

Clostridium tetani の生物性状

〔II〕 Clostridium tetani のグルコース利用について

金沢大学医学部微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

山 岸 高 由

(昭和44年5月14日受付)

真田¹⁾は自然界から *Clostridium tetani* (以下 Cl. tetani) を分離した際、加熱条件の強いもの程毒性が弱く、グルコース分解陽性でかつゲラチン液化陰性の場合が多いとのべた。著者²⁾は前報で、Cl. tetani の1株を用い、その耐熱性の substrain と原株とを比較し、真田の現象が両株の間に成立することを認めた。さらに、加熱によるこのような変化は genotypic に異なる mutant の発生によるものでなく、耐熱株が死滅しにくくなる結果起る現象にすぎないと述べた。

しかし一般に自然界から見出される Cl. tetani の wild strain はグルコース分解陰性の菌として知られているので³⁾⁻⁹⁾、このように多数の Cl. tetani がグルコース分解陽性となるのは、グルコース分解陽性の他の菌種の contamination によるものでないかと疑われたので、本報ではこれらの株について再分離を行ない、ここからグルコース分解陽性株および陰性株を選び両者のグルコース分解について検討した。

実 験 方 法

使用菌株は、1963年に真田¹⁾が土壌から分離した菌株で、この株のすべては肝片加肝臓ブイヨン¹⁰⁾にゴム栓をしたまま保存されていたものである。グルコース分解の比較のため Cl. perfringens WS 002, WS 004, WS 1103, WS 1105, WS 1303 を用いた。これは当教室で分離したもので、分離方法は Yamagishi ら¹¹⁾によった。他に Cl. tetanomorphum NCTC 543, NCTC 500, NCTC 288, ATCC 15920, ATCC 3606. Cl. cochlearium NCIB 6797, グルコース分解陰性の Cl. tetani 6101, 6102, 6104, 6112, 6114, 6117, 6121, 66804, 66906S, 陸3. グルコース分解陽性の Cl. tetani 1110, 1113, 1303, 1104, 1122, 1131を使用した。これらの Cl. tetani

は陸3をのぞき、すべては1963年に真田¹⁾が分離した株である。

生物性状および毒素原性の検査に関しては、真田¹⁾の方法にしたがった。

グルコース消費量測定には、protease pepton (Difco) 2%, NaCl 0.5%, pH 7.0, 培地容量は中試験管 (16.5×165 mm) に 10 ml とし、菌接種直前に常法のごとく煮沸急冷し、チオグリコール酸ナトリウムを 0.1%, およびグルコースを 2.0% に加えた培地を使用した。この培地に 37°C で24時間間隔で2回肝片加肝臓ブイヨンで継代した菌を1%にうえこみ、37°C で24時間嫌気培養後、培地中に残ったグルコース量を測定してグルコース消費量を算出した。グルコースの定量は酸化酵素法¹²⁾によった。

Cl. tetani の発育におよぼすグルコースの影響を検討するために、protease pepton (Difco) 2%, NaCl 0.5%, 粉末寒天 0.1%, pH 7.0, 培地容量は、200 ml の投薬ビンに 180 ml とし、常法にしたがって煮沸急冷の後チオグリコール酸ナトリウム0.1% さらにグルコースを2%に加えた培地およびグルコースを加えない培地を使用した。この培地に 37°C で24時間間隔で2回肝片加肝臓ブイヨン継代した菌を1%に植えこみ、37°C で5日間にわたり培養して24時間毎に O.D. を測定して到達した最高の発育量で比較した。

pH および O.D. の測定および嫌気培養は前報²⁾と同様に行なった。

実 験 結 果

I. 生物性状および毒素原性の再吟味

土壌から低温加熱で分離した Cl. tetani のほとんどは Zeissler 平板培地上で Cl. tetani 特有の著しい swarming を呈するが、保存株と同じ Zeis-

Biological Properties of *Clostridium tetani*. II. Glucose-utilization by *Clostridium tetani*. Takayoshi Yamagishi, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

sler 平板培地上にひらくと、そのすべての株は swarm する力が弱まり 局限したコロニーを示した。しかしこれらのコロニーは依然として Cl. tetani の特有のコロニー形態の 1 つとしての樹枝状を呈した。菌株によっては swarm するコロニーと樹枝状の局限したコロニーの両者を作ったので、これについて別々に substrains を分離し、その生物性状および毒性を検討したが両者の間に差をみることがなかった。

60株の保存株のうち、2株は発育せず、1株は Cl. sporogenes によって全くおきかえられていた（元株は1963年当時 10^3 MLD/ml の毒性を示した）以外は平板上のコロニー所見から他の clostridia が混合したと思われるものを認め得なかった。5株については空中菌の混入を認めた。

平板上純粋と考えられた菌株はそのまま継代したのち、空中菌の混入を認めたものは純化したのち、共に生物性状および毒素原性の試験に供し、1963年分離当初の生物性状および毒素原性と1966年のそれらと比較した（表1）。平板上にひらいたのみでは純粋度の判定のためには十分といえないので、グルコース分解陽性の菌8株をとり、この各々からコロニー分離を2回くりかえしたのち、各株について3～4コロニーから3～4株ずつの substrains を分離し、これらについてさらに生物性状の検討を行なった。28株の substrains のうち26株はグルコース分解陽性を示した。

なお空中菌の混入をみた5株のうち3株は1963年分離当初グルコース分解陽性であった株であるが、1966年に純化した株も依然として陽性を示した。あと2株はもとは陰性であったが、1966年に純化したのち、1株は陽性になり、残り1株は依然として陰性を示した。

結果としては、1963年当時に比べて、1966年には総数としてグルコース分解陽性の株が増えていることがわかった。毒素原性も低下しているのであるから“毒素原性の低いものにグルコース分解陽性の株が多かった”とする真田の主張をうらずける結果となった。

その他の生物性状（インドール産生、硝酸塩還元、凝固蛋白溶解）に関しては菌株によって種々の結果が示されたが、マルトース、ラクトースおよびシュークロースの分解はすべて陰性であった。ゲラチン液化のみが陽性で他の性状がすべて陰性となる定形的な生物性状は比較的毒性の強い株に多くみられた。

II. グルコースの利用

このように Cl. tetani は生物性状試験でグルコース分解が陽性となるものと陰性となるものがあるので、グルコースの利用について Cl. tetani の各株および他の clostridia と比較した。すなわち、Cl. perfringens 5株、Cl. tetanomorphum 5株、Cl. cochlearium 1株、生物性状試験でグルコース分解陰性の Cl. tetani 5株およびグルコース分解陽性の Cl. tetani 3株をグルコース加ペプトン水の中で、

表1 Cl. tetani 分離株（1963）の毒素原性と生物学的性状の再検討（1966年現在）

検査年 月	毒素原性 MLD/ml	菌株数	グルコース分解	マルトース分解	ラクトース分解	シュークロース分解	インドール産生	硝酸塩還元	凝固蛋白の溶解	ゲラチン液化
1963年4月	10^4 - 10^5	6	1*	0	0	0	3	1	0	6
	10^3	10	1	0	0	0	4	0	0	10
	10^2	9	2	0	0	0	3	2	0	7
	10^0 - 10^1	8	2	0	0	0	3	4	0	8
	0	24	15	0	0	0	7	15	0	17
1966年2月	10^4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	10^3	1	1	0	0	0	0	0	1	1
	10^2	11	4	0	0	0	2	2	0	10
	10^0 - 10^1	19	7	0	0	0	6	2	1	19
	0	25	21	0	0	0	5	9	8	21

※ 陽性菌株数

37°C で嫌気培養し、24時間目におけるグルコース消費量、菌の発育量および培地 pH を測定し表 2 の結果が得られた。これによれば *Cl. perfringens* では加えられたグルコースの 18.1%~36.4%, *Cl. tetanomorphum* では 30.6%~48.9%, *Cl. cochlearium* では 29.2%, グルコース分解陰性の *Cl. tetani* では 6.1%~12.7%, グルコース分解陽性の *Cl. tetani* では 16.2%~18.3% が消費されていることがわかった。グルコース分解の程度が最も大きいと思われる saccharolytic な *Cl. perfringens* のグルコース利用が少ないようにみえるが、これは培地の pH の低下が急

表 2 *Clostridia* のグルコース消費量の比較

使用菌種および株	終末 pH	発育量 mgN/dl	グルコース消費量 mg	グルコース消費量 %
<i>Cl. perfringens</i>				
WS 1103	4.60	7.15	4.3	18.8
WS 004	4.65	7.35	4.1	18.1
WS 1303	4.50	8.85	8.3	36.4
WS 002	4.65	8.66	6.5	28.4
WS 1105	4.85	7.35	6.0	26.2
<i>Cl. tetanomorphum</i>				
NCTC 543	5.20	9.56	10.5	45.9
NCTC 500	5.05	8.51	7.4	31.4
ATCC 288	5.30	7.53	7.0	30.6
ATCC 15920	5.20	8.12	9.6	41.9
ATCC 3606	4.90	9.38	11.2	48.9
<i>Cl. cochlearium</i>				
NCIB 6797	6.90	1.28	6.7	29.2
<i>Cl. tetani</i>				
* 6101	7.25	0.99	2.1	9.3
* 6102	7.30	1.61	1.9	8.3
* 6112	7.25	1.04	2.9	12.7
* 6114	7.14	2.53	1.4	6.1
* 6121	7.30	1.40	2.6	11.4
+ 1110	6.65	3.47	4.0	17.5
+ 1113	6.65	3.64	4.2	18.3
+ 1303	6.70	2.77	3.7	16.2

※ グルコース分解陰性株

+ グルコース分解陽性株

速なため、酵素活性が働かえないためと思われる。

Cl. cochlearium はグルコース分解陰性とされている菌であり著者も生物状試験でつねにグルコース分解陰性を示したが、グルコースの消費量を実測してみるとグルコースを利用していることがわかった。

以上で *Cl. tetani* は明らかにグルコースを利用していることがわかったのでグルコースの存在が菌の発育にいかなる影響をおよぼすかを検討した。すなわち、生物性状試験でグルコース分解陰性の 6 株およびグルコース分解陽性の 6 株について、グルコース加培地とグルコースを加えない培地でいかなる発育を示すかを調べ、表 3 の結果が得られた。この表によればグルコースを加えない培地ではグルコース分解陽性株はグルコース分解陰性株に比べてやや発育がよい程度であるが、グルコース加培地では前者の発育が著しく促進されていることがわかり、グルコース分解陰性株はグルコースの存在によってもその発育量にはほとんど変化がみられなかった。

考 察

代表的な成書や分類学の教科書³⁾⁻⁹⁾ は *Cl. tetani* はグルコースを利用できないと記載しているが、一方グルコースの利用について定量的に検討した研究者ら

表 3 *Cl. tetani* のグルコースによる発育促進の比較

	使用株	発育量 mgN/dl*	
		グルコースを除いた培地	グルコースを加えた培地
グルコース分解陰性株	陸 3	1.17	0.55
	66804	1.52	1.18
	66906S	1.25	1.45
	6101	1.21	1.37
	6117	0.76	1.40
グルコース分解陽性株	6114	1.22	1.35
	1110	2.16	4.55
	1130	1.79	3.71
	1303	1.42	2.84
	1104	1.80	2.49
	1122	1.55	2.79
	1131	2.46	2.77

※ 24時間毎、5 日間にわたり測定し、到達した最高の発育量で表わした。

13)~16) は, Cl. tetani グルコースを利用できると述べており, 著者の成績はこれに一致した。

今回著者が再確認したグルコース分解陽性の Cl. tetani もグルコース分解陰性の Cl. tetani も共にグルコースを利用するが, 前者の方が後者よりその消費率が大きくすることは前報²⁾のグルコース分解株のグルコース分解酵素活性が比較的安定であることに一致する。またグルコース分解陽性の Cl. tetani はグルコース分解陰性のものより発育の程度もよく, とくにグルコースの存在下でその発育が著しく促進されることも前報²⁾で述べたグルコース分解陽性株の方が発育がよく, 生存力が強いという事実にも一致した。

Reed ら¹⁷⁾はグルコースに単に酸化還元電位を低下させる作用がありこれにより Cl. tetani の発育を促進すると述べているが, むしろグルコースを積極的に利用することがわかった。

Cl. tetani がグルコースを分解し得ることについてはいくつかの報告があるが, Bergey's manual をはじめ多くの著者が Cl. tetani のグルコース分解を否定しているのは, これらの研究が特定の1~2の株に限られたもので taxonomy としてとり上げるのに値しないと考えられていることによると思われる。もっとも Bergey's manual の初版¹⁸⁾には Cl. tetani はグルコースの存在下で酸を産生すると記載しているが, 現在ではグルコース分解陰性と記載している。

毒性の強い Cl. tetani は生物性状試験でグルコース分解陰性となるのがつねであるが, 一面グルコース分解陽性の Cl. tetani も存在することが確かであるので Bergey's manual の Cl. tetani の項に "some strains ferment glucose" の一文を付加すべきであることを提唱したい。しかもグルコース分解力が増すにつれて毒性がよくなることから考えて, 無毒株がグルコース分解陽性であったとしてもむしろ当然であって, これらのものを Cl. tetani 無毒株と呼んで良いものと思われる。

グルコース分解以外の生物性状すなわち, インドール産生, 硝酸塩還元, 凝固血清およびゲラチンの消化に関してはさまざまな記載があって統一性がない。これは Cl. tetani の示しうる変異域であり, 毒性の比較的強い株だけは上述の反応がゲラチンを除いてすべて陰性となり, 最も多くの成書がとり入れている生物性状となっている。

結 論

Cl. tetani の弱毒株の中には生物性状試験でグルコース分解を示す株が少なくないことを確認した。菌

株は3年間の保存後, その毒素原性において弱化した, が, この際にもグルコース分解が陽性の株になる傾向を示した。

生物性状試験でグルコース分解陽性および陰性の Cl. tetani をグルコース加培地で24時間培養後, 培地中のグルコース消費量を調べたところ, 前者では16.2~18.3%, 後者で6.1~12.7%のグルコースを消費した。発育に関してはグルコースの存在する培地中では, 前者の発育がきわめて著しく促進されるのに対して, 後者はほとんどの影響がなかった。

稿を終るに当り, 終始御懇篤なる御指導御校閲を戴いた西田教授, 御協力戴いた玉井健三博士ならびに御助力を得た微生物学教室員各位に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 真田一郎: 十全医会誌, 70, 612 (1964).
- 2) 山岸高由: 十全医会誌, 投稿中, (1969).
- 3) Smith, L. D.: Introduction to the Pathogenic Anaerobes, 1st ed., p. 93, Chicago, University of Chicago Press, 1955.
- 4) Willis, A. T.: Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine, 2nd ed., p. 70, London, Butterworths 1964.
- 5) Zeissler, J.: in Kolle, Kraus und Uhlenhuth's Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen, 3. Aufl., Bd. 10, s. 122, Jena, Gustav Fischer, 1930.
- 6) Wilson, G. S. & Miles, A. A.: Topley and Wilson's Principle of Bacteriology and Immunity, 5th ed., p. 1080, London, Edward Arnold, 1964.
- 7) Dubos, R. J. & Hirsch, J. G.: Bacterial and Mycotic Infections of Man, 4th ed., p. 545, Philadelphia, J. B. Lippincott, 1965.
- 8) Kolle, W. & Hetch, H. G.: Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten, 11. Aufl., s. 301, München-Berlin, Urban & Schwarzenberg, 1952.
- 9) Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., p. 672, Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
- 10) 伝染病研究所学会: 細菌学実習提要, 第5版, 82頁, 東京, 丸善, 1958.
- 11) Yamagishi, T., Ishida, S. & Nishida, S.: J. Bact. 88, 646 (1964).
- 12) Bergmeyer, H. V.: Methoden der Enzymatischen Analyse, 1.

Aufl., s. 123, Weinheim, Verlag Chemie, 1962.

13) Boorsma, H. J., Prévot, A. R. & Veillon, R. : C. R. Soc. Biol., 131, 1137 (1936). 14) Lerner, E. M. & Pickett, M. J. : Arch. Biochem., 8, 183 (1945).

15) Martinez, R. J. & Rittenberg, S. C. : J. Bact., 77, 156 (1959).

16) Prévot, A. R. : Manual de Classification et de

Détermination des Bactéries Anaérobies, 3e éd., p. 250, Paris, Masson, 1957.

17) Reed, G. B. & Orr, J. H. : J. Bact., 45, 309 (1943).

18) Bergey, D. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W. & Huntoon, F. M. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st ed., p. 330, Baltimore, Williams & Wilkins, 1923.

Abstract

All *Clostridium tetani* strains examined exhibited the ability to utilize glucose. The ability to produce acid from glucose increased among the strains tested as their toxigenicity decreased.

Glucose-fermentation-positive strains of *Cl. tetani*, when cultured in 2% glucose broth for 24 hrs at 37 C, utilized glucose to an extent of 16.2 to 18.3%, whilst glucose-fermentation-negative strains could utilize it to an extent ranging between 6.1 and 12.7% of glucose added. Based on the finding, it was concluded that the positive or negative property in glucose fermentation is of no genetic significance.
