌気性並びに好気性の細菌の蛋白質分解酵素の作用を受けて活性化が行われているためと考えられる。事実、阪口、遠山、斎藤、藤沢、和田 (1954) は 1953 年 10 月田県下の大王町に著生した川鯛の「いずし」による E 型ボトリヌス中毒を検索した際、分離した E 型ボトリヌス菌天王株の純培養の毒力が原因食となつた「いずし」の毒力より遥かに劣ることを見出している。しかし同時に「いずし」より分離された一共存菌 (No. 13 株) が E 型毒素を著明に増強することから本菌が「いずし」中において恐らく E 型毒素を増強したものと考へている。また一方では毒素の前駆体が消化管内の蛋白質分解酵素によつて活性化されその毒性を増すという可能性も考えられる。これについては既に Dolman, Darby & Lane (1955) がその可能性の存在し得ることを指摘している。例えば彼は最近 British Columbia の Prince Rupert

に起つた鮭の卵によるE型中毒の検索に際して、原因となつた魚卵及び死亡者の胃内容の毒性を調べた結果、E型毒素が一旦摂取されてから in vivo で略20~200倍に増強されたことを報告している。

「いずし」によるE型ボトリヌス中毒の発生の機序を解明するに当つては、これに含有される各種の好気性菌がE型ボトリヌス菌の発芽、増殖および毒素産生に及ぼす種々の影響を十分考慮に入れる必要があり、以上の実験成績はこれらの点の幾つかを明らかにし得たものと信ずる。

第5章 結 論

「いずし」によるE型ボトリヌス中毒に際し、材料と共に「いずし」に混入する種々の好気性菌がE型ボトリヌス菌の発芽、増殖および毒素産生に如何なる影響をおよぼすかを知るため、各種の好気性菌とE型ボトリヌス菌岩内株を混合培養して種々の実験を試み次の如き成績を得た。

(1) 酸化還元電位の高いブイヨンの如き培地においてE型ボトリヌス菌は単独で増殖し得ないが、これに好気性菌を混合培養すると培地の酸化還元電位の低下安定を来たすため、好気的条件下においてE型ボトリヌス菌の発芽は可能になる。

(2) E型ボトリヌス菌が発芽した後増殖し毒素を産生するには培地の酸化還元電位の低下安定と共に、該菌がエネルギー源として利用し得る糖を培地が含有していることが必要である。従つてE型ボトリヌス菌は好気性菌と混合培養されても普通ブイヨンにおいては増殖し得ないが、蔗糖ブイヨンおよびブドウ糖ブイヨンにおいては増殖して毒素を産生する。しかし *Staphylococcus aureus* は37°Cで培養されると、培地の糖を急激に分解してpHを低下するためE型ボトリヌス菌の増殖は阻止され、毒素の産生はみられない。しかし25°Cで培養された場合にはこのようなpHの急速な低下は起らずE型ボトリヌス菌の増殖及び毒素産生が起る。

(3) *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium sewanense*, *Achromobacter cycloclastes*, *Bacillus subtilis*, *Rettgerella* sp. および *Proteus* sp. を0.5%ブドウ糖ブイヨンにE型ボトリヌス菌と25°Cで混合培養するとE型ボトリヌス菌の増殖および毒素産生が可能になるばかりでなく、更に産生された毒素はこれらの菌によつてその毒性を増強される。

(4) *Streptomyces griseus* の精製蛋白分解酵素もトリプシンと同じくE型ボトリヌス毒素を活性化する。

(5) 以上の成績をもととして、「いずし」によるE型ボトリヌス中毒の発生に演ずる好気性菌の役割に関して二、三の考察を試みた。

即ち一般にこれらの好気性細菌はその増殖によつて「いずし」の原料となる魚肉の酸化還元電位を低下せしめボ

トリヌスE型菌の増殖を可能ならしめる。しかしあるものは速かにpHを低下せしめることによつてE型菌の増殖を阻止する。更に一旦魚肉中に産生されたE型菌毒素に対しあるものはその毒性を増強する方向に、またあるものはそれを減弱する方向に作用する。これら諸種の好気性細菌はこのように「いずし」によるE型ボトリヌス中毒の発生と密接な関連を持つことが知られる。

拙筆に臨み御懇篤な御指導と御校閲の労を賜つた北海道大学獣医学部教授平戸勝七博士並びに北海道立衛生研究所疫学科長飯田広夫博士に心から拝謝する。また本研究の機会を与えられると共に有益な御助言を戴いた北海道立衛生研究所長中村豊博士に厚く敬意を表する。なお貴重な菌株を御恵与された北海道大学農学部農芸化学科応用菌学教室、雪印乳業株式会社並びに東京大学応用微生物研究所の各位に対し謹んで感謝の意を表する。

文 献

- Adamson, R. S. (1919) : On the cultivation and isolation of *B.tetani*. *J. Path. & Bact.*, 23, 241.
- 安藤芳明, 井上勝弘 (1957) : 魚類食品におけるボトリヌスE型菌の発育と毒素産生に関する研究, I 魚肉における発育と酸化還元電位の関係について. *日本水産学会誌*, 23, 458~462.
- 安藤芳明, 井上勝弘 (1958) : 魚類食品におけるボトリヌスE型菌の発育と毒素産生に関する研究, II ボトリヌスE型菌の栄養要求について. *日本水産学会誌*, 24, 682~686.
- 安藤芳明, 井上勝弘 (1960) : 「いずし」におけるボトリヌスE型中毒発生防止に関する研究 (第4報), III 中毒「いずし」における酪酸臭について. *北海道立衛生研究所報*, 11, 22~24.
- 青森県衛生部 (1957) : 青森県のボトリヌス症について. 1~19.
- Bonventre, P. F. & L. L. Kempe (1959) : Toxicity enhancement of *Clostridium botulinum* Type A & B culture filtrates by proteolytic enzymes. *J. Bact.*, 78, 892~893.
- Bronfenbrenner, J. J. & M. J. Schlesinger (1924) : The effect of digestive juices on the potency of botulinus toxin. *J. Exp. Med.*, 39, 509~516.
- Dack, G. M. (1926) : Influence of some anaerobic species on toxin of *Cl. botulinum* with special reference to *Cl. sporogenes*. *J. inf. Dis.*, 38, 165~173.
- Dack, G. M. (1956) : *Food Poisoning* (The University of Chicago press), 3rd Edition, 63.
- Dickson, E. C. & G. S. Burke (1918) : A method of isolating *B. botulinus* from infected materials. *J. Am. Med. Ass.*, 71, 518~521.

- Dolman, C. E., H. Chang, D. E. Kerr & A. S. Shearer (1950) : Fish-borne and Type E Botulism : Two cases due to home-pickled herring. *Canad. J. Publ. Health*, 41, 215~229.
- Dolman, C. E., G. E. Darby & R. F. Lane (1955) : Type E Botulism due to salmon eggs. *Canad. J. Publ. Health*, 46, 135~141.
- Dolman, C. E. (1960) : Type E Botulism A hazard of the North. *J. Arc. Inst. North Amer*, 13, 230~256.
- Duff, J. T., G. G. Wright & A. Yarinsky (1956) : Activation of *Clostridium botulinum* Type E toxin by trypsin. *J. Bact.*, 72, 455~460.
- 江原勇藏, 大河原真藏 (1942) : *Clostridium botulinum* に関する研究 — 納豆生成菌との共成試験 — 雑誌時報, 21, 102~111.
- Edmondson, R. B., C. Thom & L. T. Giltner (1923) : Experiment with *B. botulinus* under household conditions. *Am. Food J.*, 18, 143~145.
- Francillon, M. (1925) : Einfluss der aeroben Mischinfection auf Entwicklung und Toxinbildung des *Bacillus botulinus*. *Arch. Hyg.*, 95, 121~139.
- Gunnison, G. B., J. R. Cummings & K. F. Meyer (1936) : *Clostridium* Type E., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 35, 278~280.
- Hall, I. C. & E. Peterson (1923) : The Effect of certain bacteria upon the toxin production of *Bacillus botulinus* in vitro. *J. Bact.*, 8, 319~341.
- Iida, H., Y. Nakamura, I. Nakagawa & T. Karashimada (1958) : Additional Type E Botulism outbreaks in Hokkaido, Japan. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 11, 215~222.
- 飯田広夫, 唐島田隆, 齋藤富保 (1961) : 最近北海道に発生した3例の「いずし」によるボトリヌスE型中毒例について. 北海道立衛生研究所報, 12 (本誌)
- 神沢謙三, 飯田広夫 (1957) : 「いずし」におけるボトリヌスE型菌の毒素産生阻止に関する実験的研究 (第2報). 北海道立衛生研究所報, 8, 33~38.
- 神沢謙三 (1960) : *Clostridium botulinum* Type E の生態学的研究. 北海道立衛生研究所報, 11, 161~173.
- 唐島田隆, 女鹿見道, 栗城篤治, 柳瀬瀨, 杉井孝雄, 小笠原和夫, 安藤和夫 (1956) : 「いずし」中におけるボトリヌスE型菌の毒素産生阻止に関する実験的研究 (第1報). 北海道立衛生研究所報 (特報5). 17~23.
- Kerner (1820, 22) : Cited from Jordan : *Botulism, General Bacteriology*, 404 (1922).
- 木俣正夫 (1948) : 食品保藏学 (朝倉書店), 58.
- 小松二郎, 細井昭藏, 藤沢宗一, 児玉栄一郎 (1958) : 昭和32年度E型ボトリヌス菌による食中毒の発生について. 秋田県衛生研究所報, 第4報, 21~27.
- Koser, A. S. & J. R. McClelland (1918) : The fate of bacterial spores in the animal body, *J. Med. Res.*, 37, 259~268.
- Mahmoud, A. S. & Z. L. Ordal (1955) : Studies on growth and toxin production of *Cl. botulinum* in a precooked frozen food. II. Inhibition by lactic acid bacteria, *Food Res.*, 20, 340~350.
- Marino, F. (1910)¹⁾ : Culture aérobie des microbes dits anaérobies, *C. R. Soc. Biol.*, 69, 247~249.
- 三宅英作 (1957) : ボトリヌス毒素に関する生物学的並びに免疫学的研究. 医学研究, 27, 2767~2784.
- 中川勇 (1960) : *Clostridium botulinum* Type E の毒素産生に関する実験的研究 (特に毒素の活性化について), 北海道立衛生研究所報, 11, 15~21.
- 中村豊, 飯田広夫, 佐伯潔 (1952) : 岩内郡島野村に起つたボトリヌス中毒について, 北海道立衛生研究所報 (特報), 1~18.
- 中村豊, 飯田広夫, 佐伯潔, 神沢謙三 (1954) : 北海道各地に発生したボトリヌス食中毒において. 北海道立衛生研究所報 (特報3). 1~37.
- Nakamura, Y., H. Iida, K. Sacki, K. Kanzawa & T. Karashimada (1956) : Type E Botulism in Hokkaido, *Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 9, 45~58.
- Novy, F. G. (1898) : Ein neuer anaerober *Bacillus* des Malignes Oedems, *Z. Hyg.*, 17, 209~232.
- Prévo, A. R. & E. R. Brygoo (1953) : Nouvelles recherches sur le Botulisme et ses cinq Types toxiques, *Ann. Inst. Past.*, 85, 544~575.
- Proca, G. (1907) : Sur l'emploi de milieux bacteriens stérilisés pour la culture des anaérobies, *C. R. Soc. Biol.*, 63, 620~621.
- Quortrup, E. R. & A. L. Holt (1941) : Detection of potential *Botulinus*-toxin-producing area in Western Duck Marshes with suggestion for control, *J. Bact.*, 41, 363~372.
- Quortrup, E. R. & R. L. Sudheimer (1943) : Some ecological relations of *Pseudomonas aeruginosa* to *Clostridium botulinum* Type C, *J. Bact.*, 45, 551~554.
- Roux, K. (1887) : Sur la culture des microbes anaérobies, *Ann. Inst. Past.*, 1, 49~62.
- Sakaguchi, G., Tohyama, Y., Saito, S., Fijisawa, S. & Wada, A. (1954) : An outbreak of type E botulism in Akita Prefecture due to giltered-izushi. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 1, 539~546.
- Sakaguchi, G. & Y. Tohyama (1955) : Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* Type E.
I. A strain of genus *Clostridium* having the action to promote Type E botulin toxin production in a mixed

- culture. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 8, 247~253.
- II. The Mode of action of the Contaminant organisms to promote toxin production of Type E Organisms.
- Jap. J. Med. Sci. & Biol.*, 8, 255~262.
- 坂崎利一, 波岡茂郎 (1956) : 腸内細菌検索法 (納谷書店). 38.
- Sherman, J. M., C. N. Stark & P. Stark (1927) : The destruction of botulinus toxin by intestinal bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 24, 546~547.
- Sherman, J. M., C. N. Stark & P. Stark (1928) : Destruction of botulinum toxin by milk bacteria. *J. dairy Sci.*, 11, 352~358.
- Smith, T. (1898) : One of the conditions under which discontinuous sterilization may be ineffective. *J. Exp. Med.*, 3, 647~650.
- Smith, T. (1908) : Some neglected factors in the biology of the tetanus Bacillus. *J. Am. Med. Ass.*, 50, 929~934.
- Sturges, W. S. & L. F. Rettger (1919) : Methods for the isolation and cultivation of *B. putrificus* and other obligate anaerobes. *J. Bact.*, 4, 171~175.
- Torry, J. (1917) : New differential plating methods for *B. bifidus* (Tisser) and *B. acidophilus* (Moro). *J. Bact.*, 2, 435~439.
- Wilson, W. & P. Steer (1918) : Points in the technique employed in the isolation and cultivation of anaerobic bacteria. *Brit. Med. J.*, 2, 568~569.
- Van Ermengem, E. (1897) : Cited from Hall, I. C. & E. Peterson (1923). *J. Bact.*, 8, 319.