Cl. welchii の血清学的型判定法と毒素型判定法の比較

1. 人糞より分離した Cl. welchii の凝集性

金沢大学医学部微生物学教室(主任　西田尚紀教授)
吉　沢　潤

(昭和41年3月3日受付)

Clostridia の分野ではその血清学的分類はいろいろ試みられているが[1)2)], species 或いは型判定の規準或いは補助として殆んど用いられていない. その最大の理由は, 凝集反応の値がその病原性と最も関係深いと考えられる毒素の強さ或いは性質を必ずしも指示しないことにあると思われる[3)].

Cl. welchii の凝集反応についてはすべての教科書[4)5)]は strain-specificity であると記載し, 型別を凝集反応によつて行なうことは不可能であると述べているが, これは自然界に存在する Cl. welchii の殆んどを占めるA型菌についてのことであつて, B.C.D.E.F.型に型別の共通抗原が存在することについては既に Henderson[6)], Bergmann[7)] が述べている. しかしながら これらの研究はいずれも毒素判定をして型を決められたものについての抗原分析であつて, 実際の B.C.D.E.F 各型の分離同定にどの程度に役立ちうるかについて試みた人はいないように思える. 勿論, 型同定には毒素判定法が現行の基準であるから[8)9)], 常に毒素と照合して凝集反応法の価値をきめるべきであるが, 毒素判定法そのものも必ずしも完全なものでなく現在止むを得ざるもの[10)]として用いられていることから之にかわる方法が望まれていることも実際である. かかる意味において私は B.C.D.F. 型の各型の凝集抗原が実際に供されるか否かを検討したいと考えてこの実験を計画したが, これに先だち, 凝集反応が不可能とされているA型菌についてこの事実を確かめるべく実験を行なつた成績について述べたい.

実　験　方　法

(1) 使用菌株:

A菌型として, PB6K, SR-12, Hobbs の No. 1 から No. 11 (但し No. 4 を欠く), 人糞よりの分離株183株. B型菌は L_5, 3110. C型菌は 3182,3227. D型菌は L_8, L_9 を用いた. 但し PB6K は教室保存の標準株, SR-12, L_5, L_8, L_9 は英国 Leeds 大学の所蔵株を分与されたもの, Hobbs の株は北海道衛研の飯田広夫氏より分与され, 分離株183株中115株は人糞の70°10分加熱分離株41株 及び 100°10分加熱分離株74株で残り68株は時期を異にし人糖から 70°10分 分離株37株, 90°10分の14株, 100°60分し17株よりなる. その他は英国の NCTC から得たものである.

(2) 抗血清の作製法:

初め Zeissler 平板で15時間培養の菌を用いたが, Henderson, Mandia 及び多くの著者は加熱抗原よりホルマリン抗原を推奨しているので後に Pope 消化培地或いは3%プロテオーゼペプトン (大五もしくは Difco のいずれでもよい) に glucose を1%に加えたもので9時間培養の菌を用いた. 培用された菌は生食水で1回洗滌するにとどめ元培養液量の5分の1の濃度にしたものを用いた. この際用いた菌の稀釈液は 0.5%ホルマリン加生食水であつた. その免疫術式は, 3日間隔で 0.5, 1.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.0, 2.0, 3.0, 3.0, 3.0 ml をウサギの耳静脈に注射した. 菌液は古くなると塊状の外観を示すことがあつたので2週間ごとに新しく作り直した. 上記の注射終了後, 試験採血を行ない充分な凝集価を示すとき, 最終の注射から7～10日目に全採血を行ない, 血清を分離し, 56°C 水浴中30分加温し非働化し, これに1% マーゾニン溶液を1/100 容加え冷蔵庫に保存した.

(3) 凝集反応の方法:

抗原液の作製: Zeissler 平板の菌を用いる場合, Zeissler 平板で24時間嫌気培養した菌を集め, 液体培地の菌を用いる場合 15 ml 入りの中試験管に 10% 肉カス加クックドミートブロースで12時間培養した上

A Comparison of a Serological Typeing with the Routine Toxin Typing Method for Cl. Welchii I. Agglutinability of Cl. welchii Strains Isolated from Human Feces.
Jun Yoshizawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida) School of Medicine, Kanazawa University.

液 1 ml を移植し 9 時間培養し，その遠心沈渣を洗うことなく 0.5% ホルマリン加生食水で均等な浮遊液とした．

凝集反応の手技：前記の方法で作製保存した抗血清を生理食塩水で12.5倍に希釈し，これより倍々希釈血清列各 0.5 ml を小試験管に作り，これに前述の保存菌液（0.5% ホルマリン加生食水に浮遊し氷室に一夜入れて置いたもの）を使用に際し McFarland No. 5 [11] 相当の菌濃度になるまで更に0.5%ホルマリン加生食水を加え，これを抗原液として各倍々希釈血清列に 0.5 ml ずつ加える． 判定に際しては従つて第1本目が25倍で始まる数値となる．但し別法として，前記の 5 倍濃度の菌液を各血清列に 1～2 滴滴下する方法もあるが判定には殆んど差がなかつた．但しこの際の凝集価は血清そのものの希釈数値で判定した．判定は37°C 孵卵器中 4 時間後に一応の値を見，更にこれを冬なら室内に夏なら氷室に翌日まで置いて判定した．判定の基準は，まず肉眼で明らかな凝集を見，疑わしい凝集に対して凝集鏡を用い最終判定をした．

吸収血清の作製法： Zeissler 平板で 24時間培養した菌または液体培地で 9 時間培養した菌を遠心し集菌しこれを原血清にそれがドロドロになるまで加え，37°C 孵卵器に 2 時間入れ作用させた後遠心し， その上清に更に同じ菌を追加し 37°C 2時間作用させた後氷室に一夜放置し，その遠心上清を吸収血清とした．

実 験 結 果

(1) PB6K，SR-12，生理，各菌株相互の関係

A型標準株 PB6K，及び SR-12 の 2 株と，人糞より 100°60分加熱分離株“生理”の 1 株に対する抗血清を作製し，抗原として各 Zeissler 平板24時間培養の菌を 0.5% ホルマリン生食水に浮遊させたものを用い，相互の関係を交差凝集反応によつて検討した．結果は表1の如くであり，各株いずれも株特異性を示した．それで抗原を加熱処理（80° 30分，80° 60分，100° 30分，100°60分加熱）し加熱抗原での交差凝集反応を行なつたが，やはり他の株と凝集することはなかつた．また，PB6K 及び生理は80°30分以上の加熱により抗原性状が変化して被凝集性の消失しているのに対し SR-12 のみは 80°60分までの加熱処理に対し被凝集性が保たれていることがわかつた．

(2) PB6K, SR-12，生理と他の分離菌との関係

先ず人糞由来の分離株 6 株を用いて PB 6 K，SR-12，生理の抗血清と凝集反応を試みた結果，生理抗血清によく凝集する 1 菌株 No. 41（凝集価800）を偶然発見したので，更に人糞由来の分離菌 115 株を全部 Zeissler 平板に 24時間嫌気培養しその菌を用い，先ず生理抗血清（15倍），PB6K（10倍），SR-12（10倍）の三者混合抗血清でタメシ凝集反応を行ない凝集したものについて定量的凝集反応を行なつた．その結果は表2の如くで，人由来の分離菌の殆んどはこれら各抗血清に対し凝集しないものであつた．極く小数の凝集を認めたものに限つていえば Laboratory strain の PB6K，SR-12 よりも教室で分離した生理株に対し凝集しやすい傾向が見られた．

(3) Hobbs の各菌株相互の関係

Hobbs [12] が食中毒から分離した株について血清型を樹立しているので，この菌を用いて我々の分離した菌との血清学的関係について検討した． 先ず Hobbs の各菌相互について交差凝集反応を行なうと，表3の如く，かなりの各株相互の共通性が認められた．またこれらの抗血清は B.C.D. 各型の菌とも低凝集価で反応を起した．しかし各型に一番よく共通性を示した No. 6 または No. 9 で各抗血清を吸収し，次いでこの吸収血清について凝集反応を行なうと表4（No. 6 で吸収した場合）の如く吸収後の各抗血清はそれ自体の抗原のみと凝集するものとなつた．この吸収血清を用いて前述の分離株 115 株で凝集反応を試みたが殆んどすべての株は凝集することなく 3 株だけ25倍の凝集

表1 Cl. welchii PB6K，SR-12，生理株相互の交差凝集価

抗血清	使用抗原	抗原作製の条件				
		非加熱	80° 30分	80° 60分	100° 30分	100° 60分
PB5K	PB6K	25600	0	0	0	0
	SR-12	0	0	0	0	0
	生 理	0	0	0	0	0
SR-12	PB6K	0	0	0	0	0
	SR-12	800	400	100	0	0
	生 理	0	0	0	0	0
生 理	PB6K	0	0	0	0	0
	SP-12	0	0	0	0	0
	生 理	1600	0	0	0	0

表2 Cl. welchii PB6K，SR12，生理株と人由来分離株の関係

抗血清	下記凝集価を示す株数				
	800	200	100	50～25	0
生 理	3	2	1	5	104
PB6K	0	0	0	2	113
SR-12	0	0	0	1	114

表3　Hobbs の各株相互*の交差凝集反応

Hobbs 各型株	各型の抗血清								
	1	2	3	6	7	8	9	10	11
1	1600	100	25	50	100	0	50	50	0
2	50	1600	50	100	0	100	50	50	50
3	25	25	800	50	0	0	50	25	0
5	25	50	100	50	50	25	0	50	0
6	0	50	50	3200	50	100	50	25	50
7	50	0	0	50	1600	100	50	50	50
8	0	25	0	100	100	3200	100	0	25
9	100	100	50	50	50	100	1600	50	50
10	50	50	25	25	50	0	50	1600	50
11	0	25	0	100	50	25	100	50	3200

* 但し抗血清で No. 4, No. 5 は欠．抗原では No. 4 を欠く．

表4　Hobbs の各型菌の被吸収抗血清と各 Hobbs 株の関係
(各抗血清を Hobbs の6型菌で吸収した場合**)

Hobbs の各型株	抗血清（吸収血清）								
	1−6*	2−6	3−6	6−6	7−6	8−6	9−6	10−6	11−6
1	1600✝	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1600	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	800	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	1600	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	800	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	800	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	1600	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	3200

*… 1型の原抗血清を6型の菌で吸収後の抗血清を意味する．以下これに準ずる．
**… 9型で吸収した場合もこれと殆んど同じ成績を示した．
✝…凝集価を示す．

価を示したにすぎなかつた．

（4） 分離A型菌の各菌株との関係

我々が更に時期を異にし人糞より分離した68株のうち70°10分加熱分離の4株，90°10分加熱分離の1株，100°60分加熱分離の4株を選んでそれぞれ前述の手技により抗血清を作製し，これに対し各菌68株で交差凝集反応を行なつた．その結果，凝集価が認められたすべては表5に示す如くであつて，自己の株とは1600～400 の値を示すが，他の株との間には殆んど凝集反応は認められないか或いは凝集することがあつてもその値は低かつた．

一方，この分離株の抗血清9種類に対する B. C. D 型菌との凝集反応を検討したが，いずれの間にも凝集は認められなかつた．

（5） B.C.D 型抗血清に対するA型菌の関係

先ず PB6K，SR-12 及び Hobbs の各型との関係を検討したが，いずれも B. C. D 型抗血清との間には凝集は認められなかつた．

次に人由来の分離菌 115 株でこの各型抗血清に対し凝集反応を試みたが，凝集を認め得たのは11株であつた．

しかし，青山らの Cl. welchii 食中毒例[13]からの分離菌20株のうち13株のS型株は1株だけを例外としすべてがD型血清に50の凝集価を示したのは通常見ることのできぬ現象であり興味深かつた（但し他のR型株7株すべては凝集しなかつた）．

表５　分離株*相互凝集反応（凝集価を示したもののみを示す）

分離株（記号）			○		○		○		
	7101	7102	7103	7104	9102	1601	1605	1606	1607
7101	800**	50	0	0	0	0	0	0	0
7102	400	800	0	0	0	0	0	0	0
7103	0	0	800	0	0	0	0	0	0
7104	0	0	0	400	0	0	0	0	0
7105	0	50	0	0	0	0	0	0	0
7109	0	0	0	0	50	0	0	0	0
7115	0	50	0	50	0	0	0	0	0
7120	50	0	0	0	0	0	0	0	0
7122	0	0	0	0	0	50	0	0	0
7126	0	50	0	0′	0	0	0	0	0
7130	0	0	100	0	0	50	0	0	0
7136	0	0	0	50	0	25	0	0	0
9102	0	0	0	0	400	0	0	0	0
9112	0	0	0	25	50	0	0	0	0
1601	0	0	0	0	0	800	50	0	0
1605	0	0	0	0	0	0	1600	0	0
1606	0	0	0	0	0	0	0	800	0
1607	0	0	0	0	0	0	0	0	800
1613	25	0	0	50	0	0	0	0	0

*…70°分10分分離株37株，90°10分分離株14株，100°60分分離株17株計68株
**…凝集価

考　　察

自然界の土壌[14]或いは人糞[15]から分離される Cl. welchii の殆んどはA型に属すると思われるが，我々は人糞から分離した合計183株の菌について凝集反応を試み，いずれも従来の記載通り strain-specificity を肯定する成績を得た．

しかしながら最近 Hobbs らは食中毒の際の起炎菌としての耐熱性のA型菌について凝集反応によつて Typing が可能であるとし[12]，またこれを支持するものとして沢山の食中毒に際し，Hobbs の血清型のいずれかに属する菌型が報告されている[16)17)18)19)20)21)22)23]．

一方，これに対し Hall ら[24]はアメリカにおける Cl. welchii 食中毒の43%の株が Hobbs の型血清によつて凝集するにすぎなかつたと述べている．しかしこれらの菌は Hall らも述べる如く耐熱性において Hobbs らの株とかなり異なるように思われる．三舟[25]は正常人の糞便を100°C10分加熱して得た471株の内41株（8.7%）が Hobbs の型血清に凝集したと報告しているのに対し，飯田ら[26]は正常人601名の糞便を100°C60分加熱して得た147株のうち58株（39.4株）が Hobbs の型血清に凝集すると述べた．赤真[27]はノーマルフローラーとしての Cl. welchii のうち極めて一部のものだけが Hobbs の型血清に凝集することを示した．ノーマルフローラとしての Cl. welchii は殆んど耐熱性のない菌群であること[28]を考え合わせると，耐熱性の菌特に食中毒の際に現われる群熱性菌が抗的に共通因子を持つように思える．これは将来の検討にゆだねたい．

Cl. welchii 菌の strain-specificity を示す原因の一つとして，培養条件があると思われる．Hobbs らはその型抗血清は８型のうち３，４，５型を除いて共通抗原が全くないと述べたのに対し，我々は各型間にかなりの共通抗原を認め得たしまた，B. C. D 型菌とも低値ながらも共通抗原があることが判つた．三舟は Hobbs の３型と４型，７型と９型の間にのみ共通抗原があると述べていていくらか Hobbs らの成績と異なるにすぎないが，我々の成績はこの二者から大きく異なつている．私はこの差が用いられた培養条件の差によるものであると考え検討中であり（第２報でのべる），培養条件によつて凝集価が著しく影響をうけることについては三舟がすでに述べている．

結　　論

Cl. welchii A型菌相互の凝集反応においては，殆んどは株特異性が強く，これを血清学的に分類することは不可能であるという従来の事実を全く肯定する結果を得た．他方 Hobbs の耐熱性菌の各型相互の間及びこれらの菌と B. C. D 型菌相互の間には低値ながら交差凝集反応が認められた．

（稿を終るに臨み，終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜つた恩師西田尚紀教授に深謝致します．また Hobbs 株の分与をうけた北海道衛研の飯田広男博士に感謝致します）

文　　献

1) **Mandia, J. W.** : J. Immunol., **66**, 497 (1951); **67**, 49 (1951). 2) **Meisel, H.** : Bull. Off. Int. Epiz., **59**, (9-10), 1425 (1963). 3) **Oakley, C. L.** : Appl. Bact., **19**, 112 (1956). 4) **谷　友次** : 医学微生物学, 第7版, 179頁, 東京, 南山堂, (1960). 5) **Wilson, G. S. & Miles, A. A.** : Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4th ed., p. 987, London, Edward Arnold, 1955. 6) **Henderson, D. W.** : J. Hyg., **40**, 501 (1940). 7) **Bergmann, J. & Rapp, G.** : Zbl. Bakter., orig., **159**, 500 (1952). 8) **Oakley, C. L.** : J. Gen, Microbiol., **12**, 334 (1955). 9) **Smith, L. Ds.** : Introduction to the pathogenic anaerobes, 1st ed., p 18, Chicago, Chicago Univ. Preress, 1954. 10) **Oakley, C. L.** : J. Microbial Classification, 1st ed., p. 242, Combridge, Cambridge, Univ. Press. (1962). 11) **伝染病研究所学友会** : 細菌学実習提要, 全改訂版, 161頁, 東京, 丸善, (1959). 12) **Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Cruickshank, J. C.** : J. Hyg., **51**, 75 (1953). 13) **青山　巖・渡辺泰子・中田二三男・山田善弥雄・大島豊正・渡辺鮫平・清水正** : 日本伝染病学会雑誌, **34**, 634 (1960). 14) **Taylor, A. W. & Gordon, W. S.** : J. Pathol. Bacteriol., **50**, 271 (1939). 15) **Borthworth, G. R.** : Brit. J. Exper. Path., **18**, 475 (1937). 16) **浅川豊・若松有次郎・中津川修二** : 日本細菌学雑誌, **20**, 667 (1965). 17) **林　薫・釘田芳文・田原守夫・山県　宏** : 長崎大学風土病紀要, **3**, 1 (1961).; **3**, 87 (1961). 18) **林　薫・三舟求真人** : 長崎大学風土病紀要, **4**, 157 (1962). 19) **飯田広夫・唐島田隆・熊谷　満・清水　敏・西村裕司・岩田一郎** : 北海道衛生研究所報第12集別刷, (昭和36). 20) **善養寺浩・坂井千三・工藤　武・寺山　武・長崎護・伊藤多美夫** : 嫌気性菌研究班報告, (昭和40年2月13日). 21) **Parry, W. H.** : Brit. Med. J., **28**, 1616 (1963). 22) **Beck, A., Foxell, A. W. H. & Turner, W. C.** : Brit. Med. J., **1**, 686 (1954). 23) **Yamagata, H., Iwafune, Y. & Shimamura, Y.** : Japan. J. Micorbiol., **3**, 365 (1959). 24) **Hall, H. E., Angelottj, R., Lewis, K. H. & Foter, M. J.** : J. Bacteriol., **85**, 1094 (1963). 25) **三舟求真人** : 長崎大学風土病紀要, **5**, 1 (1963). 26) **飯田広夫・相川孝史** : 嫌気性菌研究班報告, (昭和40年2月13日). 27) **赤真清人** : 日本細菌学雑誌, **20**, 665 (1965). 28) **中川正明・石田勝一・西田尚紀** : 医学と生物学, **68**, 93 (1964).

Abstract

Almost all of 115 strains of *Clostridivm welchii* isolated from human feces samples exhibited strain-specific agglutinability whilst serotype strains established by Hobbs et al (1953) displayed weak cross-agglutination not only with each other of serotype strains but also with strains of different toxigenic types (B. C and D types) of Cl. welchii.