

Clostridium botulinum の毒素産生に関する実験的研究

飯 田 広 夫*

緒 言

Clostridium botulinum の毒素産生の process は現在ほゞ次のように考えられている。すなわち、毒素は一旦毒性のない前駆体("pro-toxin")として菌体内に産生され、それが菌の産生する一種の蛋白分解酵素によつて活性化されて毒素分子になる。この活性化の現象は、Cl.bot. type E について先ず見出された。

Sakaguchi & Tohyama^(1,2)は、秋田県に発生したE型中毒の原因となつた「いずし」から、1株の嫌気性菌を分離し、この菌の培養濾液がE型菌の毒素を著明に増強する作用のあることを明らかにした。Duff, Wright & Yarinsky⁽³⁾は、trypsin が強いE型毒素の活性化を示すことを明らかにし、活性化はpH 6.0附近において最も著明に起ること、また活性化はtrypsin inhibitorによつて完全に阻止されることを報告した。Dolman⁽⁴⁾は、Cl.bot. type Eの変異について詳細な観察を行い、そのproteolytic mutants("TP" phase)が強い活性化を示すことを報告した。Dolman⁽⁵⁾は更に、この活性化がin vivoにおいても起ることを報告し、E型中毒においてはこの消化管内での毒素の活性化が、中毒のpathogenesisを考える上に重要なことを指摘した。Iida et al.⁽⁶⁾は、E型中毒の原因となつた「いずし」に含まれる毒素が、trypsin処理によつて100倍以上増強されることから、同様にin vivoにおける活性化がE型中毒においては重要であることを報告した。

このように、毒素の活性化という現象は主としてCl.bot. type Eについて詳細に研究され、更にその活性化のmechanismについても詳細に検討されているが、この現象は必ずしもE型のものではない。例えばBonventre & Kempe⁽⁷⁾は、A型及びB型についても、極めて若い培養のものを用いればtrypsinによる活性化が見られることを報告し、これらproteolyticの菌株ではproteinasesの産生が旺盛なため、活性化が速かに起るが、non-proteolyticのE型では、proteinasesの産生が弱いため毒素はいつまでも"protoxin"の形でとどまるのであろうと考えた。

Cl.bot. がその蛋白分解性の強弱によつて、proteolytic groupとnon-proteolytic groupとに区別されることはよく知られている。かつて前者はCl.parabotulinum、

後者はCl.botulinumと呼ばれたが(Bengston)⁽⁸⁾その後この名称は次第に用いられなくなり、現在ではその毒素の免疫学的な差異に従つて、Cl.bot. types A, B, C, D, E 及びFと呼ばれている。このうち、proteolytic groupに属するのは、types A, B, Fであり、non-proteolytic groupに属するのは、types C, D, E 及び一部のtype Bである。

著者は今回これら各型に属する菌株を用いて、その培養性状、蛋白分解酵素(gelatine分解酵素)及び毒素とその前駆体の産生過程を、培養日数を追つて検討して見たので、得られた成績をこゝに報告する。

実験材料並びに方法

菌株：実験に用いた株は次の通りである。

Proteolytic Group

Cl.botulinum type A, strain 190
" " type B, strain Lamanna
" " type F, strain Denmark

Non-proteolytic Group

Cl.botulinum type B, strain QC
" " type C, strain Stockholm
" " type C, strain 468
" " type D, strain 1873
" " type E, strain VH
" " type E, strain Iwanai
" " type E, strain Memanbetsu

培地：培地としては次の3種類のものを用いた。

Cooked meat 培地 (CM) 「栄研」
Thioglycollate 培地 (TGC) 「日産」
Peptone-Yeast Extract-Glucose 培地 (PYG)
Proteose Peptone (Difco) 2%
Yeast Extract (Difco) 2%
Glucose 0.2%
Na-thioglycollate 0.05%
Aq. dest. pH 7.2

培養：上記の各培地(各60ml)に上記の使用菌株を接種し、30℃に培養した。培養直前、1日目、3日目、5日目及び7日目に各培養試験管からsample(菌体+上清)をとり出し、実験に供するまで-20℃に凍結して保存した。但し、types C及びDの各菌株では、増殖が遅いため、培養直前、2日目、4日目、6日目、8日目にsampleをとった。

pH：培地のpHの変化はpHメーター(堀場製作

* 北海道立衛生研究所

作所)を用いて測定した。

混濁度: TGC培地及びPYG培地のsampleについては、その混濁度を光電光度計(Klett-Summerson)を用いて測定した。

蛋白分解性: 各sampleを磷酸緩衝液(PH 7.0)で倍数稀釈し、これに等量の10% gelatine (Merck)を加え、37°C 1時間放置後、氷室に移してgelatine 液化の有無を調べた。gelatineを液化する最高稀釈倍数をgelatine-unit (GU)として表わした。

Trypsin処理: Trypsin (Difco 1:250)を2%に磷酸緩衝液(pH 6.0)に浮遊せしめ、それを各培養液と等量混合して、37°Cに2時間置いた。対照は磷酸緩衝液(pH 6.0)と等量混合して、同様に37°C 2時間放置した。

毒性試験: 体重1.5~2.5 grのSwissマウスを用い、その腹腔内に各毒素(Trypsin処理及び対照)の稀釈液0.4 mlを注射してMLDを求めた。毒素の稀釈には0.2% gelatine 加磷酸緩衝液(pH 6.0)を用いた。

実験成績

I 混濁度

Proteolytic groupに属するtype A, strain 190及びtype B, strain LamannaをTGC培地に接種して30°C培養した場合の培地の混濁度の変化は、Fig. 1に示してある。

Fig 1 Cl. botulinum types A and B (proteolytic) in TGC

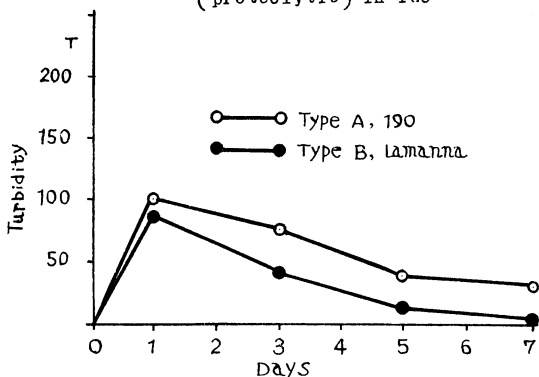
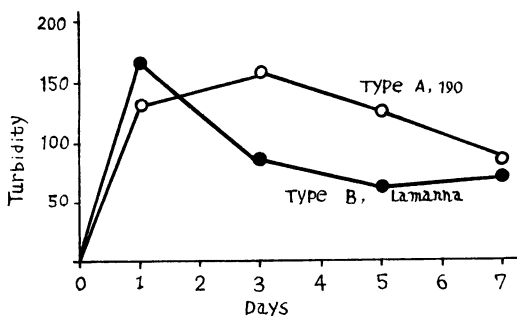


Fig 2 Cl. botulinum types A and B (proteolytic) in PYE



またこれらをPYE培地に培養した場合のそれは、Fig. 2に示してある。

いずれも培地の混濁度は一旦上昇した後速かに低下する。殊にTGC培地においては混濁度の低下が著明で、培養後期には培地は透明に近くなる。type Fにおいても同様の所見が得られた。

これに反して、non-proteolytic groupに属するtype B, strain QCでは、培養と共に混濁度の上昇が認められ(Fig. 3)、type C及びtype Dにおいても一旦上昇した混濁度は培養後期まであまり低下を示さない(Fig. 4)。type EにおいてはPYE培地において多少の低下が見られるが、TGC培地においては混濁度の低下は認められない(Fig. 5)。

Fig 3 Cl. botulinum type B (non-proteolytic) in TGC and PYE

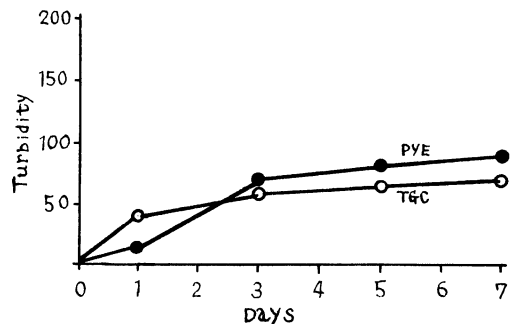


Fig 4 Cl. botulinum types C and D (non-proteolytic) in TGC

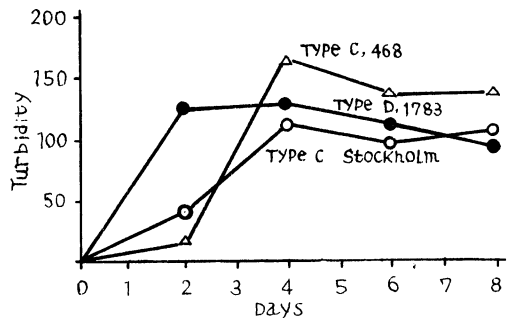
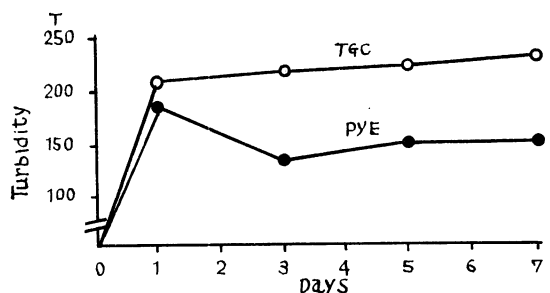


Fig 5 Cl. botulinum type E (non-proteolytic) in TGC and PYE



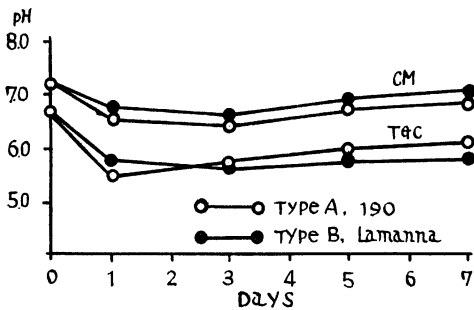
このように、proteolytic groupでは培養の早期から菌体の lysis が起つて混濁度の著明な低下が認められるが、non-proteolytic group では混濁度の低下はあまり著明ではない。しかし、どちらの group においても、培養日数を追つて Gram 染色を施し、Gram 染色性及び菌の形態を観察してゆくと、培養の早期から菌体は Gram 陰性に変じ、且つ著明な ghost 化が認められる。これについては別に報告した。(9)

II pH

培地の pH の変化もまた、proteolytic group と non-proteolytic group によつて異なる。

Proteolytic group に属する type A 及び type B (strain Lamanna) を CM 培地及び TGC 培地に培養した場合の、培地の pH の変化は Fig. 6 に示してある。

Fig 6 Cl. botulinum types A and B (proteolytic) in CM and TGC



いずれの培地においても、菌の増殖に伴つて培地の pH は一旦低下するが、その後徐々に上昇し、CM 培地においては再び中性に戻る。type F においても、これとほぼ同様の結果が得られた。これに反して、non-proteolytic group に属する type B (strain QC)、type C、type D 及び type E においては、いずれも菌の増殖に伴う培地の pH の低下が著明で、比較的高い pH level を示す CM 培地においても、一旦低下した pH は中性に戻ることはない。TGC 培地においては特に pH の低下が著しく、培養の後期に到るまでほぼ pH 5.0 附近にとゞまる。これらは Figs. 7 及び 8 に示されている。

この proteolytic group と non-proteolytic group における培地の pH の変化の差異は、CM 培地を用いた Figs. 9 及び 10 に更に顕著に示されている。

このような両者の差異は、後に述べる毒素の活性化の問題及び既に報告した(9)孢子形成の問題とも関連して、両者の生理的性状の重要な差異のひとつと考えられる。

Fig 7 Cl. botulinum types B and E (non-proteolytic) in CM and TGC

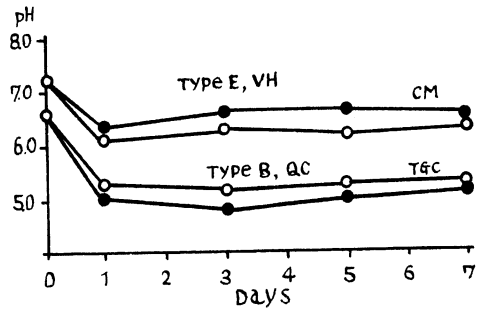


Fig 8 Cl. botulinum types C and D (non-proteolytic) in CM and TGC

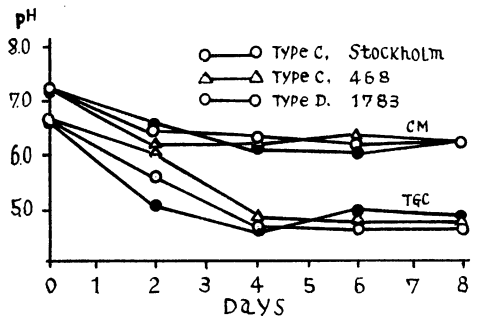


Fig 9 Cl. botulinum types A (proteolytic) and E (non-proteolytic) in PYE

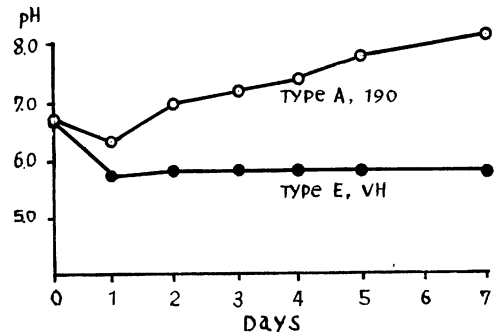
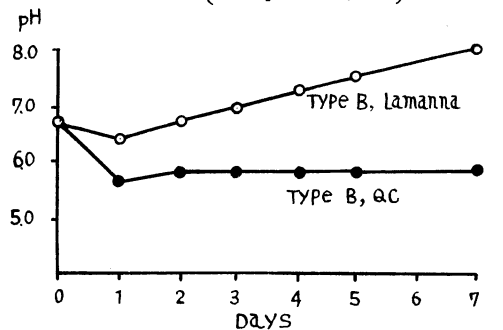
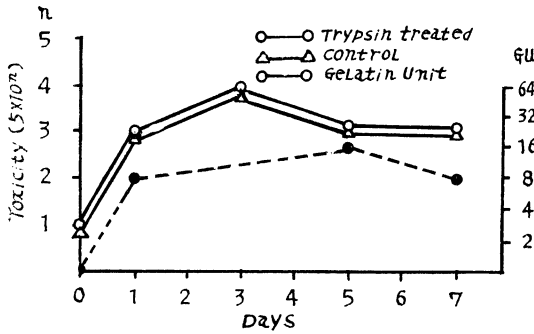


Fig 10 Cl. botulinum types B (proteolytic) and B (non-proteolytic) in PYG



Proteolytic groupに属するtype A, strain 190をCM培地に培養した場合の毒素産生及びgelatinase分解酵素の産生はFig.11に示されている。

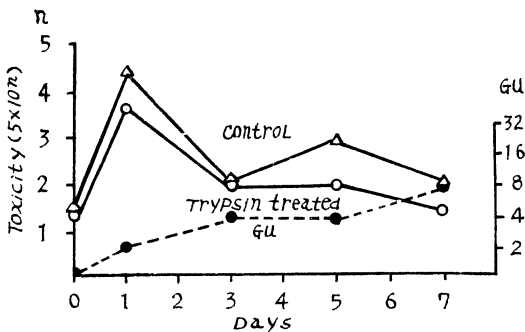
Fig 11 Cl. botulinum type A, strain 190 (CM)



この図から明らかなように、type A, strain 190においては、培養液(菌体+上清)をtrypsin処理した場合の毒性と、処理しない場合の毒性の間に差異が見られない。このことは、毒素の前駆体が速かに活性化されて毒素分子に変化することを示している。gelatinaseの産生もまた培養の早期から著明で、培養3日目にpeakに達し、その後はむしろ低下している。

同じtype A, strain 190をTGC培地に培養した場合の毒素及びgelatinase産生は、Fig.12に示されている。

Fig 12 Cl. botulinum type A, strain 190 (TGC)



この場合にはむしろ、trypsin処理によつて毒性の低下が見られている。同様の所見がtype F, strain Denmarkについても得られている。

しかしながら、同じproteolytic groupに属するtype B, strain Lamannaの場合には、かなりこれらと異つた現象が認められる。すなわち、Figs.13, 14及び15に示す通り、この菌株をCM培地、TGC培地及びPYG培地に培養した場合、trypsinによる毒素の活性化が培養の後期に到るまで明らかに認められる。

Fig 13 Cl. botulinum type B, strain Lamanna (CM)

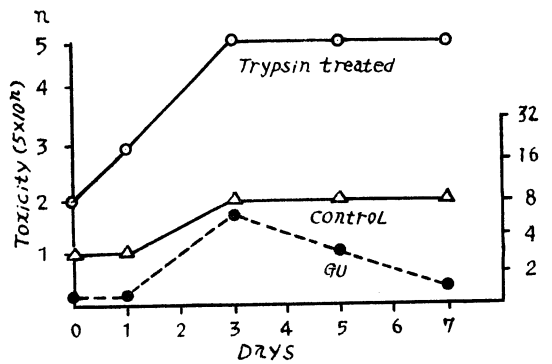


Fig 14 Cl. botulinum type B, strain Lamanna (TGC)

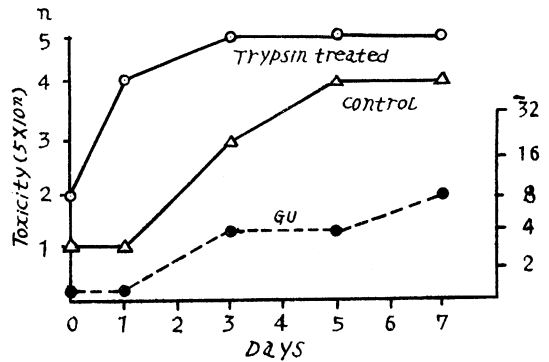
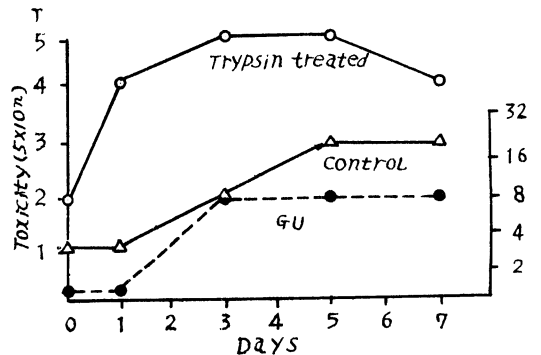


Fig 15 Cl. botulinum type B, strain Lamanna (PYE)



このことは、type B, strain Lamannaがproteolytic groupに属する菌株であるにも拘らず、毒素の大部分が前駆体("protoxin")の形で残存することを意味している。

一方non-proteolytic groupに属するtype B, strain QCの、各培地における毒素産生の過程はFigs.16,17及び18に示されている。いずれの培地においてもtrypsinによる毒性の増強は著明で、毒素の大部分が"protoxin"の形で残存することを示している。特にTGC培地においてこの傾向は著明である。また、この方法に

よる gelatinase 産生試験の結果はいずれも陰性であつた。

Fig 16 Cl. botulinum type B, strain QC (CM)

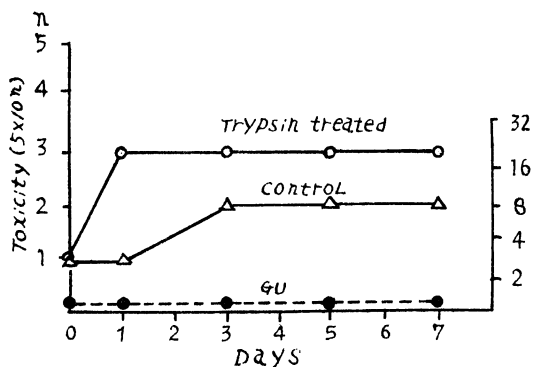


Fig 17 Cl. botulinum type B, strain QC (TGC)

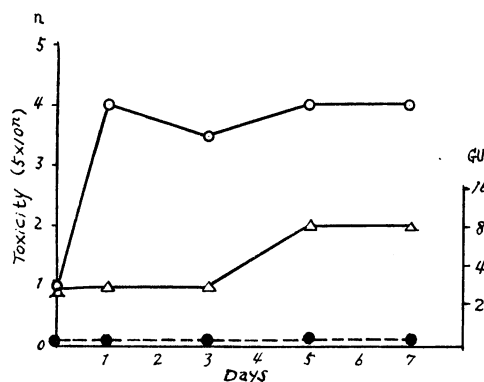
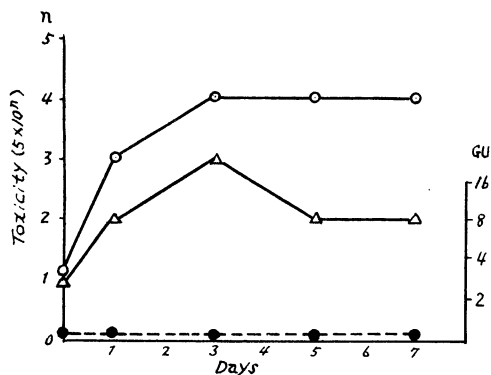


Fig 18 Cl. botulinum type B, strain QC (PYE)



同様の結果が non-proteolytic group に属する type E, strains VH 及び Mamanbetsu についても得られている (Figs. 19, 20 及び 21)。

Fig 19 Cl. botulinum type E, strain VH (CM)

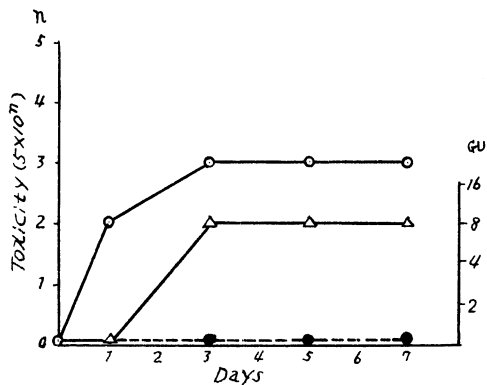


Fig 20 Cl. botulinum type E, strain VH (TGC)

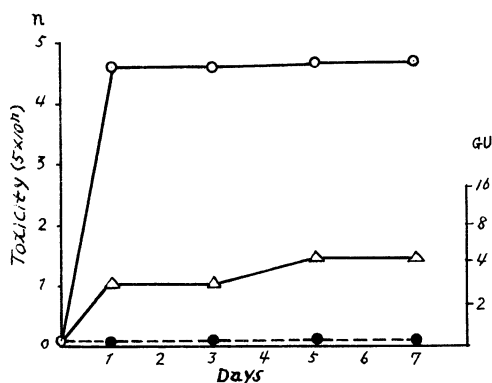
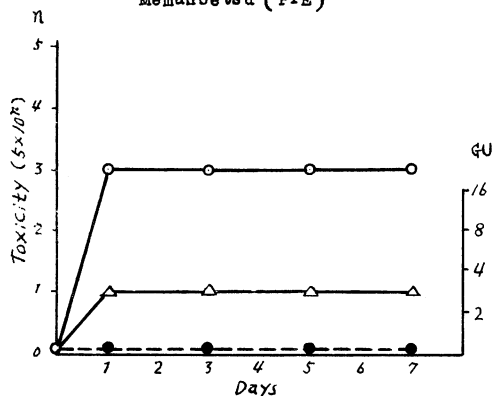


Fig 21 Cl. botulinum type E, strain Mamanbetsu (PYE)



Type E においても、trypsin による活性化は TGC 培地において特に顕著に認められ、毒性は 1,000 倍以上に増強されている。gelatinase 産生は陰性を示した。

これに反して、同じく non-proteolytic group に属するにも拘らず、type C, strains Stockholm 及び 468, type D, strain 1873 においては、trypsin による毒素の増強はあまり著明ではない。

Type C, strain Stockholm の CM 培地及び TGC 培地における毒素産生は Figs. 22 及び 23 に示されている。多少の trypsin による

活性化は認められるが、その程度は上述の type B 及び type E に比較すると極めて僅かである。

Fig 22 Cl. botulinum type C, strain Stockholm (CM)

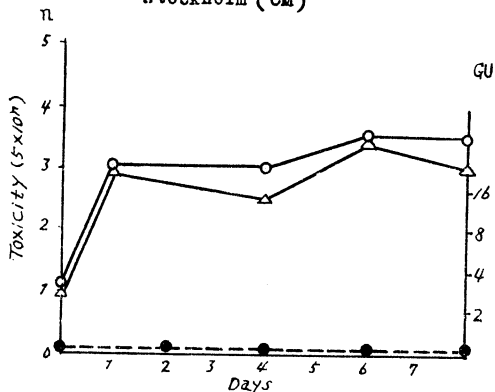
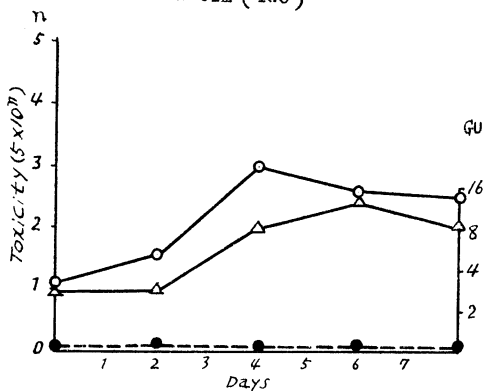


Fig 23 Cl. botulinum type C, strain Stockholm (TGC)



また type C, strain 486 についてもほぼ同様の結果が得られている (Figs. 24 及び 25).

Fig 24 Cl. botulinum type C, strain 468 (CM)

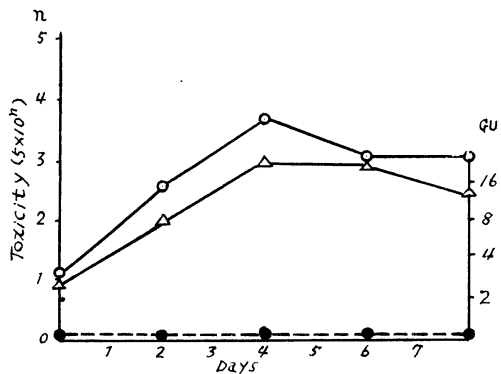
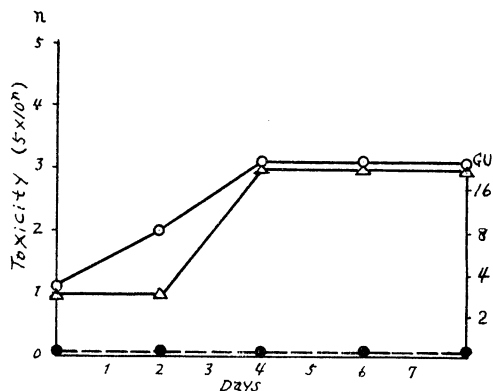


Fig 25 Cl. botulinum type C, strain 468 (TGC)



Type D, strain 1873 についても、これら type C の菌株とほとんど同じ結果が得られている (Figs. 26 及び 27).

Fig 26 Cl. botulinum type D, strain 1873 (CM)

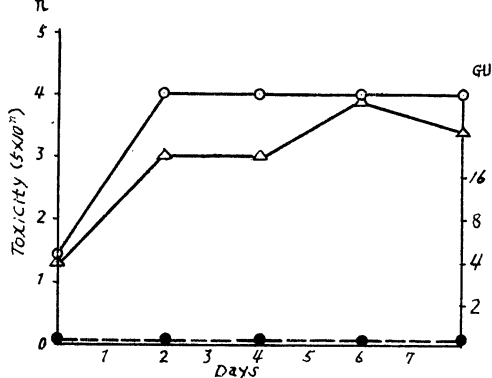
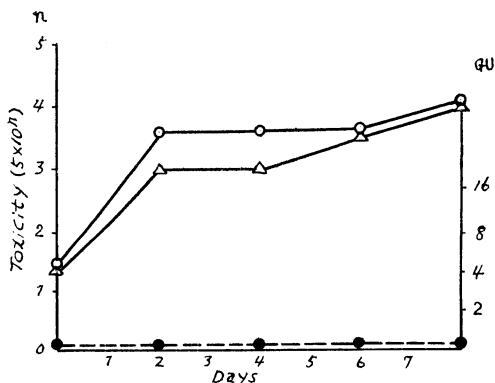


Fig 27 Cl. botulinum type D, strain 1873 (TGC)



Types C 及び D はいずれも non-proteolytic group に属し、gelatinase 産生は認められなかった。

考 察

Clostridium botulinum は、蛋白分解生の強い proteolytic group と、弱い non-proteolytic group とに分けられる。前者に属するものとしては、type A、多くの type B

(例えば strain Lamanna) 及び type F があり、後者に属するものとしては一部の type B (例えば strain QC)、type C、type D 及び type E がある。

両者はその培養上の性状に著明な差異を示し、このことは proteolytic group の菌株と、non-proteolytic group の菌株との毒素産生を検討する場合に重要な意味をもつものと考えられている。すなわち、proteolytic の性質の強い types A 及び B においては、一旦無毒の前駆体として形成された "protoxin" は、菌の産生する proteinases のある種のものによって活性化され速かに毒素分子に変化する。これに反して、proteolytic の性質に乏しい type E (及び一部の type B) においては、大部分の毒素が前駆体のまゝで残存し、trypsin 処理によつてはじめて強い毒性を現わすと考えられている。

しかしながら、上述の実験結果から明らかなように、proteolytic group に属する type B、strain Lamanna においては、培養の比較的後期まで毒素は不活性の形で残されており、trypsin 処理による著明な毒性の増強が認められる。これは恐らく、strain Lamanna の産生する proteinases の中に、前駆体の活性化に関与する酵素が多く含まれていないためであろう。Cl. bot. の産生する proteinases のすべてが毒素の活性化に関与するものではないという事実は、既に犬養及び児玉⁽¹⁰⁾によつて報告されている。すなわち彼等は、type A の培養上清液中には少くとも3種類の proteinases の証明されること、そのうちひとつの分割にのみ活性化が認められ、他の2つの分割はむしろ毒素を不活化することを報告している。

従つて本実験に用いた type A、strain 190 及び type F、strain Denmark は、培養の早期から十分の活性化酵素を産生して前駆体を毒素分子に変え、毒素は更に菌自らの産生する proteinases によつて分解され、培養後期にはむしろ毒性の低下が見られるものと考えられる。培地の pH の上昇もこの毒素の不活化を更に促進するであろう。

これに反して、type B、strain Lamanna においては、活性化酵素の産生が不十分なために、毒素は長く活性化されないまゝに残存し、trypsin 処理によつてはじめて活性化されるものと考えられる。

或いは、この菌株の産生する毒素の前駆体が、types A 及び F のそれに比して菌の産生する proteinases の作用を受けにくく、trypsin によつてはじめて活性化されるようなものであるのかも知れない。

いずれにせよ、proteolytic group に属するにも拘らず、毒素が長く前駆体のまゝに残存する菌株の存在することは興味深い現象である。

一方 non-proteolytic group においても、例えば type B、strain QC 及び type E、

strains VH 及び Memanbet su においては、毒素の大部分が前駆体の形で残存している。前駆体と活性毒素の割合は培地によつて異なるが、一般に pH の低下が最も著明に見られる TGC 培地において最もその差が顕著であり、次いで PYG 培地、CM 培地の順となつている。non-proteolytic の type B と type E とは、極めて類似の性状を示し、糖分解試験においても共に旺盛な酸及びガス産生を示す点で他の菌株と異つている (Dolman & Murakami, 1961)⁽¹¹⁾。

これに反して、同じく non-proteolytic group に属しながら、type C、strains Stockholm 及び 468、type D、strain 1873 はこれらとかなり異つた結果を示している。すなわち、これらの菌株においても trypsin による活性化がある程度認められる点から、protoxin → toxin という process は他の types と同様に存在するものと考えられるが、その活性化の程度は上述の non-proteolytic types B 及び E にくらべて著しく弱い。types B 及び E においては、trypsin によつて 100~1,000 倍の毒性の増強が認められるが、types C 及び D においてはただか 10 倍程度の活性化が見られるに過ぎない。これはどのような理由によるものであろうか。

ひとつには、types C 及び D の毒素は、大部分が最初から毒素活性をもつた分子として形成され、従つて trypsin による活性化が著明でないとも考えられる。また一旦無毒の前駆体として形成されるとしても、その "protoxin" は極めて活性化を受け易く、菌の産生する僅かの proteinases の作用によつて容易に活性化されるとも考えられる。あるいはまた、これらの types においては、毒素前駆体の活性化は所謂菌の蛋白分解性とは無関係な何等かの酵素によつて起るのかも知れない。

いずれにしても、これらの菌株は non-proteolytic group に属するにも拘らず、毒素の大部分は培養の早期から強い活性を示し、trypsin による活性化があまり著明に認められないという点で注目される。

要するに、Cl. bot. の毒素産生の process は、一旦無毒の前駆体として菌体内に形成された "protoxin" が、酵素的に活性化されて toxin 分子になると考えてよいであろう。この活性化の mechanism については、Gerwing, Dolman & Arnott⁽¹²⁾ の fragmentation の説と、Sakaguchi, Sakaguchi & Imai⁽¹³⁾ の unmasking の説が対立している。

ともあれ、この前駆体の活性化には、前駆体分子の性状、活性化に関与する酵素、及びその酵素系が作用を現わす培地の諸条件が大きな影響を与えるものと考えられる。この点で、同じく proteolytic group に属する菌株の中にも、培養の当初からほとんど trypsin による活性化の見られな

い菌株 (type A, strain 190 及び type F, strain Denmark) と、培養の後期に到るまで trypsin による活性化の著明に認められる菌株 (type B, strain Lamanna) との存在すること、一方また、non-proteolytic group に属する菌株の中にも、trypsin による活性化の著明な菌株 (type B, strain QC 及び type E, strains VH 及び Memanbetsu) と活性化のあまり著明でない菌株 (type C, strains Stockholm 及び 468, type D, strain 1873) との存在することは極めて興味深い事実である。

Cl. bot. の培養性状、特に培養の早期における Gram 陰性化、ghost 化の現象も興味深い。これについては既に Boroff⁽¹⁴⁾ が、type C についてこの現象と毒素産生との関連を報告しており、また Bowers & Williams⁽¹⁵⁾ は type A についてこの問題をとり上げ、arginine の添加が培地の混濁度を維持する上に効果があつたと報告している。

少くとも本実験において使用した培地においては、proteolytic group に属する菌株では、一旦培地の混濁度が上昇した後速かに低下して明らかに菌体の autolysis が認められている。しかしながら、non-proteolytic group に属する菌株では、同じように早期の Gram 陰性化、ghost 化は起るが、培地の混濁度はそれほど著明に低下しない。これは両者における菌体崩壊の mechanism が根本的に異なることによるものか、あるいは ghost 化に到るまでの process は同じであつて、その後の lysis が non-proteolytic group では進行しないためなのか不明である。これは両者における菌の proteinases 産生能及び培地の pH の変化と密接な関連性をもつ現象であろう。

培地の pH の変化は、当然 Cl. bot. の毒素産生の process に重要な影響を及ぼすと考えられる。一般に proteolytic の性状の強い菌株は saccharolytic の性状が弱く、proteolytic の性状の弱い菌株は saccharolytic の性状が強い。この性状が、培地に含まれる糖の濃度と共に、培地の pH の変化を左右する。その pH の変化は毒素及びその前駆体の菌体からの release、前駆体の活性化に大きな影響を及ぼすものと考えられる。Cl. bot. の毒素産生の process を考える場合、これら種々の factors の影響を十分考慮する必要があるであろう。

結 論

Clostridium botulinum の各型に属する菌株を用い、種々の培地におけるその混濁度、pH の変化、及び毒素産生の process を培養日数を追つて検討した。その結果、次のような所見を得た。

(1) Proteolytic group に属する菌株にお

いては、培養の早期から Gram 陰性化、菌体の ghost 化に次いで菌体の lysis が起り、培地の混濁度は一旦上昇した後、速かに低下する。これに反して、non-proteolytic group に属する菌株においては、Gram 陰性化、菌体の ghost 化は早期に認められるが、培地の混濁度の低下は著明でない。

(2) Proteolytic group においては、一般に培地の pH の低下があまり著明でなく、一旦低下した後再び上昇して中性乃至アルカリ性となる。これに反して、non-proteolytic group においては、培養の早期から培地の pH は著明に低下し、その後ほとんど上昇を示さない。

(3) このように、両者の培養性状は明らかに異なるが、その毒素産生の process を見ると、proteolytic group にも、trypsin による活性化がほとんど見られない菌株 (type A, strain 190 及び type F, strain Denmark) と、これが著明に見られる菌株 (type B, strain Lamanna) とが含まれる。一方 non-proteolytic group にも、trypsin による活性化の著明な菌株 (type B, strain QC 及び type E, strains VH & Memanbetsu) と、あまり著明でない菌株 (type C, strains Stockholm & 468 及び type D, strain 1873) とが含まれる。

(本論文の内容は第 3 回日本細菌学会において報告した。)

文 献

- 1) Sakaguchi, G. & Tohyama, Y.: Jap. J. Med. Sci. & Biol., **8**, 247-253, (1955)
- 2) Sakaguchi, G. & Tohyama, Y.: Jap. J. Med. Sci. & Biol., **8**, 255-262, (1955)
- 3) Duff, J. T., Wright, G. G. & Yarinsky, A.: J. Bact., **72**, 455-460, (1956)
- 4) Dolman, C. E.: Canad. J. Publ. Health, **48**, 187-198, (1957)
- 5) Dolman, C. E.: Jap. J. Med. Sci. & Biol., **10**, 383-395, (1957)
- 6) Iida, H., Nakamura, Y., Nakagawa, I. & Karashimada, T.: Jap. J. Med. Sci. & Biol., **11**, 215-222, (1958)
- 7) Bonventre, P. F. & Kempe, L. L.: J. Bact., **78**, 892-893, (1959)
- 8) Bengston, I. A.: Hyg. Lab. Bull., **136**, 1-97, (1924)
- 9) 飯田広夫: 本誌, **15**, 11-15, (1965)
- 10) 犬養勝一、児玉博英: 日新医学, **49**, 208-210, (1962)
- 11) Dolman, C. E. & Murakami, L.: J. Inf. Dis., **109**, 107-128, (1961)

- 12) Gerwing, T., Dolman, C.E. & Arnott D.A.: J. Bact., **84**, 302-306, (1962) proteolytic character of the strain.
- 13) Sakaguchi, G., Sakaguchi, S. & Imai, N.: J. Bact., **87**, 401-407 (1964)
- 14) Boroff, D.A.: J. Bact., **70**, 363-367 (1955)
- 15) Bowers, L.E. & Williams, O.B.: J. Bact., **85**, 1175-1176 (1963)

Experimental Studies on Toxin Production of Clostridium Botulinum

Hiroo Iida

1. With proteolytic group of Cl. botulinum, marked decrease in turbidity of culture fluids is observed, suggesting the lysis of bacteria in the early stage of cultivation. On the other hand, the decrease in turbidity is not so conspicuous with non-proteolytic group though the conversion to negative Gram reaction and to ghost forms takes place early during cultivation.
2. The pH level of culture fluids attained by proteolytic group is always higher than that attained by non-proteolytic group.
3. The phenomenon of toxin activation by trypsin is obviously demonstrated with proteolytic type B, strain Lamanna, as well as with non-proteolytic type B, strain QC and type E, strains VH and Memanbetsu. On the other hand, the activation seems to be rather uncertain with non-proteolytic type C, strains Stockholm and 468 and type D, strain 1873, as well as proteolytic type A, strain 190 and type F, strain Denmark. It was, therefore, suggested that the activation phenomenon of Cl. botulinum toxin by trypsin seems to have no direct relationship with the