食中毒原因性クロストリジウム属細菌芽胞の発芽 に関する研究 (第5報)

易熱性ウエルシュ菌芽胞のイオンによる発芽

(昭和 49 年 7 月 6 日受理)

安 藤 芳 明*

Studies on Germination of Spores of Clostridial Species Capable of Causing Food Poisoning (V)

Ionic Germination of Spores of Some Heat-sensitive Strains of *Clostridium perfringens* Type A

Yoshiaki ANDO

(Hokkaido Institute of Public Health: Kita-ku, Kita 19, Nishi 12, Sapporo)

Germination requirements for spores of three heat-sensitive strains of *C. perfringens* type A, S-40, S-45, and FDI, have been examined by estimating a fall in optical density of spore suspensions as the criterion of germination. The results are summarized as follows:

- 1) Heat-activated spores of these strains underwent so-called "ionic germination" in aqueous solutions of divalent alkali earth metal chlorides in combination with monovalent alkali metal chlorides. The chloride ion proved to be an essential germinant for these strains.
- 2) The maximum germination occurred with a triple combination of CaCl_2 , NH_4Cl , and NaCl .
- 3) The optimum condition for heat-activation of the spores was heat-shocking at 80°C for 10 min.
- 4) The experiments employing sequential addition of the three chlorides revealed that ions acted each other in a synergistic manner in initiating germination since each salt alone was almost ineffective. Therefore, this was not the case of "fractional germination", proposed by Rode and Foster.

(Received July 6, 1974)

緒 言

食中毒を起こすA型ウエルシュ菌には、従来の Hobbs 型耐熱性芽胞形成株に加えて、Hall ら¹⁾により分離された易熱性芽胞形成株も含まれている。その起病性の本体は、最近、Duncan ら²⁾、Hauschild ら³⁾によって芽胞形成時に産出されるエンテロトキシンであることが証明された。

ウエルシュ菌による食中毒は、食品中で産生されるエンテロトキシンによるよりはむしろ食品とともに摂取さ

れた生菌が腸管内で芽胞を形成する際に産生するエンテロトキシンによって引き起こされるものと考えられている⁴⁾が、いずれにしても本菌芽胞がまず食品中で発芽した後発育増殖しなければならないはずである。したがって、本菌芽胞の発芽機構の究明はウエルシュ菌による食中毒発生機構を知る上に大いに役立つものと思われる。

ウエルシュ菌芽胞の発芽要求に関しては、今日ほとんど明らかにされていない。著者はさきに耐熱性ウエルシュ菌 (Hobbs 型 2) 芽胞の発芽要求を研究し、本菌芽胞が K^+ のようなイオン単独で発芽し得ることを見だし

* 北海道衛生研究所: 札幌市北区北 19 西 12

Fig. 1. Effect of heat-activation of spores of *C. perfringens*, S-40 on the subsequent germination by a mixture of inorganic chloride salts

Spore suspensions were preheated at the indicated temperatures for 10 min, then incubated at 40°C in an aqueous solution of CaCl₂, NH₄Cl, and NaCl (each 100 mM).

Fig. 2. Effect of heat-activation of spores of *C. perfringens*, FD 1 on the subsequent germination by a mixture of inorganic chloride salts

Spore suspensions were preheated at the indicated temperatures for 10 min, then incubated at 40°C in an aqueous solution of CaCl₂, NH₄Cl, and NaCl (each 100 mM).

Table 1. The Germination of Spores of Three Strains of *C. perfringens* by Combination of Various Inorganic Salts

Combination of inorganic salts ^{a)}	S-40		S-45		FD 1	
	% Fall in O.D. at 10 min	90 min	% Fall in O.D. at 10 min	90 min	% Fall in O.D. at 10 min	90 min
CaCl ₂ only	1	6	0	6	2	13
NH ₄ Cl "	0	3	0	5	0	5
NaCl "	0	3	0	3	2	13
NH ₄ Cl + NaCl	0	3	0	2	0	5
CaCl ₂ + NH ₄ Cl	17	44	13	46	26	40
CaCl ₂ + NaCl	2	16	3	20	3	22
CaCl ₂ + KCl	2	12	2	16	3	24
CaCl ₂ + LiCl	0	6	3	21	3	25
CaCl ₂ + CsCl	15	45	19	49	25	38
CaCl ₂ + RbCl	6	39	9	47	7	38
CaCl ₂ + NH ₄ Cl + NaCl	31	45	14	48	31	40
MgCl ₂ + NH ₄ Cl + NaCl	1	8	2	14	1	6
MnCl ₂ + NH ₄ Cl + NaCl	1	6	0	2	0	3
SrCl ₂ + NH ₄ Cl + NaCl	1	10	0	6	6	38
BaCl ₂ + NH ₄ Cl + NaCl	0	3	0	4	4	29
CaI ₂ + NH ₄ I + NaI	0	1	0	3	0	4
CaBr ₂ + NH ₄ Br + NaBr	0	5	0	2	0	2
Ca(NO ₃) ₂ + NH ₄ NO ₃ + NaNO ₃	0	0	0	4	0	5

^{a)} Each salt was used at 100 mM, pH was not adjusted.

Table 2. The Germination of Spores of Three Strains of *C. perfringens* by Combination of Various Organic and Inorganic Salts

Combination of organic and inorganic salts ^{a)}	S-40		S-45		FD 1	
	% Fall in 10 min	O. D. at 90 min	% Fall in 10 min	O. D. at 90 min	% Fall in 10 min	O. D. at 90 min
Ca(HCOO) ₂ +NH ₄ HCOO+NaHCOO	0	2	0	0	0	1
Ca(CH ₃ COO) ₂ +NH ₄ CH ₃ COO+NaCH ₃ COO	0	3	0	3	1	3
Ca(NO ₃) ₂ +NH ₄ NO ₃ +Cysteine·HCl	7	27	7	31	7	22
Cysteine·HCl only	2	8	2	10	3	10

^{a)} Each salt was used at 100 mM, except for cysteine·HCl (200 mM), pH was not adjusted.

これについて報告⁹⁾した。今回は、さらに易熱性菌芽胞についても調べた結果、耐熱性菌芽胞の場合とはやや異なり、数種イオンの組み合わせによって発芽の起こることを認めたので報告する。

実験方法

使用菌株: *C. perfringens* type A, S-40 and S-45 この両株は Hall ら¹⁾により食中毒検体または食品より分離された易熱性菌で、北大水産学部食品衛生学教室より分与を受けた。*C. perfringens* type A, FD 1 は米国 FDA より分与を受けた。本株も易熱性芽胞を形成する¹⁰⁾。

芽胞液の調製: Duncan ら⁷⁾の方法により芽胞を調製した。芽胞の精製には、超音波処理 (9 kc, 15分間) 後蒸留水で洗浄することにより、混在する栄養細胞を破壊し同時に sporangia を除くことができた。精製芽胞液は 2° に保存した。

芽胞の活性化: 芽胞液 1 ml を小型試験管に入れ、一定温度の水浴中で10分間加熱後直ちに放冷した。

発芽試験: 発芽の判定には、発芽培地における芽胞のこん濁度 (O. D.) の減少を Klett-Summerson 光電比色計 (フィルター No. 56) を用いて経時的に測定した。最初の O. D. は約 150 Klett units となるように芽胞液を加えた。発芽開始時の O. D. の読みを100%として、それに対する O. D. の百分率を時間とともにプロットした。発芽度は O. D. の低下パーセントで表した。位相差顕微鏡による芽胞の屈折性の失格より判定すると、O. D. の約50%低下は90%以上の発芽率に相当した。発芽条件は特に嫌気性を考慮に入れず、発芽温度は 40° とした。

実験結果

芽胞の加熱活性化: 予備実験の結果では、用いたウェルシュ菌芽胞はいずれも無機イオン化合物単独ではほとんど発芽し得ないが、後述のように数種のイオンの組み合わせによって十分な発芽を示した。そこで、発芽培地として、CaCl₂, NH₄Cl, NaCl の3者の等モル混合溶液 (0.1 M) を用いて発芽に及ぼす芽胞の加熱ショックの影響を調べた。S-40 および FD 1 株芽胞について実

験した結果をそれぞれ Fig. 1 および 2 に示す。これらの結果によると、芽胞の活性化の至適温度は80°であり、70°以下では発芽速度はきわめて低く、また90°ではかえって阻害がみられた。それゆえ以後の実験においては加熱ショックは80°, 10分間とした。

イオンによる発芽: 主に塩化物を用いて種々のカチオン単独または組み合わせ溶液における発芽を調べた。その結果は Table 1 に示すとおりである。

発芽は1価または2価カチオン塩化物単独ではほとんど起こらないが、両者の組み合わせによって起こった。特に2価カチオンでは Ca⁺⁺ が最も有効であり、1価カチオンでは NH₄⁺>Cs⁺>Rb⁺>Li⁺>Na⁺>K⁺ の順に有効であった。しかし1価カチオンどうしの組み合わせは効果がなく、Ca⁺⁺ が必要であった。FD 1 株芽胞では、Ca⁺⁺ は Sr⁺⁺ または Ba⁺⁺ である程度代用されるが、Mg⁺⁺ および Mn⁺⁺ はあまり効果がなかった。また、塩化物の代わりにヨウ化物、臭化物、硝酸塩などを用いた場合、発芽は全く起こらなかった。この事実是有機アニオン化合物を用いた場合も同様であった。しかし、硝酸塩を用いた場合でもステン塩酸塩のような有機塩化物を加えることによって発芽は回復するから、アニオンとして Cl⁻ は必須と考えられる (Table 2)。

Fractional germination の検討: Rode ら⁸⁾は *B. megaterium* QM B1551 が2種のイオンの組み合わせによって発芽する際、各イオンによる部分的な発芽が起こるとして、これを "fractional germination" と名付けた。

ウェルシュ菌芽胞についてもこの現象がみられるかどうかを検討した。CaCl₂, NH₄Cl, NaCl の3種の塩の組み合わせにおいて、最初に CaCl₂ と30分間インキュベートした後第2の塩を加えてインキュベートし、30分後に第3の塩を加えてみた。その結果は Fig. 3 に示すとおりである。

最初の30分間では発芽はほとんど起こらないが、第2の塩を加えた後は発芽は急速に進行した。そして最後に加えた場合の発芽速度は、最初から3者全部を加えた場合のそれとほぼ同じであった。また、3者の加える順序

Fig. 3. The germination of an aqueous suspension of spores of *C. perfringens*, S-40 by sequential addition of three chloride salts

Each salt was added to give a final concentration of 100 mM.

を変えてみても全く同一の結果が得られた。前述のようにこれらの塩単独では発芽は起こらないから、ウェルシュ菌芽胞のイオンによる発芽は fractional germination ではなく、むしろイオン相互の相乗効果によるものと考えられる。

考 察

従来イオンのみで発芽し得る細菌芽胞としては、好気性菌では、*B. megaterium* QM B1557 があり、嫌気性菌については今のところウェルシュ菌以外知られていない。Rode ら⁸⁾は発芽機構においてイオンは第一義的役割を果すものであるとして“ionic germination”なる語を提唱した。すなわち、本来発芽にはアラニンやグルコースのようなエネルギー源は必要とせず、これらはイオンによる発芽の補助的役割を果すに過ぎないとした。

しかしながら、現在、発芽始動におけるイオンの役割についてはあまり判明していない。Gould ら⁹⁾は *B. cereus* の発芽促進作用を有する lytic enzyme が適当なイオン強度において最適活性を示すことを報告している。これに関連して、最近、Duncan ら¹⁰⁾はウェルシュ菌芽胞を熱またはアルカリ処理することによって、発芽がリゾチームまたは該菌の発芽促進性タンパクに依存性を示すことを報告した。これらの事実から考えると、イオンはウェルシュ菌芽胞の lytic enzyme を活性化するのに必要なのではないと思われる。

易熱性ウェルシュ菌芽胞のイオンによる発芽において、芽胞の加熱による活性化は必要であり、その最適条

件は80°、10分間であった。このことは、実際に本菌による食中毒において、加熱調理食品を不完全に再加熱して長時間放置したような場合、生残した芽胞が活性化されて発芽する可能性を示すものといえよう。

易熱性ウェルシュ菌芽胞の ionic germination は、耐熱性菌芽胞の場合とやや異なり、単独のイオンでは効果がなく、1価および2価カチオンの組み合わせによってのみ起こる。特に2価カチオン化合物としては CaCl_2 、1価カチオン化合物としては NH_4Cl が優れていた。しかもこれらのイオンは fractional germination を行うものではなく、互いに相乗的に作用するものと考えられる。なお、 CaCl_2 の発芽促進効果（単独ではないが）に関しては、Princewill¹⁰⁾が *C. chauvei* の芽胞についても報告している。

要 約

A型ウェルシュ菌易熱性芽胞形成株について、発芽機構を調べて次の結果を得た。

- 1) 加熱ショックした芽胞はいわゆる“ionic germination”を示し、2価アルカリ土類金属塩化物と1価アルカリ金属塩化物との組み合わせが有効であった。そして塩素イオンは必須であった。
- 2) 発芽は CaCl_2 、 NH_4Cl 、 NaCl の3者の組み合わせにおいて最高を示した。
- 3) 芽胞の加熱活性化は、80°、10分間の加熱ショックが最適であった。
- 4) イオンによる発芽は fractional germination を示すものではなく、各イオンの相乗効果によるものと思える。

文 献

- 1) Hall, H. E., Angelotti, R., Lewis, K. H., Foter, M. J.: J. Bacteriol., **85**, 1094 (1963).
- 2) Duncan, C. L., Strong, D. H.: *ibid.*, **100**, 86 (1969).
- 3) Hauschild, A. H. W., Niilo, L., Dorward, W. J.: Can. J. Microbiol., **17**, 987 (1971).
- 4) Hauschild, A. H. W.: J. Milk Food Technol., **34**, 596 (1971).
- 5) 安藤芳明: 日細菌誌, **29**, 108 (1974).
- 6) Duncan, C. L., Labbe, R. G., Reich, R. R.: J. Bacteriol., **109**, 550 (1972).
- 7) Duncan, C. L., Strong, D. H.: Appl. Microbiol., **16**, 82 (1968).
- 8) Rode, L. J., Foster, J. W.: Arch. Mikrobiol., **43**, 183 (1962).
- 9) Gould, G. W., Hitchins, A. D., King, W. L.: J. Gen. Microbiol., **44**, 293 (1966).
- 10) Princewill, T. J. T.: J. Comp. Pathol., **75**, 343 (1965).