1　Clostridium botulinum の毒素産生に関する実験的研究（第4報）

北海道立衛生研究所　飯　田　広　夫

緒　言

細菌の毒素産生能が bacteriophage によつて伝達されることは，既にジフテリー菌[1)2)]或いは溶連菌[3)]においてよく知られている。

著者はボツリヌスE型菌の中に，毒素産生能を失つた変異株を数株分離し得たので[4)]，これと毒素産生株とを用い，毒素産生能の伝達に関する実験をこれまで試みて来た。しかし毒素産生株の培養濾液による伝達には未だ成功していない。またボツリヌスE型菌の phage を得ることにも成功していない。

今回は，毒素産生株と無毒株との混合培養によつて，培養液の毒性の増強を認めることが出来たのでその成績を報告する。

実験材料及び方法

菌株　毒素産生株としては，*Clostridium botulinum* type E. 岩内株を，無毒株としては，*Clostridium botulinum* type E. 佐呂間株を用いた。いずれも中毒例から分離した菌株であるが，後者は継代の途中無毒株として分離し得たものである。岩内株は Streptomycin sensitive であり，佐呂間株は Streptomycin 添加培地に継代することによつて得られた Streptomycin resistant の菌株である。

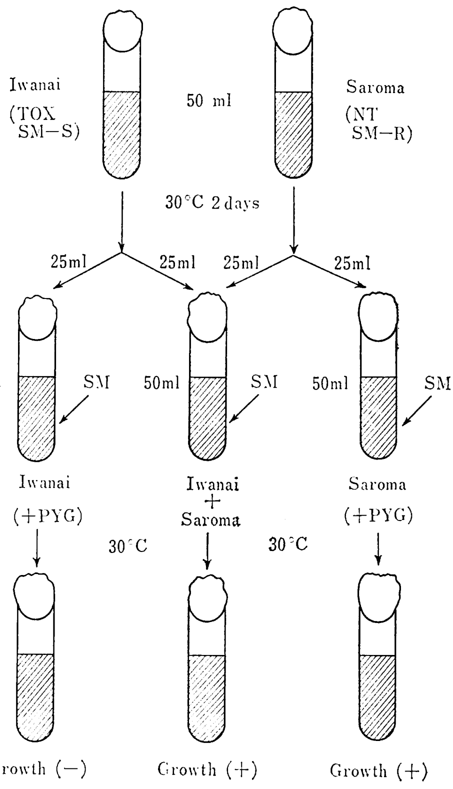
培地　次の組成の培地（PYG 培地）を用いた。

Proteose Pepton (Difco)	1%
Yeast Extract (Difco)	1%
Glucose	0.1%
Na-thioglycollate	0.05%
pH	7.2

実験方法　予め上記の岩内株及び佐呂間株を，それぞれ 50ml 宛の PYG 培地に接種して 30°C 2日間培養し，その 25ml 宛を混合する。残る 25ml 宛にそれぞれ PYG 培地 25ml 宛を加え，何れも 50ml とする。これらに Glucose を 0.1%，Na-thioglycollate を 0.05% に添加し，更に Streptomycin 250mg を加えて再び 30°C に培養する（Fig. 1）。

これらの各試験管から，培養前（混合直後），第1，第2及び第4日目にそれぞれ 10ml 宛を Sampling し，その混濁度，pH 及び毒性を調べた。毒性の測定は培養液（菌体＋上清）を Trypsin 処理（pH 6.0）したものと，しないものとについて行つた。Trypsin 処理の方法，毒素の測定法は既に述べた[5)]。

Figure 1　Method for Cultivation



実　験　成　績

(1)　培地の混濁度

岩内株と佐呂間株の混合培養及び両者の単独培養における培地の混濁度の変化は，Fig. 2 に示されている。混合培養及び佐呂間株の単独培養においては，著明な菌の増殖が認められたが，岩内株の単独培養においてはこれを認め得なかつた。

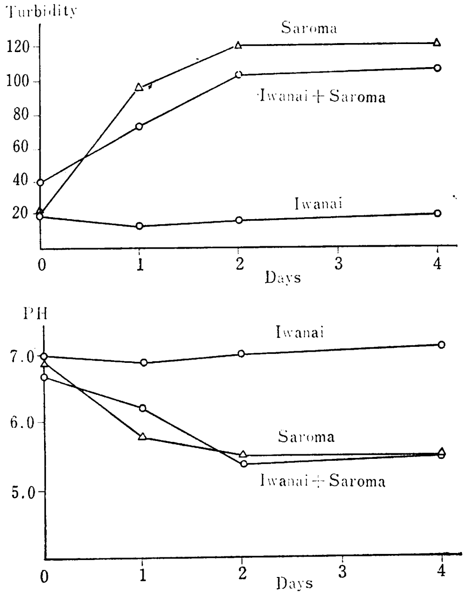
(2)　培地の pH

それぞれの培養における培地の pH の変化は，Fig. 2 に示されている。混合培養及び佐呂間株の単独培養においては，pH の低下が認められ，菌の増殖に伴う酸産生の起つたことを示しているが，岩内株の単独培養には pH の低下は認められなかつた。

(3)　培養液の毒性試験

培養液（上清＋菌体）をそのまま用いて毒性試験を行つた場合には，混合培養と岩内株の単独培養との間に毒性の差は見られない。しかし，培養液を Trypsin 処理して毒性

Figure 2　Changes of Culture Media



試験を行つた場合には，明らかに混合培養に毒性の増強が認められた(Table 1)。佐呂間株の単独培養には，Trypsin処理の有無に拘らず毒性は認められなかつた。

Table 1　Toxicity Test

Activation	Strain	SM-Medium	MLD/ml
Before Trypsin Treatment	Iwanai	start	50
		30 C 1 day	50
		30 C 2 days	50
		30 C 4 days	50
	Iwanai + Saroma	start	50
		30 C 1 day	50
		30 C 2 days	50
		30 C 4 days	5
	Saroma	start	< 5
		30 C 4 days	< 5
After Trypsin Treatment	Iwanai	start	500
		30 C 1 day	50
		30 C 2 days	50
		30 C 4 days	50
	Iwanai + Saroma	start	500
		30 C 1 day	5,000
		30 C 2 days	5,000
		30 C 4 days	5,000
	Saroma	start	< 5
		30 C 4 days	< 5

(4)　**Cl. botulinum** type B, strain QC **との混合培養**

同様の実験を，non-proteolytic type B の strain QC (毒素産生性，Streptomycin-sensitive) と佐呂間株とを用いて試みた。

培地の混濁度，pH の変化は Fig. 3 に示した。また毒素の産生は Table 2 に示した。この場合には，混合培養による毒性の増強は，Trypsin 処理後にも認められなかつた。

Figure 3　Changes of Culture Media

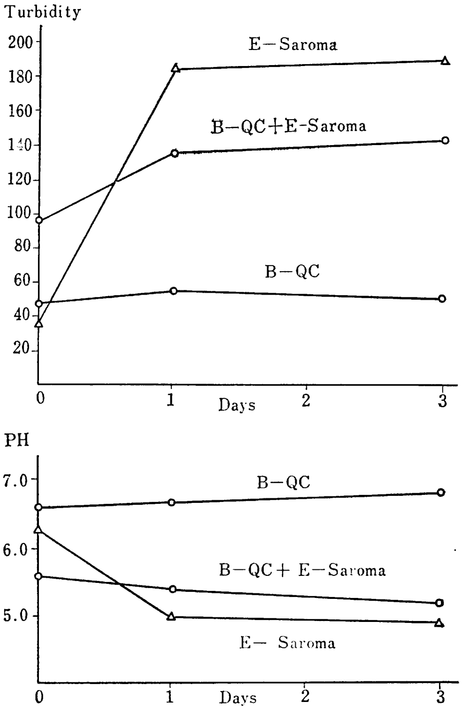


Table 2　Toxicity Test

Activation	Strain	SM-Medium	MLD/ml
Before Trypsin Treatment	B-QC	start	5
		30 C 1 day	5
		30 C 3 days	5
	B-QC + E-Saroma	start	5
		30 C 1 day	5
		30 C 3 days	5
	E-Saroma	start	< 5
		30 C 1 day	< 5
		30 C 3 days	< 5
After Trypsin Treatment	B-QC	start	500
		30 C 1 day	500
		30 C 3 days	500
	B-QC + E-Saroma	start	500
		30 C 1 day	500
		30 C 3 days	500
	E-Saroma	start	< 5
		30 C 1 day	< 5
		30 C 3 days	< 5

考　　　察

上述の実験結果は，岩内株と佐呂間株との混合培養によつて，毒素の precursor の新たな産生が起つたことを意味している。この precursor はいずれの菌株によつて産生されたものであろうか。

これが毒素産生性の岩内株によつて産生されたものとすると，Strepomycin 添加培地に岩内株が増殖したものと考えられ，この場合には混合培養によつて Strepomycin耐性

が佐呂間株から岩内株に伝達されたことの可能性が考えられる。

また毒素のprecursorが佐呂間株によつて産生されたとすると，この場合には毒素産生性が岩内株から佐呂間株に伝達されたことの可能性が考えられる。

このいずれの可能性が正しいかを知るために，混合培養の試験管から1白金耳をとり，Streptomycinを添加したBrain-heart infusion agarの平板に塗抹して，30°C 2日間嫌気的に培養し，生じた集落を拾つてCooked meat mediumに培養して毒素産生の有無を調べて見た。これまでのところ，4回この実験を繰返し，1回に100個の集落を選んで検討したが，すべて毒素の産生を示さなかつた。またTrypsin処理を加えても，毒素は証明されなかつた。

またこの平板に生ずる集落は，いずれも佐呂間株に特有の形態学的特徴（小円形で荒い縞模様を呈する）を示し，岩内株の集落と思われるものは見出されなかつた。

結局現在の段階では，毒素のprecursor産生の機序は不明であるが，何等かの方法によつて一時的に毒素産生性が有毒株から無毒株へ伝達されるものではないかと考えている。

このような現象が同じtype Eの間には認められるが，生物学的性状の極めて類似した，non-proteolytic type Bとの間には認められない点は興味深い。この点に関しては更に多くの菌株を用いて実験を試みる必要があろう。

結　　論

Clostridium botulinum type Eに属する岩内株（毒素産生株，Streptomycin sensitive）と，佐呂間株（無毒株，Streptomycin resistant）とをStreptomycinの存在下で混合培養すると，毒素のprecursorの新たな産生が証明される。

しかし，type Bに属するQC株（毒素産生株，Streptomycin sensitive）と，佐呂間株とを同じく混合培養しても，毒素のprecursor産生は証明されない。

文　　献

1）Freeman, V. J.: Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*, J. Bact., 61, 675-688, 1951.

2）Groman, N. B.: Evidence for active role of bacteriophage in the conversion of non-toxigenic *C. diphtheriae* to toxin production, J. Bact., 69, 9-15, 1955.

3）Zabriskie J. B.: The role of temperate bacteriophage in the production of erythrogenic toxin by Group A streptococci, J. Exp. Med., 119, 761-780, 1964.

4）飯田広夫：*Clostridium botulinum* の毒素産生に関する実験的研究（第3報），北海道立衛生研究所報，15，1～7，1965.

5）飯田広夫：*Clostridium botulinum* の毒素産生に関する実験的研究（第1報），日本細菌学雑誌，19，458～461，1964.

1　Experimental Studies on Toxin Production of *Clostridium botulinum* (part 4)

Hiroo Iida

(Hokkaido Institute of Public Health)

Clostridium botulinum type E, strain Iwanai (toxigenic and Streptomycin sensitive) and type E, strain Saroma (non-toxigenic and Streptomycin resistant) were mixed and incubated under the presence of Streptomycin. The *de novo* production of toxin precursor was demonstrated without the growth of the toxigenic strain.

With type B, strain QC (toxigenic and Streptomycin sensitive) and type E, strain Saroma (non-toxigenic and Streptomycin resistant), the *de novo* production of toxin precursor under the similar conditions was negative.