

わが国老人腸管のClostridium perfringensについて : 特にその恒常性ならびに高数値について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8857

わが国老人腸管の *Clostridium perfringens* について

—特にその恒常性ならびに高数値について—

金沢大学医学部微生物学教室 (主任: 西田尚紀教授)

守 田 良 子

(昭和55年9月26日受付)

Clostridium perfringens (ウェルシュ菌) は人間腸管のノーマルフローラではあるが、少数グループの菌に属すると報告されてきた^{1)~5)}。しかし、赤真ら⁶⁾や当教室の Nakagawa & Nishida⁷⁾ はすでにわが国の健康な老人腸管内に *C. perfringens* が意外に多いことがあると述べている。著者はこれらの老人腸管内で、この病原菌として知られる *C. perfringens* が恒常的に数多く存在するのではないかと考え、これを確かめるため本研究をおこなった。本実験では以前に Nakagawa ら⁷⁾ が菌検索をおこなった施設と同一施設の老人を対象として、以上の目的のもとに腸管内における *C. perfringens* 数の恒常性とその定着性および α 毒素原性について検討した。実験の途次この施設の老人に対し、乳酸菌製剤の供与が開始されたので、この影響をも対象として考慮し検討した。この時、同時に腸内の最も主力となる細菌群として *Bacteroides*, *Lactobacillus*, BEP 群 (*Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* を一括して BEP 群とした) についても検討した。

材料および方法

1. 被検対象

老人ホーム (陽風園。金沢市三口新町) に住む 30 名の健康な老人 (男女各 15 名, 63 ~ 79 歳) の糞便, 金沢大学医学部学生 6 名, 当教室員 1 名および金沢大学医学部付属病院内保育所の 12 名の健康な乳幼児 (生後 1 ~ 19 カ月) の糞便を検討した。被検材料は蒐集後ただちに実験に使用したが、止むを得ない場合は室温放置 3 時間以内のものを使用した。

2. 菌数測定

C. perfringens 数の測定は定量法の他に大量の試

料中の菌を測定するために概数測定法をもちいた。その他の菌種は概数測定法により菌数を測定した。

1) 定量法: TGC 培地 (ニッサン) 9.5 ml 中に糞便 0.5 ml 容量を投入し、よく混和して糞便懸濁液を作り、これを更に TGC 培地で 10 倍段階希釈し、糞便の 10^6 希釈液を作った。各希釈段階より必要と思われる希釈液についてその 0.1 ml をカナマイシン (KM) 100 μ g/ml 加 Nagler 培地⁸⁾ (以下 KM-Nagler 培地と略) 表面に均等に塗布し、37 $^{\circ}$ C 24 時間嫌気培養 (後述) 後、得られた集落数に希釈係数を乗じて糞便 1 ml 容量中の *C. perfringens* 数を算出した。平板上の菌数の算出は 30 ~ 300 個の集落数を示した培地を使用に供した。なお実験の後半には TSN 寒天培地⁹⁾ をもちいた (本文中に培地の変わったことを明記した)。この際は上記希釈液を混和して 43 $^{\circ}$ C 16 時間嫌気培養後、得られた集落数に希釈係数を乗じて菌数を算出した。選択培地の検討のために SPS 培地¹⁰⁾ をもちいたが、この際には 37 $^{\circ}$ C 24 時間嫌気培養をおこなった。

2) 概数測定: 概算数を知る方法としては、尿中細菌の概算数を測定する方法¹¹⁾ に準拠しておこなった。すなわち、あらかじめそれぞれの菌種の $10^2, 10^3, 10^4$ あるいは 10^5 / ml に相当する集落を持つ標準平板を製作し、これを写真に撮り、被検材料の集落数を標準平板に照合して読みとり、 $10^2, 10^3, 10^4$ あるいは 10^5 台 / ml で表示した。*C. perfringens* 数の測定には上記糞便懸濁液の原液 0.1 ml を KM-Nagler 培地表面に塗布し、また実験の後半には TSN 寒天培地に混和して嫌気培養後、得られた集落数を概数測定に供した。*Lactobacillus*, BEP 群の菌数測定には、上記糞便懸濁液を TGC 培地で 10^{-4} に希釈した液を作り、その 0.1 ml を LBS 培地¹²⁾ 表面に均等に塗布し、*Lactobacillus*

Clostridium Perfringens in the Intestines of Japanese Aged Adults, Particularly Persistent Inhabitation with High Number of *C. perfringens*. Ryoko Morita, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

は好気培養, BEP 群は嫌気培養後, 得られた集落数を概数測定に供した. Bacteroides は GAM 寒天培地(ニッサン)に 5% (V/V) 羊血液, 0.1% 胆汁酸ソーダ, 0.0001% プリリアント緑および 100 μ g/ml カナマイシン (KM) を加えた Bacteroides 用選択 GAM 平板培地¹³⁾を使用して, 同じく 10⁻⁴ 希釈をした糞便懸濁液 0.1 ml を塗布し, BEP 群と同様に概算菌数を算出した.

3) 菌数測定用培地上の集落の鑑別 : C. perfringens は KM-Nagler 平板上で 37 $^{\circ}$ C に 24 時間培養し, レシチネース反応をもつ 1~3 mm 大の円形ボタン状, 不透明, 黄白色を呈する集落をもって鑑別し, TSN 培地および SPS 培地では一応黒化した集落をもって目安とした. Lactobacillus, BEP 群は LBS 平板培地上で 37 $^{\circ}$ C 72 時間培養後それぞれ 1~3 mm 大の円形, 不透明, 乳白色, および 0.5~2 mm 大の正円, 半透明, 白色, 光沢ある半球状隆起を呈する集落をもって鑑別した. Bacteroides は選択 GAM 平板培地上で 37 $^{\circ}$ C 72 時間培養後 1.5~3 mm 大の円形, 半透明, 白色, 光沢ある集落をもって鑑別し, 各菌とも随時釣菌して同定に供した.

3. 嫌気培養法

室温触媒をもちいた嫌気培養ジャー (富永・東京) を使用し, C. perfringens の検索には H₂ 下で 37 $^{\circ}$ C 24 時間培養した. C. perfringens 以外の嫌気性菌の検索には気相を 90% (V/V) H₂, 10% (V/V) CO₂ とし, 37 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した.

4. 分離菌の同定

C. perfringens は Nagler 培地上の定型的な集落所見, 乳糖分解性, レシチネース反応, グラム陽性および C. perfringens A 型菌の抗 α 毒素 (Wellcome Lab., Beckenham.) によってレシチネース反応が阻止されることをみる Willis ら⁹⁾の方法によって同定した. Lactobacillus は集落および顕微鏡下の形態所見, グラム陽性, LBS 培地上で好気発育すること, およびカタラーゼ反応陰性の所見により同定した. Bifidobacterium, Eubacterium, Propionibacterium は集落および顕微鏡下の形態所見, グラム陽性, LBS 培地上で好気発育しないこと, およびカタラーゼ反応陰性の所見により推定した. この所見のみでは三種を区別しがたいので BEP 群として表現した. Bacteroides は集落および顕微鏡下の形態所見, グラム陰性, 選択 GAM 寒天培地に好気発育をしないこと, およびカタラーゼ反応陰性の所見により同定した.

5. TSN 培地における C. perfringens の集落確認試験

TSN 培地中の黒色集落を Nagler 培地上に接種して, 37 $^{\circ}$ C 24 時間嫌気培養後, 上記レシチネース反応を示す特徴ある C. perfringens の集落形態をとるものを C. perfringens と確認した.

6. 乳酸生菌製剤

実験の途中から施設の老人に対し, 乳酸生菌製剤ヤクルト (ヤクルト, 東京) が毎日 1 びん (65 ml 容量) ずつ与えられた. このヤクルト中の Lactobacillus 生菌数を測定したところ, 5 本の平均値では 3.7 \times 10⁸/ml であった.

7. 凝集反応用抗血清の作製

凝集抗原用培地として 3% (W/V) ポリペプトン (大五, 大阪), 1% (W/V) グルコースおよび 0.5% 食塩 (pH 7.4) をもちいた. この培地を中試 (16.5 \times 165 mm) に 10 ml ずつ分注して 115 $^{\circ}$ C 15 分滅菌した. 抗原としてはノーマルフローラの C. perfringens を考えて, 人糞便の非加熱分離の菌をもちいた. この C. perfringens の分離菌株を上記培地に接種し, 37 $^{\circ}$ C 9 時間培養後, 100 $^{\circ}$ C 60 分加熱した後 3500 回 15 分遠心し, 上清を捨て沈査を滅菌生食水に浮遊し, 更に 3500 回 15 分遠心した後上清を捨て, 沈査を滅菌生食水 2 ml に浮遊して抗原とした. これを家兎耳静脈に 5 日毎に, 0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 3.0 ml と量をふやしながら注射した. 最後の注射から 7 日後, 兎から採血して凝集反応用抗血清とした.

8. 凝集反応試験

凝集反応にもちいる抗原は前記抗血清と同じ方法で作製した. ただし, 培養時間は 18 時間とした. 抗原にもちいた菌株はすべて糞便から非加熱で分離したものである. 凝集反応試験は抗血清を生食水で 25 倍に希釈した後, 次々に倍々希釈をして 1600 倍希釈液まで作り小試 (12 \times 105 mm) に各希釈液をそれぞれ 1 ml 分注した. 更に抗原を 1 滴ずつ加えて 43 $^{\circ}$ C 恒温槽で 4 時間後に判定し, 更に室温に 24 時間おき最終凝集値を確認した (Henderson¹⁴⁾).

9. C. perfringens の α 毒素産生と α 毒素の測定

α 毒素産生用培地は牛肉汁に 2% (W/V) プロテオースペプトン (Difco), 0.5% 食塩を加え pH 8.5 とし中試 (16.5 \times 165 mm) に 8 ml ずつ分注して, 20% (V/V) に牛肉かすを加え, 120 $^{\circ}$ C 20 分滅菌後, 菌の接種直前に無菌的に果糖を 1% (V/V) に加えた¹⁵⁾. 前培養 15 時間の菌液 0.2 ml を上記培地に接種し, 37 $^{\circ}$ C 7 時間培養をおこなった後, 3000 回 15 分遠心し, その遠心上清をとって毒素測定に供した. α 毒素の測定は Evans¹⁶⁾の法にしたがいで, 毒素液 1 ml を中和するに必要な抗毒素の力価で表わした. すなわち, 1 α -抗毒素価に相当

する場合を 1α AE/ml (Antitoxin equivalent) とした(当教室で測定した 1α AE は $57LD_{50}$ に相当した¹⁷⁾。卵黄液は Van Heyningen¹⁸⁾ の方法で作成し、測定にもちいた。

10. 糞便中の *C. perfringens* α 毒素の判定

生食水に糞便を 20% (V/V) に懸濁し、10000 回 20 分遠心した後その上清をとり、KM-Nagler 平板上に金属製小円筒 (8 × 10 mm) をたて、この中に上清 0.2 ml を滴下し 37℃ に 24 時間おいた後、円筒の周囲にレンチネース反応が現れたものを陽性と判定した。

11. α 毒素産生用の糞便加クックドミートブロース

クックドミートブロースは Yamagishi, Ishida & Nishida¹⁹⁾ の法により作製し、糞便を 5%, 10%, 20% (V/V) に加えた。滅菌後 1% NaOH で pH 7.0 に調製した。

12. 20% 糞便懸濁培地

試験管 (16 × 180 mm) に生食水 8 ml を入れ、糞便 2

ml 容量を加え 120℃ に 15 分滅菌した。この培地の pH は 6.0 ~ 6.8 を示した。

成 績

I. *C. perfringens* 数測定における加熱処理の影響

糞便から定量的に *C. perfringens* 数を測定する際加熱処理によって無孢子菌を除外した方が測定しやすいので、糞便の加熱前処理の影響を先ず検討した。24 例の糞便試料につき、70℃ 10 分間加熱処理の前後で菌数を測定したところ、表 1 のごとく 11 例は加熱前後でほとんど菌数が変わらず、10 例は加熱後の菌数が 1/10 程度減少し、残りの 3 例は加熱後の菌数が 10 倍程度増加した。この増加した例は heat-shock により spore が活性化することによるのではないかと考え、次の実験をおこなった。すなわち、加熱処理後、菌数増加を示した No. 16 と減少した No. 19 の 2 糞便試料につ

表 1 加熱処理の糞便中 *C. perfringens* 数におよぼす影響

加熱 ^{a)} 後の菌数の増減	糞便件数	内 訳 (加熱による菌数変化 ^{b)})	
増加したもの	3	10 ⁵ 台から 10 ⁶ 台	2 例
		10 ⁴ 台から 10 ⁵ 台	1 例
増減のないもの	11	10 ⁷ 台	1 例
		10 ⁵ 台	4 例
減少したもの	10	10 ⁶ 台から 10 ⁵ 台	4 例
		10 ⁵ 台から 10 ⁴ 台	5 例
		10 ⁴ 台から 10 ³ 台	1 例

a) 70℃ 10分加熱

b) 糞便 1ml 容量中の菌数

表 2 糞便加熱処理条件と *C. perfringens* 数

糞便試料 番 号	糞便 (1ml 容量) 中の生菌数					
	非 加 熱	70℃ 加 熱			80℃ 加 熱	
		10分	20分	30分	10分	20分
1	2.8×10^5	2.6×10^4	5.6×10^3	6.4×10^3	3.2×10^4	4.8×10^4
2	4.6×10^6	1.5×10^6	7.8×10^5	1.2×10^6	1.9×10^5	1.4×10^5
3	1.6×10^4	6.8×10^3	4.0×10^3	7.6×10^3	3.0×10^3	2.0×10^2
4	1.9×10^5	4.2×10^6	4.6×10^6	4.6×10^6	3.6×10^6	2.6×10^6

き、各10個に分けて加熱処理前後の *C. perfringens* 生菌数を測定した。No 19は10試料すべてに加熱後菌数の1/10程度の減少がみられ、No 16では10試料中1個が加熱後同菌数であったが、9個は10倍程度の菌数増加を示した。すなわち、加熱によって菌数が「増加する」とか「減少する」ということは、該糞便内の *C. perfringens* に一定した性質（おそらくは孢子形成と関係する）であることがわかった。ついで加熱条件として糞便を70℃10分、20分、30分および80℃10分、20分の加熱前処理をおこなって、ここから分離されてくる *C. perfringens* 数の変化を検討した（表2）。これらの加熱条件によって約 10^{-1} 減少するもの、ほとんど変わらないもの、あるいは活性化によってむしろ約 10^1 ふえるものがあることが確認された。以上の成績を総括すると、70℃10分が非加熱に最も近い値を示すことがわかったので、以後は分離の便利さを考え、70℃10分の加熱処理をもちいることとした。70℃30分あるいは80℃10分の加熱を加えた場合も、70℃10分の加熱とほとんど変わらない値を示した。

II. *C. perfringens* 分離用選択培地について

著者は実験の前半はKM-Nagler平板培地を糞便中

の *C. perfringens* 分離用培地としてもちいてきたが、実験の途中にTSN寒天培地およびSPS寒天培地の効用性を考え、この3培地の検討を試みた。すなわち、KM-Nagler培地、TSN寒天培地およびSPS寒天培地につき、糞便1ml容量中の *C. perfringens* 数を比較したところ、TSN培地とSPS培地の黒化した集落数は、KM-Nagler培地の定型的な *C. perfringens* 集落数よりも $10^1 \sim 10^2$ 程度多く現れること、およびTSN培地はSPS培地よりも集落数がやゝ多く現れることがわかった（表3）。

ついで黒化した集落のすべてが *C. perfringens* であるかどうかを調べるため、TSN培地の黒化集落をKM-Nagler培地上に接種して確認した。成績は表4に示すごとく、老人の糞便試料では調べた黒化集落のすべてが *C. perfringens* と一致する場合もあり、その誤差は多くても 10^1 も異なることはないので、やや多めに検出されれば使用に耐えることがわかった。また70℃10分加熱処理の場合と非加熱の場合も菌数にめだつ程の影響はなかった。一方、乳幼児の糞便試料では黒化集落が *C. perfringens* でない場合がしばしばあり、加熱前処理によっても *C. perfringens*

表3 *C. perfringens* の選択分離培地の比較
(人糞便中の生菌数/ml 糞便容量)

使用培地 試料番号	Kanamycin Nagler	TSN	SPS
1	4.4×10^4	1.6×10^8	2.6×10^8
2	6.5×10^5	2.4×10^7	9.2×10^6
3	1.5×10^4	1.2×10^5	1.6×10^4
4	2.6×10^3	1.8×10^5	1.2×10^5
5	3.4×10^4	3.1×10^5	1.3×10^5
7	2.0×10^2	4.1×10^3	6.0×10^3
12	3.8×10^5	5.1×10^5	1.1×10^5
13	3.2×10^5	1.4×10^6	4.0×10^5
14	5.0×10^4	8.8×10^4	1.8×10^4
16	5.1×10^6	2.0×10^8	6.5×10^7
18	3.2×10^6	7.9×10^6	6.6×10^6
20	2.3×10^6	2.2×10^8	8.0×10^7
22	3.1×10^7	2.5×10^9	1.1×10^9
25	2.8×10^3	8.0×10^3	4.0×10^3
30	2.6×10^3	2.0×10^5	1.3×10^5

表4 TSN 培地での黒化コロニーと *C. perfringens*

糞便試料	非加熱試料		70°C 10分加熱試料		
	黒化コロニー数	指標 ^{b)}	黒化コロニー数	指標	
成人 (21~73歳)	A	7.20 ^{a)}	(15/16)	7.95	(16/16)
	B	6.56	(6/8)	6.34	(24/24)
	C	6.08	(16/22)	5.66	(6/20)
	D	5.73	(4/24)	4.96	(7/24)
	E	5.20	(8/21)	5.75	(12/22)
	F	5.15	(20/21)	5.62	(21/21)
	G	4.62	(20/32)	5.76	(20/20)
	H	4.20	(6/8)	4.38	(10/12)
乳幼児 (6~19ヵ月)	I	8.81	(0/24)	4.97	(1/24)
	J	8.43	(7/16)	6.41	(0/7)
	K	6.41	(5/16)	3.64	(7/15)
	L	6.15	(5/16)	<2.30	
	M	5.14	(0/22)	2.78	(0/3)
	N	4.98	(0/10)	5.08	(0/12)
	O	<2.30		<2.30	

a) 数値は \log_{10} で表示した

b) 指標: $\frac{C. perfringens \text{ と確認された黒化コロニー数}}{\text{検査した黒化コロニー数}}$

数が著しく減少を示した。以上の結果から老人糞便については、実験の途中から TSN 培地をもちいて菌数を測定することにした（したがって実験の前半 KM-Nagler 培地で測定した *C. perfringens* 数（本文中に明記）は TSN 培地で測定すれば表記より更に $10^1 \sim 10^2$ 程度多いことになる）。

Ⅲ. 老人の正常腸管内の *C. perfringens* 数について

被検老人の属する施設は、本実験を始めて2週間から乳酸生菌製剤（ヤクルト）の投与をはじめたので、投与前の2週間につき3日間隔で5回検便をおこなった成績を一応投与前のコントロールと考えた。各実験毎に全員から糞便試料を得るといふわけにはゆかなかつたので、実験毎に試料数が異ったが、5回の検便における全試料は107例で、そのうち 10^6 / ml 台以上の *C. perfringens* 数を示す試料は34例（32%）であった（KM-Nagler 培地使用）。この糞便1 ml 容量あたり 10^6 台以上の *C. perfringens* 数を示す人の件数について仔細に検討すると、表5のごとく常にこの値を示す人がいる半面、常に示さない人がいるという傾向が

見られた（残りの20人はこの中間的位置にあった）。以上から老人の正常腸管内に多数の *C. perfringens* が一過性でなく、かなり長期にわたって存在する例が意外に多いのではないかと推定された。

Ⅳ. 乳酸生菌製剤投与後の腸管内嫌気性細菌相

上述の実験直後から被験者30人に *Lactobacillus casei* の生菌を主体とする乳酸生菌製剤（ヤクルト）の1日1びんの投与が始まったが、その後13週にわたってこの被験者を調べた。その成績は表6に示す通りである。乳酸生菌製剤の飲用をはじめて最初の7週間は毎週1日ずつ計7回（実験番号6-12）検索した。被検試料数は167例、そのうち 10^6 / ml 以上の *C. perfringens* 数を示す試料は74例（44%）で、これにつづき2週間隔で3回すなわち6週間にわたって（実験番号13-15）検索したが、この期間の成績は49%となり乳酸生菌製剤を飲むことによって *C. perfringens* が減少するという現象は起らないことがわかった（KM-Nagler 培地使用）。

この傾向は1年後に測定した際にも見られた。ただし、この時には TSN 培地が Nagler 培地よりも $10^1 \sim$

10⁸ C. perfringens 数が多く検出されることがわかったので、TSN 培地で培養し Nagler 培地で確認する方法によっておこなった。この新培地をもちいた結果は糞便 1 ml 容量あたり 10⁷ 以上の C. perfringens 数をもつ人が 43% という高い数値を示すことがわかった。

上記実験と併行して実験番号 1-15 につき糞便中の主力細菌である Lactobacillus, BEP 群, Bacteroides の菌数測定をおこなった。乳酸生菌製剤飲用前(実験番号 1-5), 乳酸生菌製剤飲用後 7 週間(実験番号 6-12), および飲用後 8 週から 13 週まで(実験番号 13-15)の区分にわけてまとめた。結果は表 7のごとく Lactobacillus は 10⁸/ml 以上を示す試料がそれぞれ 25%, 37%, 40% で漸次増加する傾向を示し, BEP 群では 10⁷/ml 以上を示す試料が

14%, 15%, 15% とほとんど増減なしであった。Bacteroides では 10⁹/ml 以上の件数についてみると 81%, 61%, 46% と減少する傾向を示した。

なお, 上述の乳酸生菌製剤を老人に投与している期間に, 老人腸管と比較する意味で 1 カ月から 19 カ月以下の乳児 12 人に対しても乳酸生菌製剤の影響を調べた。表 8 にみるごとく老人と異り, Lactobacillus 数は著しい増加を示した。飲用前は 1 ml 糞便容量中 10⁸ 台が 12 試料のうち僅か 1 例, 10⁹ 台が 0 であったのに, 飲用を開始して 2 週間目には 10⁸ 台が 12 試料中 8 例(66%) となった。飲用をつづけて 60 日目では 10⁸ 台が 1 例, 10⁹ 台またはそれ以上を示す試料が 10 例(10⁸ 台以上は 92%) と激増した。

V. 老人腸管内 C. perfringens の恒常性

先に乳酸生菌製剤を投与前 5 回にわたって検索した

表 5 糞便中の C. perfringens の恒常性 (乳酸生菌製剤投与前)

被検者名	検索回数	菌数* が10 ⁶ /ml 以上を示した回数	備 考	
I 群	H. K.	5	4	以後 1 年 9 ヶ月にわたる 30 回の実験でも, 常に多い成績を示した(後述)。
	K. Y.	5	5	
	H. U.	5	3	
	H. T.	4	3	
	N. M.	4	4	
II 群	M. C.	5	0	上述の実験途中, 常に少ない値を示した(後述)。
	Y. M.	4	0	
	K. S.	4	0	
	S. M.	4	0	
	S. Y.	4	0	

* 菌数測定は KM-Nagler 培地を使用

表 6 老人糞便中の C. perfringens

実験期間	被検糞便数	糞便(1ml 容量)中, 下記の C. perfringens 数*を示す試料数			
		10 ⁵ 未満	10 ⁵ 台	10 ⁶ 台	10 ⁷ 以上
乳酸生菌製剤飲用前	107	25	48	18 └──(32%)──┘	16
飲用後 1~7 週	167	30	63	39 └──(44%)──┘	35
飲用後 8~13 週	73	8	29	25 └──(49%)──┘	11

* 菌数測定は KM-Nagler 培地を使用

老人糞便で、すでに *C. perfringens* 数が常に多い人と常に少ない人があるとのべたが、乳酸生菌製剤投与後 25 回にわたって検索した結果、このことが確認された。25 回の検索の中、最初の 10 回は KM-Nagler 培地、後の 15 回は TSN 培地で *C. perfringens* 数を測定したが、それぞれの値を表 9 にまとめて成績とした。そ

の結果は糞便 1 ml 容量あたり 10^7 台もしくはそれ以上の *C. perfringens* 数を含有する場合を多いものの基準としたとき、恒常的に多いグループ (I 群)、少ないグループ (II 群)、およびその中間グループ (III 群) に分かれることがわかった。乳酸生菌製剤を飲用しても、各群において *C. perfringens* 数の増減にはほとん

表 7 老人糞便中の嫌気性菌におよぼす乳酸生菌製剤の影響

菌 種	細菌数/ 1ml 容量糞便	左記の菌数を示す件数		
		飲用前 (被検総数 117)	飲用*後 1週~7週 (被検総数 142)	飲用*後 8週~13週 (被検総数 69)
Lactobacillus	10^9 以上	9	1	4
	10^8	21	52	24
	10^7	35	50	21
	10^6	13	16	6
	10^6 未満	39	23	14
BEP群	10^8 以上	7	17	4
	10^7	9	4	6
	10^6	2	3	1
	10^6 未満	99	118	58
Bacteroides	10^9 以上	98 (81%)	88 (61%)	32 (46%)
	10^8	8	43	15
	10^7	1	11	12
	10^6	1	0	3
	10^6 未満	12	0	7

* ヤクルト 1 日 1 びん投与

飲用前 : 3~4 日ごとに計 5 回採取

飲用後 1~7 週 : 1 週間ごとに計 7 回採取

飲用後 8~13 週 : 2 週間ごとに計 3 回採取

表 8 乳酸生菌製剤投与と乳幼児糞便中の乳酸菌の消長

乳酸菌数 (糞便 1ml あたり)	左記の乳酸菌数を示す試料数		
	投 与 前	投与*14日後	投与*60日後
10^9 以上	0	0	10
10^8	1 (8%)	8 (66%)	1
10^7	2	0	0
10^6	0	0	0
10^6 未満	9	4	1

* ヤクルト 1 日 1 びん投与

ど変化を見せなかった。これらの検索中 $10^7 \sim 10^9$ 台の菌が常に検出される人がいることから、果してこのような多量の C. perfringens を終日もっているのかわかるため、2日間連続して糞便中の C. perfringens 数を測定した (TSN 培地使用)。すなわち、毎月2日間ずつ5カ月にわたって調べたのでその

成績を表10に示す。常に菌数の多い人は糞便中 10^8 / ml以上の高い数値が2日連続しており、きわめて多数の C. perfringens が少なくとも24時間つづいて腸管内に存在していることがわかった。

VI. C. perfringens の定着性

このように恒常的に多数存在する C. perfringens

表9 糞便中の C. perfringens の恒常性 (乳酸生菌製剤投与後)

被検者名	検索回数 ^{a)}	糞便中の菌数 ^{b)} が 10^7 /ml以上を示した検索数	%	
I 群	H. K.	19	18	95
	K. Y.	16	14	88
	H. U.	24	22	92
	H. T.	17	15	88
	N. M.	18	13	72
II 群	M. C.	19	3	16
	Y. M.	12	2	17
	K. S.	25	2	8
	S. M.	25	2	8
	S. Y.	15	0	0

- a) 25回検索したが、毎回必ずしも全員から試料が得られなかったので各人により検索回数異なる。
- b) 最初の10回は KM-Nagler 培地、後の15回は TSN 培地で計測し、両方の値をまとめて示した。

表10 連続2日間の糞便中 C. perfringens 数

検査日	C. perfringens 数 ^{a)} (糞便1 ml 容量中)					
	Y. E. ^{b)}	T. N.	H. U.	K. Y.	Y. N.	J. S.
1975年 1月	29日	10^8		10^9	10^9	10^6
	30日	10^7		10^8	10^9	10^5
2月	18日	10^8			10^8	10^5
	19日	10^8		10^8		10^5
3月	12日	10^5	10^8	10^8		10^6
	13日		10^8	10^8		10^5
4月	9日	10^7		10^8		10^5
	10日		10^8	10^8	10^8	10^3
5月	10日	10^8	10^9		10^9	10^5
	11日	10^7		10^8		10^5

- a) TSN 寒天培地を使用
- b) 被検者名

表11 異なった時期に分離した H. U. 氏由来株の被凝集性

検 査 日	被検菌 ^{a)} 株数	凝集陽性 ^{c)} 菌株数
'74 3月13日	11	10
5 13	23	11
27	19	15
6 3	21	15
10	17	15
28	12	11
7 8	103	103
10	11	11
19	23	23
22	20	20
10 2	20	19
2	23 ^{b)}	22
11 25	19	19
12 26	8	6
'75 2 21	20	17
8 12	16	4
9 2	23	5
10 11	26	23

- a) 糞便から非加熱で分離した。
 b) 70°C 10分加熱分離株
 c) H. U. 由来 HU-1 株抗血清に対する凝集価 1 : 1600

表12 異なった時期に分離した T. Y. 氏^{a)} 由来株の被凝集性

検 査 日	被検菌 ^{b)} 株 数	下記の抗血清と凝集陽性の菌株数				
		TY-1 ^{c)}	TY-2	TY-3	TY-4	TY-5
1974年 9月 30日	3	0	0	0	0	0
10 2	4	1	1	0	0	0
26	5	0	2	0	0	0
28	6	0	2	0	0	0
12 26	9	2	3	2	1	1
1975年 1月 8日	5	0	0	0	0	0
27	12	0	0	0	0	0
8 26	15	0	0	0	0	0

- a) 糞便 1 ml 容量中 $10^2 \sim 10^6$ の *C. perfringens* 数を常に含有した。
 b) 糞便から非加熱で分離した。
 c) 12月26日 T. Y. 氏より分離した 9 株より免疫学的に異なる 5 種の血清 (TY-1~TY-5) を作成。

はある一定の菌株が腸管内で増殖して多数存在するか、あるいは多種類の C. perfringens が絶えず腸管に入り、増殖することによるのかを見るために次の実験をおこなった。元来 C. perfringens は免疫学的には株特異性をもつことから、非加熱分離した腸管ノーマルフローラとしての C. perfringens の 1 株で免疫し、この抗血清との凝集反応で腸管から分離されてくる菌の免疫学的性質をしらべた。実験としては常に C. perfringens を多く示す人 (H.U. 氏) から得た 1 株 (HU-1 株と命名) で抗血清を作り、1 年 8 カ月にわたり H.U. 氏から得た 415 株につき、この HU-1 抗血清に対する被凝集性を検索した。この結果は表 11 のごとく実験期間中この抗血清に終末価 (1:1600) まで凝集する菌株が常に存在した。実験の途中、約 300g の糞便につき各所から 103 株を得たが、すべて終末価まで凝集し単一の菌が支配していることがわかった。しかしながら、H.U. 氏のごとく常に多数の C. perfringens を保有する N.M. 氏につき、1975 年 8 月 22 日の糞便より分離した 1 株 (NM-1 株と命名) で NM-1 抗血清を作り凝集反応をおこなったところ、短期間で菌の交代がみられた。すなわち、20 日前の 8 月 2 日の分離株 7 株の中 6 株 (85%)、8 月 22 日当日の 22 株の中 11 株 (50%)、9 月 2 日の 12 株の中 10 株 (83%) が凝集したが、10 月 7 日以後の分離株からは凝集する株がみられなくなった。このような菌の早期交代は恒常的に C. perfringens 数の少ない人 (T.Y. 氏) についてもみられた。すなわち、1974 年 12 月 26 日に T.Y. 氏糞便から分離した 9 株の中には、すでに 5 種の血清型が存在すること、かつ、各血清型は他のものと凝集しないことを確かめて、この 5 種の抗血清につきそれぞれ凝

集反応をおこなった。成績は表 12 のごとく血清型のすべては分離の日以後短期間に現れなくなり、1975 年 1 月 8 日以後の検査には 5 種の抗血清に対し凝集する菌株は全くみられなかった。

また、糞便中 $10^8 \sim 10^7$ 台/ml の C. perfringens 数をもつ新生児にも血清型の早い交代がみられた。この抗血清は 1975 年 4 月 25 日の分離菌 31 株の中の 1 株から作ったが、この抗血清に対し直後では 31 株の中 27 株 (87%) が凝集したが、5 日後の分離菌からは 1 株も凝集しなかった。

VII. 腸管の C. perfringens の α 毒素原性

以上の結果から老人腸管内にノーマルフローラとして C. perfringens が異常に多く恒常的に存在することがわかったが、次にその α 毒素原性について検討した。1 人の糞便試料から 1 株の C. perfringens をとる方法で実験の途中 93 株を分離し、その α 毒素を測定したところ、93 株のうち 45 株が 1.0AE/ml またはそれ以上の毒素原性を示した。したがってかなり強い毒素原性をもつ菌を腸管に多数保有することがわかった。次に常に 10^7 /ml 以上の C. perfringens を保有する老人 (H.U.) の同一時期の糞便から 20 株を分離し、その α 毒素原性を調べた。結果は表 13 のごとく、分離株の大部分は 0.8~1.0AE/ml の毒素原性を示した。C. perfringens が 10^7 以上、時として 10^9 に達する高いレベルで含有され、その α 毒素原性もかなり高いにもかかわらず、この老人について特記すべき臨床的症状はなんらみられなかった。

VIII. 糞便中における α 毒素産生の抑制

上記の如く恒常的に且つ高い数値に C. perfringens が存在し、その α 毒素原性もかなり高いことがわかったので、当然糞便中の α 毒素の存在が問題となる。しかしながら著者の方法では $10^7 \sim 10^9$ の C. perfringens 数を証明できた人の糞便 (H.U. 氏) にも α 毒素を証明することはできなかった。そこで著者は糞便が α 毒素の産生を抑制するのではないかと考えて次の実験をおこなった。4 人から得た糞便試料をもちいて 4 例の糞便懸濁培地を作り、H.U. 由来の分離株の 1 株 HU-1 (1.0AE/ml の毒素原性をもつ) をそれぞれに接種し、増殖と α 毒素の産生を検討した。成績は表 14 のごとく HU-1 株は 4 例の培地とも 10^8 台に増殖したが、 α 毒素はいずれの培地にも 0.05AE/ml 以下でほとんど無視できるものであった。そこで強毒素原性の BP6K 株をもちい、糞便懸濁クックドミート培地で培養したところ、増殖はいずれも $10^8 \sim 10^9$ 台であったが、 α 毒素の産生は糞便量が多くなるにしたがい抑えられる成績を示した (表 15)。

表13 高数値の C. perfringens carrier から分離した該菌の α 毒素原性

α 毒素原性 (AE/ml)	菌株数*
1.5	1
1.0	6
0.8	9
0.6	1
0.4	1
0.2	1
< 0.2	1

* すべて H.U. 氏由来

考 察

糞便中の *C. perfringens* 数はそれぞれの国民によって異なる^{20,21)}と思われるが, Sutton²²⁾ は衛生的環境が悪いところに住む人は *C. perfringens* 数が多いと述べている。しかし本研究では同じ環境に住み, 同じものを食べている老人の間にも糞便中 *C. perfringens* 数の明らかな違いがみられた。更に Sutton &

Hobbs²³⁾ は食中毒の際, 糞便中 $10^5/g$ 以上の *C. perfringens* があれば食中毒起炎菌としての目安にできるとのべているが, 本実験で $10^7 \sim 10^9/ml$ の菌数をもつ人達はいずれも臨床的症候をみなかった。恒常的に多数の *C. perfringens* を腸管内に持つ老人(H.U.)からの分離菌の多くは1年8カ月間を通して同じ血清型であった。しかし, 同様に多数の *C. perfringens* を保有する老人(N.M.)の場合は短期間で他の血清型に

表14 *C. perfringens* HU-1^{a)} の糞便懸濁培地における増殖と α 毒素産生

糞便懸濁培地 ^{b)}	培養時間	菌数/ml (log ₁₀)	α 毒素 (AE/ml)
W. F.	0	6.6	0.05以下
	7	8.9	
	12	8.2	
	24	8.1	
T. Y	0	6.6	
	7	7.7	
	12	7.9	
	24	8.0	
S. S.	0	6.6	
	7	7.2	
	12	8.6	
	24	8.8	
H. U.	0	6.6	
	7	8.9	
	12	8.4	
	24	8.3	

a) 毒素培地(本文)で1.0 AE/mlの α 毒素を産生した

b) 上記の頭文字の4名から得た糞便を用いた

表15 *C. perfringens* BP6K の糞便加クックドミート培地における増殖と α 毒素産生

糞便容量 (V/V%)	菌数/ml (log ₁₀)	α 毒素* (AE/ml)
0	8.5	3.0
5	9.1	2.0
10	8.3	0.5
20	9.3	0.2

* 37°C 7時間培養

交代したにもかかわらず、依然として $10^7 \sim 10^9$ 台の高い菌数が保有されていた。このことから *C. perfringens* の定着性については宿主の腸管内環境によって影響されるもので、*C. perfringens* の個々の菌株の特性によるものではないと考えられる。

また、かなり高い α 毒素原性をもつ *C. perfringens* が多数存在する糞便中に、 α 毒素のレシチネース作用をみるができなかったが、これについて Goudie²⁴⁾ は糞便中に α 毒素を消滅させる作用があり、その最も有力なものとして蛋白酵素の存在をあげている。本実験で糞便を懸濁した培地は α 毒素の産生を抑制することがわかったが、この培地は高圧滅菌されているので、 α 毒素が証明されないのはこのような蛋白酵素によって破壊されるためではないことは明瞭である。

TSN 寒天培地および SPS 寒天培地は食品中の *C. perfringens* 選択分離用として工夫されたものである²⁵⁾ が、Marshall ら⁹⁾ は TSN 寒天培地に *C. perfringens* を 46°C で培養すると、SPS 寒天培地よりも選択培地としてすぐれていると述べている。本実験のように糞便を対象とした際、TSN 寒天培地の黒化集落をすべて *C. perfringens* としてみなしうるかどうかについて検討したところ、該施設の老人糞便試料の場合は 10^2 程度多めに検出されると考えれば使用に耐えるが、乳幼児の糞便試料の場合は信頼できないことがわかった。

結 論

老人腸管内 *C. perfringens* 数について糞便 1 ml 容量あたり 10^7 台もしくはそれ以上を含有する場合を多いものの基準とすると、恒常的に多い人と恒常的に少ない人およびその中間の人の 3 群に分かれることがわかった。乳酸生菌製剤を飲んでも *C. perfringens* 数は変化がなく、上記 3 群の人にもなら影響がなかった。同時に測定した腸内細菌のうち、*Lactoacillus* は乳酸生菌製剤の投与と共に乳幼児の腸管内で著しく増加したが、老人では僅かに増加のみ認められた程度であった。一方、*Bacteroides* は明らかな減少を示した。*C. perfringens* 数が恒常的に多い群には糞便 1 ml 容量あたり $10^7 \sim 10^9$ の *C. perfringens* を常に保有し、且つこれらの菌の α 毒素原性が $1.0\text{AE}/\text{ml}$ またはそれ以上を示す老人もいたが、臨床的症狀は何もみられなかった。また老人腸管の *C. perfringens* の定着性は 1 年 8 カ月の期間全域にわたって同血清型が続く場合と、数日で交代する場合があったが、いずれも糞便中 $10^7 \sim 10^9/\text{ml}$ という *C. perfringens* の高い数値は変らな

った。他方、*C. perfringens* の低い数値の人の場合は血清型が絶えず交代した。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました西田尚紀教授、および実験に御援助をいただいた富山医科薬科大学山岸高由助教授、石川県衛生研究所芹川俊彦氏に深甚なる謝意を表します。また、本研究に御協力いただいた微生物学教室員各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Drasar, B. S. : Cultivation of anaerobic intestinal bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.*, **94**, 417-427 (1969).
- 2) Haenel, H. : Über die Mikroökologie alter Menschen. *Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. A.*, **188**, 219-230 (1963).
- 3) Mitsuoka, T. & Hayakawa, K. : Die Faecalflora bei Menschen. I. Mitteilung : Die Zusammensetzung der Faecalflora der verschiedenen Altersgruppen. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.*, **223**, 333-342 (1972).
- 4) Smith, H. W. & Crabb, W. E. : The faecal bacterial flora of animals and man : its development in the young. *J. Pathol. Bacteriol.*, **82**, 53-66 (1961).
- 5) Zubrzycki, L. & Spaulding, E. H. : Studies on the stability of the normal human fecal flora. *J. Bacteriol.*, **83**, 968-974 (1962).
- 6) 赤真清人, 大谷昌, 亀山昭一, 伊藤明治, 村田良介 : 健康人糞便中常在菌としてのウエルシュ菌に関する研究・第 1 報 総菌数と耐熱性菌数. *日細誌*, **21**, 619-624 (1966).
- 7) Nakagawa, M. & Nishida, S. : Heat resistance and α -toxigenicity of *Clostridium perfringens* strains in normal intestines of Japanese. *Japan. J. Microbiol.*, **13**, 133-137 (1969).
- 8) Willis, A. T. & Hobbs, G. : A medium for the identification of clostridia producing opalescence in egg-yolk emulsions. *J. Pathol. Bacteriol.*, **75**, 299-305 (1958).
- 9) Marshall, R. S., Steenbergen, F. J. & McClung. : Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiol.*, **13**, 559-563 (1965).
- 10) Angelotti, R., Hall, H. E., Foter, M. J. & Lewis, K. H. : Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, **10**, 193

- 199 (1962).
- 11) Arneil, G. C., McAllister, T. A. & Kay, P. : Detection of bacteriuria at room-temperature. *Lancet.*, **1**, 119-121 (1970).
- 12) Rogosa, M., Mitchell, J. A. & Wiseman, R. F. : A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal Lactobacilli. *J. Bacteriol.*, **62**, 132-133 (1951).
- 13) 上野一恵 : 嫌気性菌と嫌気性菌症 (小酒井・鈴木編), 第1版, 348頁, 東京, 医学書院, 1968.
- 14) Henderson, D. W. : The somatic antigens of the *Clostridium welchii* group organism. *J. Hyg.*, **40**, 501-512 (1940).
- 15) 中川正明 : 人腸管内の Normal Flora としての *Clostridium perfringens* [II] その α 毒素原性および生物学的性状. 十全医会誌, **79**, 35-40 (1970).
- 16) Evans, D. G. : The *in vivo* production of α -toxin, θ -haemolysin and hyaluronidase by strain of *Clostridium welchii* type A, and the relationship of *in vitro* properties to virulence in guinea pigs. *J. Pathol. Bacteriol.*, **57**, 75-85 (1945).
- 17) 石田勝一 : *Clostridium welchii* の毒素原性に関する研究 [I] *Cl. Welchii* の toxinogenic strain の分離について. 十全医会誌, **69**, 61-66 (1963).
- 18) Van Heyningen, W. E. : The biochemistry of the gas gangrene toxins. I. Estimation of the α -toxin of *Clostridium welchii* type A. *Biochem. J.*, **35**, 1246-1256 (1941).
- 19) Yamagishi, T., Ishida, S. & Nishida, S. : Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from soil. *J. Bacteriol.*, **88**, 646-652 (1964).
- 20) Olhagen, B. & Månsson, I. : Intestinal *Clostridium perfringens* in rheumatoid arthritis and other collagen diseases. *Acta Med. Scand.*, **184**, 395-402 (1968).
- 21) Mitsuoka, T. & Ohno, K. : Die faekalflora bei Menschen. V. Mitteilung : Die Schwankungen in der Zusammensetzung der Faekalflora gesunder Erwachsener. *Zbl. Bact. Hyg., I. Abt. Orig. A.*, **238**, 228-236 (1977).
- 22) Sutton, R. G. A. : Distribution of heatresistant *Clostridium welchii* in a rural area of Australia. *J. Hygiene.*, **64**, 65-74 (1966).
- 23) Sutton, R. G. A. & Hobbs, C. B. : Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. *J. Hygiene.*, **66**, 135-146 (1968).
- 24) Goudie, J. G. : The nature of a neutralizing substance for *Clostridium welchii* alpha-Toxin in faeces. *J. pathol. Bacteriol.*, **78**, 17-28 (1959).
- 25) Smith, L. DS. : Factors involved in the isolation of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.*, **35**, 71-76 (1972).

Clostridium perfringens* in the Intestines of Japanese Aged Adults, Particularly Persistent Inhabitation with High Number of *C. Perfringens Ryoko Morita, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. J. Juzen Med. Soc., 89, 606-619 (1980).

Abstract Estimation was performed on the number of *Clostridium perfringens* in 1 ml volumes of fecal specimens collected from 30 healthy aged adults. Some healthy aged adults persistently carried *C. perfringens* at the levels ranging from 10^7 to 10^9 , while some others ranged from 10^3 to 10^6 although all of these adults had the same diet. A few adults were revealed to carry over 10^7 cells with fairly strong α -toxigenicities without any clinical symptoms. Continued drinking of a commercial product containing live *Lactobacillus* resulted in a gradual increase in the numbers of *Lactobacillus* and the decrease in the numbers of *Bacteroides* in the fecal samples but did not yield any change in the number of *C. perfringens*. In the test for agglutinability of isolates of *C. perfringens* collected from two elderly adults, a younger adult and a baby, it was demonstrated that most of the isolates obtained from an aged adult with persistent high levels of *C. perfringens* belonged to the same serotype, while rapid alteration of serotypes could be observed in three other persons with high or low levels. In spite of such a high number as 10^9 *C. perfringens* per ml volume of feces, no trace of α -toxin could be detected in the fecal samples. In *in vitro* tests, fecal suspension suppressed the production of α -toxin although it supported a sufficient growth of the organism. TSN agar was applicable for enumeration of *C. perfringens* in fecal samples of adults but not in those of infants.