

ウェルシュ菌のエンテロトキシン産生におよぼす 酢酸アンモニウムの影響

橋 勝康・棚橋明彦・谷口忠敬・槌本六良

Influence of Ammonium Acetate on Enterotoxin Production of *Clostridium perfringens*

Katsuyasu TACHIBANA, Akihiko TANAHASHI, Tadatoka TANIGUTI
and Mutsuyoshi TSUCHIMOTO

The influence of ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *Clostridium perfringens* (NCTC 8238 and 8798) has been studied.

1) The enterotoxin production and sporulation in the sporulation medium (with 0.4 % soluble starch) were promoted by the addition of ammonium acetate. The optimum concentration of added ammonium acetate was 0.3 % in NCTC 8238 and 0.1 % in NCTC 8798.

2) The effect of ammonium acetate on the enterotoxin production in NCTC 8238 was enhanced by the addition of 0.01 - 0.05 % glucose into the sporulation medium. The effect of ammonium acetate in NCTC 8798 was enhanced by the addition of 0.6 - 1.8 % glycerol instead of glucose.

緒 言

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) による食中毒は一般にA型の耐熱性菌株による場合が多い(1)。本菌が多量に摂食され、腸管内で増殖して孢子を形成する際に孢子嚢中にエンテロトキシンを産生し、食中毒を引き起こす(2)と云われる。本菌の孢子形成およびエンテロトキシン産生培地としては一般にDS培地(3)が使用されている。しかし食中毒由来菌株の全部に対してDS培地が適用できるとは限らず、そのため新たな培地の検討(4, 5)もなされている。

著者の一人は先に、酢酸アンモニウムの添加が本菌の孢子形成率を高める傾向を認めた(6)。今回は、酢酸アンモニウムの添加が本菌のエンテロトキシン産生におよぼす影響、ならびにグルコースあるいはグリセリンの添加が酢酸アンモニウムのエンテロトキシン産生効果におよぼす影響について検討した。

実験方法

1 供試株

ウェルシュ菌 NCTC 8238 および 8798の2菌株を使用した。菌株8238は孢子形成の Stage (7) Vまで進む状態にあった。菌株8798は保存培養によって孢子形成過程の進行が相違したので、主として孢子形成の Stage III に止まるものと、Stage V まで進行するものとの2保存培養を使用した。供試菌はクックドミート培地で37°C 3日間培養後、-20°Cに凍結保存した。

2 孢子形成培養

凍結保存培養の0.1mlをクックドミート培地10mlに接種し、これに75°C、20分間の加熱処理を加えた後、37°Cで15時間培養した。この培養の1.0mlを孢子形成培地100mlに接種し、37°Cで9時間培養した。孢子形成基礎培地に酢酸アンモニウム、グルコースあるいはグリセリンを所定濃度に加えて孢子形成試験培地

とした。

孢子形成基礎培地は還元剤としてL-アスコルビン酸ナトリウムを0.5%添加(8)したDS培地(3)を使用した。嫌気培養はクックドミート培養のときはバイアルを用い、孢子形成培養のときには培養びんを用いて行なった。

3 孢子形成率の測定

孢子形成培養から菌液4mlをとり、これを等量の生理食塩水に懸濁させた後、5℃で遠心分離(3000rpm, 10分間)した。沈澱した菌体を10%中性ホルマリン4mlに懸濁させて固定し、この固定菌液を位相差顕微鏡で検鏡して孢子形成率を算出した。なお、孢子数は総菌数と孢子形成率から算出した。

4 エンテロトキシン産生量の測定

孢子形成培養菌液96mlを5℃で遠心分離(8000rpm, 20分間)後、菌体を生理食塩水2mlに懸濁させた。次に、細胞を超音波破壊器で永冷しながら完全に破壊し、これをエンテロトキシン検出用の細胞抽出液とした。エンテロトキシン量はOuchterlonyのマイクロサイド2重拡散法によって測定した。その詳細は前報(9)に記述した。

5 発育量の測定

孢子形成培養における発育量はOD(Optical density)あるいは総菌数で表わした。すなわち、前記ホルマリン固定菌液について、ODは660nmの波長で測定し、総菌数は血球計算盤を用い位相差顕微鏡で検鏡して算出した。

実験結果

1 エンテロトキシン産生に対する酢酸アンモニウム添加の効果

酢酸アンモニウム(以下AACと略記)を0-0.5%濃度に添加した試験培地(いずれも可溶性デンプン0.4%含有)で孢子形成培養した場合のエンテロトキシン(以下ETと略記)産生量および孢子形成率をTable 1に示した。すなわち、NCTC 8238の場合には、AAC 0.3%添加でET産生量が最高値を示し、0.3および0.5%添加で孢子形成率は上限に達した。NCTC 8798の場合には、AAC 0.1%添加がET産生および孢子形成に対して至適であった。

なお、NCTC 8238の場合、酢酸ナトリウムの添加によってもET産生および孢子形成が上昇したが、その上昇はAAC添加に劣り、また、塩化アンモニウムの単独添加による孢子形成の促進も認められなかった。

2 グルコースおよびグリセリンの添加がAACのET産生効果におよぼす影響

AACのET産生効果におよぼすグルコースおよびグリセリン添加の影響は菌株によって相違した。

(1) NCTC 8238の場合

AAC 0.3%添加および無添加培地(いずれも可溶性デンプン0.4%含有)にグルコースを0-0.07%添加した試験培地で孢子形成培養し、ET産生量、孢子形成率および発育量(OD)を測定した。AAC無添加の場合には、Fig. 1のように、グルコースの添加

Table 1. Influence of the concentrations of added ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *C. perfringens* NCTC 8238 and 8798

Strains	Items	Concentration of ammonium acetate (%)			
		0	0.1	0.3	0.5
NCTC 8238	Enterotoxin titer	3	4	5	2
	Sporulation rate (%)	47	65	80	79
NCTC 8798	Enterotoxin titer	1	2	1	<1
	Sporulation rate (%)	33	64	43	25

Sporulation culture : medium, contained 0.4 % soluble starch and 0.5 % sodium L-ascorbate; incubation, at 37°C for 9 hr. Stage of sporulation : NCTC 8238, stage V; NCTC 8798, stage III. Enterotoxin titer : expressed as the maximum dilution of the cell extract solution at which precipitation was formed in microslide gel by Ouchterlony's double diffusion method.

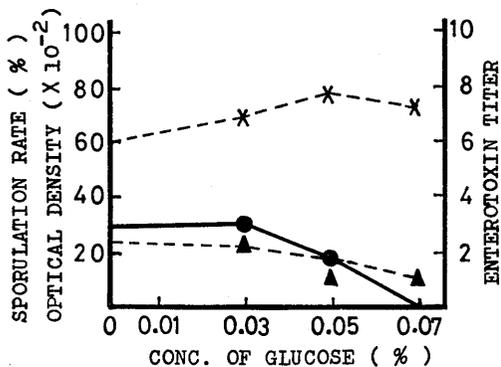


Fig. 1. Influence of the addition of glucose into the medium without ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *C. perfringens* NCTC 8238. Sporulation culture : see Table 1. Stage of sporulation : stage V. Enterotoxin titer : expressed by the same method as in Table 1. Symbols : ●—●, enterotoxin titer; ▲---▲, sporulation rate; ×---×, optical density.

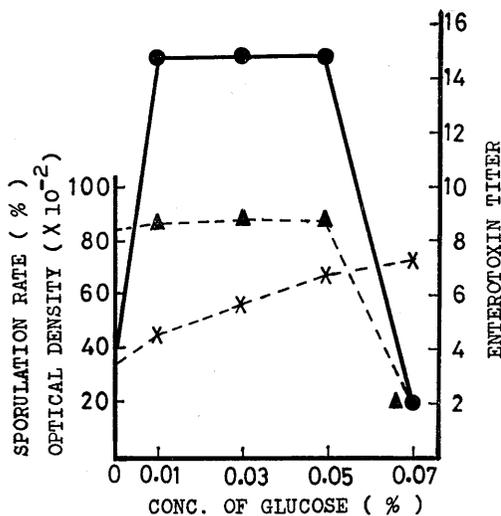


Fig. 2. Influence of the addition of glucose into the medium with ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *C. perfringens* NCTC 8238. Sporulation culture : medium, contained 0.3% ammonium acetate; incubation, see Table 1. Stage of sporulation : Stage V. Enterotoxin titer : expressed by the same method as in Table 1. Symbols : ●—●, enterotoxin titer; ▲---▲, sporulation rate; ×---×, optical density.

は発育量を高めるだけで、ET産生量および孢子形成率をむしろ低下させた。一方、AAC 0.3%添加の場合には、Fig. 2 のようにグルコース添加により発育量は増加したが、孢子形成率はグルコース 0.05% までほぼ一定の高い値を示した。また、ET産生量はグルコース 0.01% 添加では発育量の増加比率以上に急激に上昇し、0.05% 添加まで最高値を保持した。グルコース添加が 0.07% になると発育量のみが上昇し、ET産生量はグルコース無添加のとき以下に急激に低下し、孢子形成率も低下した。

(2) NCTC 8798 の場合

NCTC 8238 の場合とは異なり、グルコースの少量添加によってAACのET産生および孢子形成効果が低下した。グリセリンは一般にウェルシュ菌によって利用されにくい、NCTC 8798 はグリセリンを適度に利用・分解するので、グルコースに代えてグリセリンを添加し、AACのET産生効果におよぼす影響を試験した。

まず、AAC 0.1% 添加および無添加培地 (いずれも可溶性デンプン 0.4% 含有) にグリセリンを 0—1.8% 添加、これに孢子形成過程の Stage III で止まる保存培養を接種し、孢子形成培養した。AAC 無添加培地における結果を Fig. 3 に、添加培地における結果を Fig. 4 (a) に示した。発育量 (OD) および孢子形成率についてみると、AAC 無添加および添加の両培地とも、グリセリン 0.6% 以上の添加によって

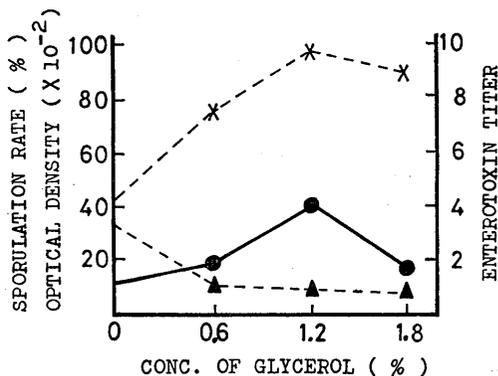


Fig. 3. Influence of the addition of glycerol into the medium without ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *C. perfringens* NCTC 8798. Sporulation culture : see Table 1. Stage of sporulation : Stage III. Enterotoxin titer : expressed by the same method as in Table 1. Symbols : ●—●, enterotoxin titer; ▲---▲, sporulation rate; ×---×, optical density.

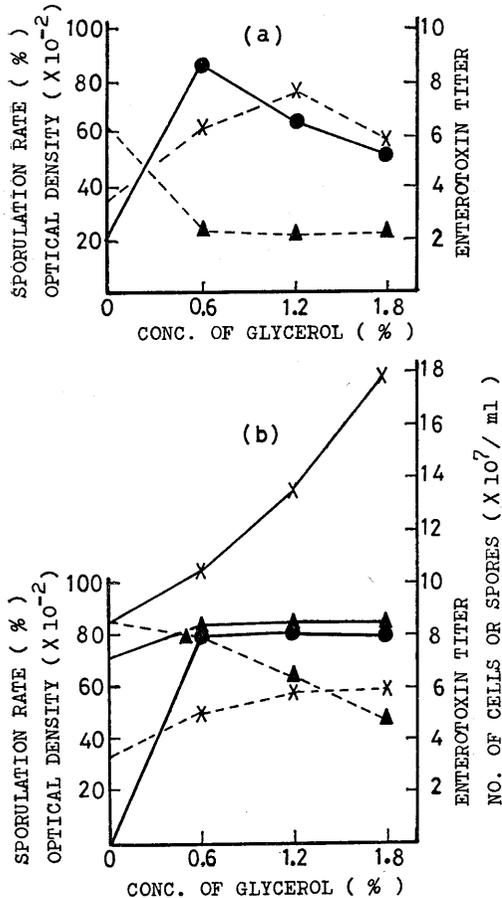


Fig. 4. Influence of the addition of glycerol into the medium with ammonium acetate on the enterotoxin production and sporulation of *C. perfringens* NCTC 8798.

Sporulation culture: medium, contained 0.1% ammonium acetate; incubation, see Table I. Stage of sporulation: (a), Stage III; (b), stage V. Enterotoxin titer: expressed by the same method as in Table I. Symbols: ●—●, enterotoxin titer; ▲—▲, number of spores; ▲---▲, sporulation rate; ×—×, number of cells; ×---×, optical density.

発育量は上昇し、孢子形成率は低下した。この場合、孢子形成過程は両培地において Stage III に止まり、孢子の光屈折性は微弱であった。ここで、Stage III の孢子形成細胞は無孢子細胞とほぼ同等の光屈折性を示すとみなすと、発育量と孢子形成率の関係から、Stage III 孢子形成細胞量はグリセリン 0—1.8% 添加範囲において大差はないと思われる。ET 産生量についてみると、AAC 添加培地の場合には、無添加培地に比べてグリセリン添加による ET 産生量の上昇が認

められ、特にグリセリン 0.6% 添加で最高の ET 産生量を示した。

次に、孢子形成過程の Stage V まで進行する保存培養を、AAC を 0.1%，グリセリンを 0—1.8% 添加した試験培地に接種し、孢子形成培養した場合の結果を Fig. 4 (b) に示した。この場合もグリセリン添加濃度とともに総菌数および OD が上昇したが、孢子数 (Stage V) はグリセリン添加濃度によって余り影響されず 0—1.8% 添加範囲においてほぼ同等の値を示した。ET 産生は、グリセリン無添加では多数の孢子が形成されたにもかかわらず陰性であり、グリセリン 0.6% 添加により上昇した。また、グリセリン 1.2 および 1.8% 添加でも 0.6% 同様に高い値を示した。

考 察

酢酸ナトリウムは Putrefactive Anaerobe 3679 の孢子形成に促進的に作用し (10), *Clostridium thermosaccharolyticum* 3814 は培地中に蓄積された酢酸を孢子の脂質中に取り込む (11) と云われる。また、*Clostridium botulinum* の場合も孢子形成とともに蓄積酢酸を消費する (12) ことが知られている。供試株 NCTC 8238 および 8798 の場合には、AAC の添加により孢子形成および ET 産生が高められ、更に、8238 においては少量のグルコースを、8798 においてはグリセリンを添加すると、AAC の孢子形成効果を抑制せずに、AAC の ET 産生効果のみが更に上昇した。また、8238 の場合、酢酸ナトリウムの添加よりも AAC の添加が ET 産生および孢子形成を促進した。このことから、ウェルシュ菌 NCTC 8238 および 8798 においては、AAC は孢子形成および ET 産生に必要なアミノ酸の合成に利用され、また、適当な炭素源がエネルギー源として適量に存在すると、孢子形成に対し余剰に存在した AAC は特に ET の合成のために更に利用されるものと推測される。なお、8798 の場合、グルコースの少量添加により、AAC 添加による孢子形成および ET 産生の促進が阻害されたが、Labbe ら (13) は NCTC 8798 について孢子形成の Stage II あるいは III においてグルコース (0.01%) を加えるとデンプン添加 DS 培地による孢子形成培養と同等に耐熱性孢子が形成されることを認めている。

NCTC 8798 において、グリセリン無添加 (AAC 添加) 培地に、Stage III で止まる培養を接種した場合には孢子形成が比較的低いにもかかわらず ET 産生が認められ、一方、Stage V まで進む培養を接種した場合には孢子形成が高いにもかかわらず ET 産生は陰性であった。これらのことから、ET 産生に必要な

エネルギー源が十分でなく胞子嚢におけるE T産生が少量の場合、胞子の成熟が低い段階に止まれば胞子嚢中にE Tが蓄積・残存し、胞子が高い段階まで成熟すると胞子嚢中のE Tは消費され検出されなくなると推測される。なお、DuncanらはE Tは胞子殻 (Spore coat) タンパク質の構成成分であり (14)、両者の間には密接な関係があること (15)、E Tを含む胞子タンパク質の合成は胞子形成の比較的初期に起こること (16) を明らかにし、また、胞子形成の Stage III—Stage V で断された変異菌株がE Tを産生すること (17) を確かめている。

要 約

ウェルシュ菌 (NCTC 8238, 8798) のエンテロトキシン (E T) 産生および胞子形成におよぼす酢酸アンモニウム (A A C) 添加の影響を検討した。

1) 胞子形成培地 (可溶性デンプン 0.4%含有) にA A Cを添加した場合、NCTC 8238 では 0.3%、NCTC 8798 では 0.1%の添加によって、E T産生および胞子形成が上昇した。

2) NCTC 8238 の場合には、胞子形成培地にグルコース (0.01—0.05%) を添加することにより、またNCTC 8798 の場合にはグリセリン (0.6—1.8%) を添加することによりA A CのE T産生効果が著しく上昇した。

引 用 文 献

- 1) 善養寺浩 (1965). 食衛誌, 6, 133-143.
- 2) Hauschild, A. H. W. (1973). *Can. Inst. Food*

- Sci. Technol. J.*, 6, 106-110.
- 3) Duncan, C. L. and Strong, D. H. (1968). *Appl. Microbiol.*, 16, 82-89.
- 4) 刑部陽宅, 児玉博英 (1976). 食衛誌, 17, 219-226.
- 5) Sacks, L. E. and Thompson, P. A. (1978). *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 405-410.
- 6) 谷口忠敬 (1968), 食衛誌, 9, 214-218.
- 7) Murrell, W. G. (1967). *Advances in Microbial Physiology*, vol. 1, ed. by Rose, A. H., Academic Press Inc., New York, 135-136.
- 8) 谷口忠敬, 橋 勝康 (1980). 本誌, No. 48, 35-39.
- 9) 谷口忠敬 (1978). 食衛誌, 19, 195-200.
- 10) Frank, H. A. and Lum, N. A. (1969). *Spores IV*, ed. by Campbell, L. L., American Society for Microbiology, Maryland, 298-305.
- 11) Pheil, C. G. and Ordal, Z. J. (1967). *Appl. Microbiol.*, 15, 893-898.
- 12) Day, L. E. and Costilow, R. N. (1964). *J. Bacteriol.*, 88, 690-694.
- 13) Labbe, R. G. and Duncan, C. L. (1975). *Appl. Microbiol.*, 29, 345-351.
- 14) Friebe, W. R. and Duncan, C. L. (1973). *Eur. J. Biochem.*, 39, 393-401.
- 15) Friebe, W. R. and Duncan, C. L. (1975). *Eur. J. Biochem.*, 55, 455-463.
- 16) Labbe, R. G. and Duncan, C. L. (1977). *J. Bacteriol.*, 131, 713-715.
- 17) Duncan, C. L. Strong, D. H. and Sebald, M. (1972). *J. Bacteriol.*, 110, 378-391.