●総 説

細菌の毒素産生とファージ

——ボツリヌス菌を中心として——

飯 田 広 夫

北海道大学 医学部 細菌学教室

札幌市北区北15条西7丁目 〒060

〔受付：6月14日，1985年〕

はじめに

ボツリヌス菌ファージ

無毒変異株の分離

ファージによる毒素産生能の伝達

伝達因子の究明

ファージ c-n 71

赤血球凝集素とファージ

変換された有毒株のファージによる変換

伝達された毒素産生能の安定性

分類学上の問題

はじめに

ある種の細菌毒素の産生が，ファージと密接な関連性をもつことは，よく知られた事実である。このうち，特によく知られているのは，ジフテリア菌毒素およびA群溶連菌の発赤毒素とファージとの関連性であろうが，ここには主として筆者らの行ってきた，ボツリヌス菌の毒素産生とファージとの関連性について述べる。

Freeman (1951)¹⁾ は，毒素非産生性のジフテリア菌株を，毒素産生性のジフテリア菌から得たBファージ溶菌液で処理すると，得られた溶菌液はジフテリア毒素の毒性を示すようになり，その際，生残った菌の一部は，毒素産生能をもつようになると同時に，このファージの感染に対して免疫となり，溶原性となることを見出した。

その後，Barksdale ら²⁾ (1954) は，Freeman のこの溶菌性Bファージ液には，毒素非産生性の指示菌のローンに不透明なブラークを作る溶原ファージ β と，透明な

ブラークを作るその毒力変異株ファージBとが混在していて，毒素非産生株を産生株に変化させるのは，Bファージではなくて，溶原ファージ β であることを明らかにした。また Groman³⁾ (1955) は，彼の毒素産生溶原株C₄(β) から，溶原性を失った (cure された)【コロニーを分離することに成功した。これを調べてみたところ，溶原性を失うと同時に，毒素産生能も失われていた。このcure された株は，再び β ファージによつて溶原化され，それと同時に再び毒素産生能をもつようになることが知られた。

現在のところ，ファージ β は，ジフテリア毒素たんばくの構造遺伝子を有し，溶原化による毒素産生能の獲得は，この tox gene の表現であると考えられている。ジフテリア毒素の産生とファージについてのさらに詳しい総説は，松田⁴⁾ (1968)，内田⁵⁾ (1976)，Singer⁶⁾ (1976) の総説にみられる。

もうひとつのよく知られる例は，A群溶連菌の発赤毒素産生とファージとの関連性である。古く Frobisher ら⁷⁾

(1927) は、溶連菌の発赤毒素産生株から分離される filtrable agent が、発赤毒素非産生株に発赤毒素を産生させるようになることを報告したが、この現象がファージによる変換であることを明らかにしたのは Zabriskie⁸⁾ (1964) である。すなわち、発赤毒素産生株から分離したファージで、cure された毒素非産生株を溶原化すると、発赤毒素を産生するようになるのである。

このほかにも、ブドウ球菌の α 毒素、エンテロトキシンについても、ファージとの関連性が報告されており、また β 毒素については、溶原性の確立とともにその毒素産生能の抑制されることが知られている。

ボツリヌス菌ファージ

ボツリヌス菌のファージを最初に報告したのは、Vinet⁹⁾ (1968) である。彼らは C 型菌 (468 株) の培養液中に 8 面体の頭部をもつ大形の (全長 460 nm) ファージを見出している。われわれ¹⁰⁾ (1968) は、ボツリヌス菌 A～F 型の毒素産生株を、それぞれ 1 株ずつ用いて、TYG 培地での若い培養液を紫外線 (UV) 照射もしくはマイトマイシン (MC) C 処理し、いずれの型においても溶菌の見られることを知り、その上清を超高速遠沈して得られたペレットをネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察して、ファージ、もしくはファージ成分と思われる像を得た。

これらのファージは、形態学的につぎのグループに分けられた。

- (1) A 型 (190 株)
- (2) C 型 (Stockholm 株) および D 型 (1873 株)
- (3) B 型 (QC 株), E 型 (神山株) および F 型 (OSU 株)

その後、Eklund¹¹⁾ (1969) は、E 型、たんばく分解性および非分解性の B 型、たんばく分解性の F 型菌株を用い、これらの培養液をマイトマイシン C 処理した材料について、電子顕微鏡による観察を行い、種々の形態のファージを報告している。また Dolman¹²⁾ (1972) は、A～F 型の計 41 菌株を用いて電子顕微鏡による観察を行い、それらのファージを形態学的につぎの 4 群に区別している。

- (1) たんばく分解性の A, B および F 型
- (2) たんばく非分解性の B および F 型
- (3) C および D 型
- (4) E 型

その後、武士¹³⁾ は、G 型菌ファージについてその形態を観察している。また Kinouchi¹⁴⁾ (1981) は、A 型

菌 (190 L 株) と、これから得られた変異無毒株について、両者がともに α_1 , α_2 と名付ける 2 種のファージを有すること、これらのファージは毒素産生性に無関係と考えられることを報告している。

無毒変異株の分離

以上の実験から、ボツリヌス各型菌の毒素産生株の多くは溶原菌であり、誘発によつてファージを産生するであろうと考えられたので、つぎにこれらのファージに対して感受性をもつ cure された菌を指示菌として得ることが必要となつた。そこでわれわれ¹⁵⁾ (1971) は、これらの菌に紫外線、マイトマイシン C, N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG), もしくはアクリジンオレンジ (AO) などによる処理を行うことによつて、溶原性の除去を試みた。処理菌が cure されたか否かをみるには、処理菌の若い培養細胞が、それぞれのファージ (溶原菌を MC-C 処理した汙液, すなわち induced lysate) によつて溶菌されるか否かを調べた。一方、処理菌のコロニーについて、そのクックドミート (CM) 培地の培養上清の毒性をマウスを用いて調べた。

その結果、C 型菌 (Stockholm 株) と D 型菌 (1873 株) に多くの無毒株が得られたので、これらを指示菌として用いることにした。その後 Eklund¹⁶⁾ も、C 型、D 型菌株から、AO もしくは UV 処理によつて、高率に無毒の非溶原株を分離することに成功しており、また Perova¹⁶⁾ (1975) は、A 型および B 型の 10 株を用い、AO 処理もしくは UV 照射によつて、B 型の 3 株に無毒株の出現を認めたと報告している。

ファージによる毒素産生能の伝達

以上の実験から、ファージと、これに感受性を示す無毒の指示菌が、C 型および D 型については得られたので、ファージによる毒素産生能の伝達が起こるか否かを調べてみた。最初は、平板培地上で C 型および D 型菌の均等なローンを得ることが困難であつたが、その後プラークを作ることに成功してから、ファージの純化も可能となつた。しかし多くの実験は、ファージとして有毒株培養液の induced lysate を無菌汙過したものをを用いた。

指示菌の対数増殖期の培養液 0.5 ml と、上述のファージ液 0.5 ml を TYG 培地あるいは LYG 培地の 2 ml に加え、37°C, 4 時間おいた後、その 0.2 ml を CM 培地に移し、37°C, 2～4 日間培養後、その培養上清の 10 倍希釈液——この希釈によつてファージ液とともにもち込まれた毒素は致死量以下になる——の 0.5 ml をマウ

表 1. 実験に用いた菌株とファージ

菌 株 名	毒素産生能	株 由 来	ファージ	
			ファージ名	変換能
C-Stockhoml (ST)	+		c-st	+
C-AO 2	-	C-ST の AO 処理		
C-N 71	-	C-ST の NTG 処理	c-n 71	-
C-468	+		c-468	+
C-468 U 16	-	C-468 の UV 処理		
C-468 U 31	-	" "		
C-201 NT	-	C-201 の継代中無毒化		
C-203	+		c-203	+
C-203 NT	-	C-203 の継代中無毒化		
C-203 AO 1	-	C-203 の AO 処理		
C-203 MC 1	-	C-203 の MC 処理		
C-203 U 28	-	C-203 の UV 処理		
C-203 U 38	-	" "		
C-6812	+		c-6812	?
C-6813 NT	-	C-6813 の継代中無毒化		
C-6814 NT	-	C-6814 "		
C-6816 NT	-	C-6816 "		
C-D 6 F	+		c-d 6 f	+
C-YH 14	+		c-yh 14	?
D-1873	+		d-1873	+
D-134	-	D-1873 の AO 処理		
D-139	-	" "		
D-151	-	" "		
D-South African (SA)	+		d-sa	+
D-SANT	-	D-SA の継代中無毒化		
D-4947	+		d-4947	+

スの腹腔内に注射して、毒素産生の有無を調べた。またこの培養液を血液寒天平板に塗抹し、37℃、2日間嫌氣的に培養し、生じた集落を20～50個拾ってCM培地に移し、毒素産生能の有無を調べた。毒素の証明されたものについては、抗Cおよび抗D型の抗毒素血清によりその型を調べた^{17,18)}。

以上の実験を、さらに多くのC型およびD型菌株を用いて実施した結果を表1～3に示した。

これらの表にみられるように、毒素産生能の伝達は、C型あるいはD型の同型の間に起こるのみならず、有毒のD-1873株から得られた無毒のD-139株は、親株のファージd-1873には感受性を示さず、C型有毒株から得られたファージc-stおよびc-468によつて溶菌をうけ、生き残った菌はC型毒素を産生することが知られた。また同じく有毒のD-1873株から得られた無毒のD-134株、D-151株は、C型ファージc-203、c-d 6 fによつて溶菌をうけ、生き残った菌はC型毒素を産生することが知られた。

以上のことは、産生される毒素の型が、宿主菌ではなく、ファージによつて決定されることを示している。後にEklund & Poysky¹⁹⁾ (1974)も同様の結果を報告しているが、彼らはさらにC型の無毒株C-153株に、D型ファージd-1873を感染させると、D型毒素の産生が認められたと報告している。

表3には、ファージc-stおよびd-1873を用いた場合の、有毒株の出現頻度が示されているが、いずれの場合においてもこの頻度はきわめて高く、このことは、この伝達現象がファージ変換 (phage-conversion) によるものであることを示唆している。

表 2. ファージによる毒素産生能の伝達

指示菌 ファージ	C-AO 2	C-N 71	C-463 U 31	C-201 NT	C-203 AO 1	C-203 MC 1	C-203 U 28	U-203 U 38	C-6813 NT	C-6816 NT	D-134	D-139	D-151	D-SANT
c-st	C	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—
c-468	C	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—
c-203	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	C	—
c-d 6 f	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	C	—
c-yh 14	—	—	—	—	•	•	•	—	—	—	•	—	—	•
c-6812	—	—	—	—	•	•	•	—	—	—	•	—	—	•
d-1873	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D	—	D	—
d-sa	—	—	—	•	—	—	—	•	—	•	—	—	—	D
d-4947	—	—	—	•	—	—	—	•	—	•	—	—	—	D

• : 未試験

表 3. ファージによる毒素産生能の変換率

指示菌	ファージ	調べたコロニー数	変換されたコロニー数	変換率%	毒素の型
C-AO 2	c-st d-1873	50	48	96	C
		50	0	0	
D-139	c-st d-1873	80	75	94	C
		50	0	0	
D-151	c-st d-1873	50	0	0	D
		50	44	88	

表 4. Lysate の変換能に及ぼす種々の因子の影響

処 理 因 子	調べたコロニー数	変換されたコロニー数	変換率%
対 照	20	20	100
トリプシン*1	20	18	90
DNase*2	20	20	100
抗 血 清*3	20	0	0
戸 過*4	20	0	0
加 熱*5	20	0	0

*1 トリプシン: Sigma, 100 $\mu\text{g/ml}$, pH 8.2, 37 C, 2 時間。

*2 DNase: Worthington, 20 $\mu\text{g/ml}$, pH 7.2, 37 C, 2 時間。

*3 抗血清: anti-c-n 21 ファージ血清, 1 : 60, 20 C, 3 時間。

*4 戸過: Gelman filter, ポアサイズ: 50 nm。

*5 加熱: 60 C, 30分。

伝達因子の究明

有毒株の lysate 中に存在する毒素産生能の伝達因子がファージであることを証明するために, lysate をトリプシン, DNase, 加熱, 戸過, 抗ファージ血清などによって処理し, 伝達能に変化が見られるか否かを調べた。その結果を表 4 に示した。

表 4 に明かなように, 毒素産生能の伝達因子は, トリプシン, DNase によつては影響をうけないが, 加熱 (60 C, 30 分間), 戸過 (pore size: 50 nm) および抗ファージ血清によつてその伝達能を失なう。このことは, 伝達因子がファージであることを強く示唆している。

ファージ c-n 71

毒素産生能を有する C Stockholm 株を, NTG 処理して得られた無毒の C N-71 株は, 親株から得られたファージ c-st によつて, 溶菌も変換も受けない。この N-

71 株の培養を MC 処理すると, 著明な溶菌を起こし, その lysate 中にはファージ c-st と形態的に区別のつかないファージ c-n-71 が認められた。この n-71 は, c-st の指示菌である C-AO 2 株を溶菌するが, この場合には毒素産生能の伝達は起こらない。

われわれ^{20,21)} (1975) は, 毒素産生能を伝達し得るファージ c-st と, これを伝達し得ないファージ c-n-71 について, 比較検討を試みた。まず種々の無毒株を指示菌として, 両ファージの溶菌スペクトルを調べたところ, 両者はほとんど同一の溶菌スペクトルを示した。また, トリプシン, DNase, 加熱などの処理が両ファージに及ぼす影響を調べたところ, その影響は両者の間でほとんど変りなかつた。またファージ c-n-71 で免疫した家兎血清は, ファージ c-n-71 の溶菌性を中和するとともに, ファージ c-st の毒素産生能の伝達性および溶菌性をも中和することが知られた。これらの実験によつて, 両ファージは, 抗原的にも同一であろうと考えられた。われわれは, ファージ c-n-71 が, ファージ c-st の毒素産生遺伝子に変異を来した変異ファージであろうと考えている。

赤血球凝集素とファージ

ボツリヌス A 型菌の産生する赤血球凝集素 (HA) については, Lamanna²²⁾ (1948) によつてはじめて報告され, DasGupta & Boroff²³⁾ (1968) によつて, これが毒素分子とは異なるたんばくであることが明らかにされた。

Sterne²⁴⁾ (1954) は, D 型菌の産生する HA が, D 型のみならず, C 型抗毒素血清によつても中和されることを報告し, Balding ら²⁵⁾ (1973) は, リセプターの点から, C 型および D 型の HA が, A 型のそれとは異なることを報告している。

Oguma ら²⁶⁾ (1976) は, HA 産生能のファージによる伝達の有無を調べて, つぎのような結果を得ている。LYG 培地, CM 培地, EM (egg meat) 培地および NZ アミン培地に種々の C 型菌および D 型菌をうえ, 37 C, 7 日間培養の後, その上清を希釈し, これにモルモット, マウス, 家兎, ニワトリ, ヒツジ, サルおよびヒトの 1% 赤血球浮遊液を等量に加えて, 37 C, 2 時間置いた後, さらに 4 C, 1 夜放置後に HA 活性の有無を調べている。その結果は, 表 5 および表 6 に示す通りであつた。

これらの表から知られるように, 有毒株の大部分は HA を産生するが, ある種の菌株 (たとえば D-1873 株)

表 5. 種々の培地における HA の産生
(モルモット血球)

培地	LYG	CM	EM	NZ-A
菌株				
C-Stockholm	16	4	4	4
C-203	8	2	4	8
D-1873	HL*	HL	HL	HL
D-SA	HL	<2	4	2
C-N 71	8	4	2	4
C-AO 2	<2	<2	<2	<2
C-203 NT	<2	<2	<2	<2
C-203 U 28	<2	<2	<2	<2
D-134	<2	<2	<2	<2
D-139	<2	<2	<2	<2
D-151	<2	<2	<2	<2
D-SANT	<2	<2	<2	<2

数字は HA 活性を示す培養上清液の最大希釈倍数
*HL: 溶血

表 6. 種々の赤血球を用いた HA 反応
(LYG 培養上清液)

赤血球	ヒ ト			サル	ヒツジ	マウス	トリ
	A	B	O				
菌株							
C-Stockholm	32	32	32	2	2	4	4
C-203	64	64	64	4	2	4	8
D-1873	HL*	HL	HL	HL	HL	HL	HL
C-N 71	64	32	64	4	2	4	8

数字は HA 活性を示す培養上清液の最大希釈倍数
*HL: 溶血

では、溶血素 (HL) の作用によって、HA 活性は明瞭には認め難かった。一方、無毒株の大部分は、HA を産生しなかった。ただし、CN-71 のみは、明らかに HA を産生した。この菌株は誘発によつて毒素産生性の変換能をもたないファージ c-n-71 を産生し、このファージは表 7 に見られる通り、HA 産生能を伝達し得ることが知られた。

HA 産生株から得られた 3 種類のファージ (c-st, d-sa, c-n-71) を用いて、HA 産生能の伝達の起こるか否かを調べた成績が表 7 に示してある。

以上の実験成績から、毒素産生を支配する遺伝子と、HA 産生を支配する遺伝子とは同一ではないこと、しかし両者は同一のファージによつて伝達され得ることが知られた。

表 7. ファージ感染菌の HA 産生

菌 株 (ブランクからの培養菌)	HA-力価 (ヒト赤血球)	毒素-力価
C-AO 2 (c-st)	1 256 2 256 3 64 4 64 5 64 6 64 7 64 8 32 9 32 10 32	10 ⁵ MLD/ml " 10 ⁴ " " " " 10 ⁴ " 2×10 ³ " "
C-AO 2 (c-n 71)	1 64 2 32 3 32 4 32 5 16 6 16 7 16	— — " " " " "
D-SANT (d-sa)	1 8 2 8 3 8 4 4 5 4 6 4 7 4 8 4 9 2	2×10 ³ " " 2×10 ³ " " " " " 2×10 ² "
対照		
C-AO 2	<2	—
D-SANT	<2	—

∴ 未試験

現在われわれは、ボツリヌス各型菌の産生する HL について研究を進め、各型菌株によつて産生される HL の差異、また HL の産生とファージとの関連について調べている。

変換された有毒株のファージによる変換

有毒株からのファージによつて、毒素産生能を新たに獲得した種々の菌株から、再び UV もしくは MC 処理によつてファージを誘発し、これらのファージを種々の指示菌に作用させて、毒素産生能の伝達を試みた²⁷⁾。その結果は、表 8 に示す通りである。

表 8. 変換された有毒株のファージによる毒素産生能の伝達

変換された有毒株	指 示 菌										
	C 型										D 型
	AO 2	468 U16	468 U28	203 U28	203 U38	201 NT	6813 NT	6814 NT	6816 NT	N71	139
C-AO 2 (c-st)	C	C	C	—	—	—	—	—	—	—	C
C-468 U 31 (c-st)	C	C	C	—	—	—	—	—	—	—	C
D-139 (c-st)	C	C	C	—	—	—	—	—	—	—	C
D-151 (c-d 6 f)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
D-151 (c-203)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
D-151 (d-1873)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D

表 8 に明らかなように、ファージ c-st はその propagating host が C AO-2 株、C 418-U 31 株であろうと、D 139 株であろうと、常に C 型毒素の産生能を伝達する。またファージ c-d 6 f, c-203 は、これを D 151 株で増殖させても、C 型毒素の産生能を伝達する。このように、伝達される毒素の型は、ファージ自身によつて決定され、ファージの propagating host によつては影響をうけない。この事実も上述の伝達現象が、導入 (transduction) ではなく、ファージ変換であることを示唆している。

伝達された毒素産生能の安定性

有毒株から得られたファージによつて、無毒株に伝達された毒素産生能は、安定した状態でつぎつぎと子孫細胞に伝えられてゆくものであろうか。それとも継代とともにその毒素産生能は失われてゆくであろうか。これは毒素産生を支配する遺伝子の、宿主細菌細胞内における存在様式と関連して興味ある問題である。Oguma²⁹⁾

(1976) は、種々のファージと指示菌とを用いて、この問題を詳細に検討している。

ファージとしては、c-st, c-n-71, c-203 および d-1873 を用い、指示菌としては、C AO 2 株、D 139 株および D 151 株を用いた。指示菌の培養液にそれぞれのファージを加えて、37°C、4 時間置いた後、その一白金耳を血液寒天平板に塗抹し、37°C、2 日間嫌氣的に培養する。生じたコロニーを CM 培地に移し、37°C、2 日間培養して、その上清に毒素の認められたものを original culture とした。

この出発材料を血液寒天平板に塗抹、培養するとともに、その 0.2 ml を CM 培地に移し、この継代を第 10 代まで行い、各代における平板培地上のコロニーを任意に 10~20 個拾つて CM 培地に培養し、調べた全コロニー中に占める有毒株コロニーの割合を算出した。この継代は、抗ファージ血清の存在下と非存在下の両者について行つた。実験結果は表 9 に示した通りである。

表 9 から明らかなように、指示菌とファージの組合せ

表 9. 伝達された毒素産生能の安定性

菌 株	抗ファージ血清	変 換 率	出発材料	継 代 培 養				
				1	2	4	8	10
C-Stockholm	—		20/20	•	18/20	17/20	2/20	5/20
C-AO 2 (c-st)		15/20	18/20	•	20/20	10/20	8/20	2/20
D-139 (c-st)		4/20	19/20	•	5/5	1/20	2/20	0/10
D-151 (d-1873)		10/10	20/20	•	19/20	15/20	19/20	20/20
D-151 (c-203)		10/10	3/10	17/20	9/20	4/20	•	2/20
C-Stockholm	+		20/20	•	7/10	3/10	0/10	0/10
C-AO 2 (c-st)		15/20	18/20	•	10/10	6/10	0/10	0/10
D-151 (d-1873)		10/10	20/20	•	18/20	15/20	8/20	6/20
D-151 (c-203)		10/10	3/10	1/20	0/20	0/20	•	0/20

分母：調べたコロニー数、分子：有毒コロニー数、•：未試験

のあるものにおいては、伝達された毒素産生能は著しく不安定であり、速かに無毒株が出現してくる。無毒株の出現は、抗ファージ血清の存在下においてより速かに見られるが、抗ファージ血清なしにも認められる。このような実験結果は、ファージによつて伝達される毒素産生遺伝子が、必ずしも宿主菌の染色体にくみ込まれるのではなく、細胞質内に不安定な状態で存在するものであることを示唆している。Eklund ら²⁹⁾ (1971) も同様の現象を報告しており、これを pseudolysogeny の状態と呼んでいる。

つぎに継代によつて得られる無毒株の性状について調べてみた。抗ファージ血清の存在下で得られる無毒株

表 10. 継代によつて出現する無毒株のファージに対する感受性

無 毒 株	抗ファージ血清	フ ェ ー ジ					
		c-st		d-1873		c-203	
		溶菌	変換	溶菌	変換	溶菌	変換
C-Stockholm 2*		—	—	•	•	•	•
" 10		—	—	•	•	•	•
C-AO 2 (c-st) 4		—	—	•	•	•	•
" 10		—	—	•	•	•	•
D-139 (c-st) 4		—	—	•	•	•	•
" 10	—	—	—	•	•	•	•
D-151 (d-1873) 4		•	•	+	+	•	•
" 8		•	•	+	+	•	•
D-151 (c-203) orig.		•	•	•	•	+	+
" 1		•	•	•	•	+	+
" 2		•	•	•	•	—	—
" 10		•	•	•	•	—	—

*: 継代数

は、いずれも cure された菌のみであつて、もとのファージによつて感染をうけ、溶菌と変換をうける。これに反して、抗ファージ血清を加えないで継代した系列から得られる無毒株は、表10に見られるように、もとのファージに感受性を示すものと、示さないものとの両者が存在することを知つた。

さらに継代培養の上清中に、変換能をもつファージが存在するか否かを知るために、各継代ごとにその上清液をとり、これを指示菌に作用させて変換が起こるか否かを調べた。

結果は表11に示した通りで、抗ファージ血清の存在下で継代した場合には、当然変換は起こらなかつたが、抗ファージ血清なしで継代した場合には、その18時間培養の上清を指示菌に作用させると、いずれも毒素産生能の伝達が見られ、変換能をもつファージの存在することを知つた。また、20個のコロニーを拾つて、そのすべてが無毒株であつた場合でも、培養液中には 20 MLD/ml 程度の毒素の存在することが知られた。

以上の事実から、有毒株を抗ファージ血清なしに継代した場合には、染色体と離れて存在する毒素産生能の支配遺伝子がしばしば失われ、このようにして生じた無毒株が、再び培養液中のファージによつて再感染をうけ、有毒化することが起こり得ると考えられた。

分類学上の問題

すでに述べたように、われわれ¹⁸⁾ (1971) もまた Eklund & Poysky¹⁹⁾ (1974) も、ボツリヌス C 型あるいは D 型菌から得られる無毒株のあるものに、C 型ファージを感染させるといづれも C 型毒素を産生し、D 型ファージを感染させるといづれも D 型毒素を産生するようになることを報告している。したがつて C 型菌と D 型菌との区別

表 11. 継代培養上清中のファージの存在

菌 株	抗ファージ血清	継 代 数				
		2	4	6	8	10
C-Stockholm		d	d	d	d	d (17/20) *1
C-AO 2 (c-st)		d (18/20) *1	d	d	d	d
D-151 (d-1873)	—	d (10/10) *1	d	d	d	d (0/20) *2
D-151 (c-203)		d (0/20) *2	d (0/20) *2	•	•	•
C-AO 2 (c-st)	+	s (0/20)	s	s	s	s
D-151 (c-203)		s	s	s	s	s (0/20)

d: マウス死=ファージ (+) s: マウス生=ファージ (—)

*1: 2,000 MLD/ml *2: 20 MLD/ml •: 未試験

は、感染ファージの差によつて決定されるということができよう。

近年 Eklund ら³⁰⁾ (1974) は、ボツリヌスC型の無毒株に、ボツリヌスC型、D型および *C. novyii* A型の各菌株から得られたファージを感染させたところ、それぞれの特異的な毒素を産生する有毒株が得られたと報告している。すでに Holdeman & Brooks³¹⁾ (1970) は、ボツリヌスC型菌と *C. novyii* の生化学的性状がきわめて類似していることを報告しており、これらの菌は、それが産生する毒素の性状によつてのみ区別されるのではないかと考えられる。たんばく分解性のボツリヌスA型、B型菌と、*C. sporogenes* との間にも、きわめて類似した生物学的性状が認められており、この3者については Lee & Rieman³²⁾ (1970) が、これらが互いに高い DNA-homology を示すことを報告している。おそらくこれらの菌株の間にも、ファージによる毒素産生能の伝達が可能ではないかと考えられる。もしそれが可能であると考えれば、*C. sporogenes* は毒素産生能を失った *C. botulinum* であると考えすることは不合理ではなくなり、両種を区別することの意義は薄れるであろう。

このように、ボツリヌス菌C型およびD型の分類を、単にそれらの菌株が感染をうけているファージによつて決定されるとする考えに対して、Dolman & Murakami³³⁾ (1961) は、C型およびD型菌は、[抗原性、糖分解性、種々の動物に対する病原性、地理的分布そのほかの生態などの点で明らかに異なるものと考えている。たとえば $C\alpha$ 型は主として野生の鳥類に中毒を起こすが、 $C\beta$ 型は主として種々の哺乳動物（ウマ、ミンク、イヌなど）に中毒を起こし、一方、ウシ、ヒツジ、ヤギ、モルモットは特にD型毒素に対して感受性が高いという。さらに、C型菌は広く世界の各地で分離され、特にアルカリ性の沼地の泥からは $C\alpha$ 菌が高率に検出される。これに対してD型菌は、主としてアフリカに見出され、暑い、乾燥した草原に分布しているという。ボツリヌスC型、D型のこのような生態の差が、ファージとどのような関連性をもつかは、今後の問題として興味深い。

文 献

- Freeman, V. J. (1951): J. Bacteriol., **61**, 675.
- Barksdale, W. L. and Pappenheimer, A. M. Jr. (1954): J. Bacteriol., **67**, 220.
- Groman, N. B. (1955): J. Bacteriol., **69**, 9.
- 松田守松 (1968): 蛋白質・核酸・酵素, **13**, 988.
- 内田 驥 (1976): 蛋白質・核酸・酵素 (別冊「細菌毒素研究」) 9.
- Singer, R. A. (1976): "Mechanisms in Bacterial Toxinology", Wiley and Sons, 1.
- Frobisher, H. Jr., and Brown, J. H. (1927): Bull. Johns Hopkins Hosp., **41**, 167.
- Zabriskie, J. B. (1964): "The Streptococcus, Rheumatic Fever and Glomerulonephritis", Williams and Wilkins, 13.
- Vinet, G., Berthiaume, L. and Fredette, V. (1968): Rev. Canad. Biol., **27**, 73.
- Inoue, K. and Iida, H. (1968): J. Virol., **2**, 537.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T. and Boatman, E. S. (1969): J. Virol., **3**, 270.
- Dolman, C. E. and Chang, E. (1972): Canad. J. Microbiol., **18**, 67.
- 武士甲一: 未発表
- Kinouchi, T., Takumi, K. and Kawata, T. (1981): Microbiol. Immunol., **25**, 915.
- 井上勝弘, 飯田広夫 (1971): 北海道衛生研究所報, **12**, 26.
- Perova, E. V., Golikov, V. I., Bulatova, T. I. and Ilyashenko, B. N. (1975): J. Microbiol. Epidemiol. Immunol., **6**, 89.
- Inoue, K. and Iida, H. (1970): Jap. J. Microbiol., **14**, 87.
- Inoue, K. and Iida, H. (1971): Jap. J. Med. Sci. Biol., **24**, 53.
- Eklund, M. W. and Poysky, F. T. (1974): Appl. Microbiol., **27**, 251.
- 小熊恵二 (1974): 北海道医学雑誌, **49**, 137.
- Oguma, K., Iida, H. and Inoue, K. (1975): Jap. J. Microbiol., **19**, 167.
- Lamanna, C. (1948): Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **69**, 312.
- DasGupta, B. R. and Boroff, D. A. (1968): J. Biol. Chem., **243**, 1065.
- Sterne, M. (1954): Science, **119**, 440.
- Balding, P., Gold, E. B., Boroff, D. A. and Roberts, T. A. (1973): Immunol., **25**, 773.
- Oguma, K., Iida, H. and Shiozaki, M. (1976): Infect. Immun., **14**, 597.
- Oguma, K., Iida, H. and Inoue, K. (1973): Jap. J. Microbiol., **17**, 425.
- Oguma, K. (1976): J. Gener. Microbiol., **92**, 67.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Reed, S. M. and Smith, C. A. (1971): Science, **172**, 480.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Meyers, J. A. and Polrey, G. A. (1974): Science, **186**.
- Holdeman, L. V. and Brooks, J. B. (1970): "Toxic Microorganisms" UJNR Joint Panels on Toxic Microorganisms, 278.
- Lee, W. H. and Rieman, H. (1970): J. Gener. Microbiol., **64**, 85.
- Dolman, C. E. and Murakami, L. (1961): J. Infect. Dis., **109**, 107.