

ウエルシュ菌の耐熱性と孢子形成

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

瀬 尾 永 樹

(昭和47年10月9日受付)

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 食中毒は、1895年 Klein¹⁾ によって、最初に報告されて以来、数多くの報告^{2)~4)}があるが、その原因菌について検討を加え、体系づけたのは Hobbs ら⁵⁾である。即ち、Hobbs ら⁵⁾はウエルシュ菌食中毒の際、耐熱性(100°C60分加熱耐性)のウエルシュ菌が分離される割合(%)が正常人の糞便より、中毒患者の糞便の方が著しく高いため、ウエルシュ菌食中毒はこれらの耐熱性ウエルシュ菌によるものであると述べた。その後、欧米、及び、我国においても、Hobbs ら⁵⁾の方法に従って、耐熱性ウエルシュ菌による食中毒が報告^{6)~12)}されて来た。

Hall ら¹³⁾は、最近、Hobbs ら⁵⁾のウエルシュ菌食中毒の際に分離された菌株のうちで、耐熱性があるにもかかわらず、孢子を作り難いものがあるのに反し、米国の食中毒、及び、自然環境から分離された菌株の多くは、耐熱性はないが、孢子形成は良かったと述べた。この孢子形成と耐熱性とのやや奇妙な関係について検討するうちに、次のような事実を経験した。即ち、著者は菌分離時の種々の加熱条件の差異によって「耐熱性は強いが、孢子形成力が弱いもの」「耐熱性は弱いが、孢子形成力が強いもの」の違いが生成してくるのではないかと考えるに至った。著者は、このようなウエルシュ菌の性質を明らかにするために本研究を志した。しかし、一方、ウエルシュ菌は孢子形成が非常に困難な菌として知られているので、この研究のために孢子形成力の良い培地を工夫することが必要であった。その培地について検討した成績も併せ報告したい。

実験材料、及び、実験方法

I. ウエルシュ菌の分離と同定

ウエルシュ菌の分離方法は Yamagishi ら¹⁴⁾の方

法により、同定は主として、Nagler 反応を利用した Willis ら¹⁵⁾の方法を用い、必要に応じて生物性状試験¹⁶⁾を行って確認した。毒素の型判定は Oakley ら¹⁷⁾の法に従った。型判定の抗毒素血清は Wellcome Research Laboratories (Beckenham, Kent, England) から送られたものである。

II. 使用菌株

著者の研究室にて分離、及び、同定された199株のウエルシュ菌(A型128株、C型37株、D型34株)、N. C. T. C. より送付されたA, B, C, D, E, F型菌それぞれ2株づつ、又、東京都食中毒株8株、大阪府食中毒株15株、静岡県食中毒株8株、計242株を使用した。

III. 孢子形成度の測定

ウエルシュ菌は非常に孢子形成度が弱いことは良く知られているので、著者は次のように孢子形成度を規定した。菌をスライド上に薄く塗抹し(顕微鏡1視野中100~300個の菌体を認めた)、10~15視野(陰性の時は、更に多くの視野を見た)の各々が1個それ以上の孢子を認める時、孢子形成度(+)とし、孢子を認める視野と認めぬ視野とがある場合(±)とし、又、全視野にほとんど孢子を認めぬ場合(-)とした。如上の測定法の他に次の如く、定量的測定を行った。各々の塗抹標本を、メチレン青で染色し、各視野に見える光強屈性の孢子の数を測定した後、直ちにその視野を総菌数測定のため、顕微鏡写真を撮影し、菌数を測定した。20視野中に含まれる総菌数と総孢子数との割合を孢子形成度の定量値とした。

IV. 耐熱性試験

著者の考案した孢子形成用培地(2%ポリペプトン、0.5%食塩、pH7.8、本文参照)にて、37°C24時間培養後(菌はほとんど増殖せず沈澱している)よく振盪し均等化した後、滅菌小試験管に1mlづつ分注し、非加熱、及び、60°C、70°C、80°C、90°C、100°C各10

Sporulation and Heat Resistance of *Clostridium perfringens*. Nagaki seo, Department of Bacteriology (Director : Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University

分と100°C30分, 100°C60分加熱後, 最確数測定法¹⁸⁾により耐熱性菌数の定量を行った。この際, 菌移植時の生菌数を総菌数とした。この定量用培地として, 従来, 著者の教室で使用されていた1%ラクトース加肉カスブイヨンのかわりに, 2%プロテオーゼペプトン(Difco), 1%グルコース, 0.5%食塩, 0.1%寒天加培地を用いた。37°C48時間培養後に結果を判定した。

実験結果

I. 孢子形成度, 及び, 培地の吟味

実験方法のところで, 孢子形成度として, (+)(±)(-)と規定したが, 実験に先だち, 孢子形成度(+)と判定した10株が, 実際にはどの程度の孢子形成をもつかを示すために簡単な定量実験を試みた。顕微鏡20視野中における総菌数と総孢子数との比は次の如くであった。以下, 分母は総菌数, 分子は総孢子数, ()内はその百分率(%)を示した。1) 61/4644 (1.31)。2) 36/3180 (1.5)。3) 278/3817 (7.2)。4) 106/4587 (2.3)。5) 28/4353 (0.64)。6) 48/3659 (1.3)。7) 47/3180 (1.5)。8) 60/3943 (1.6)。9) 339/2794 (12)。10) 21/4315 (0.48)。即ち, 孢子形成度(+)の下限は1%前後と思われる。特に, 孢子形成度の高いものは72%を示した。

著者は孢子形成用培地を検討するにあたり, “菌発育に必要な栄養が制限された時, 孢子形成が起る”という Grelét¹⁹⁾の考えに立って試みた。培地のペプトン, 糖を変えて, ウエルシュ菌A, B, C, D, E各型計14株(A型5株, B型2株, C型4株, D型1株, E型2株)を用いて検討した。表1に示す如く, 前培

養と後培養とのペプトンの関係は, プロテオーゼペプトン培地からポリペプトン培地への場合, 孢子形成においてその逆の場合より明らかに勝っていた。次に, 前培養の培地の栄養を更に良くするために, 3%プロテオーゼペプトン, 1%グルコース加肉カスブイヨンを用いた。この場合, 3%プロテオーゼペプトン培地よりも勝っていた。

著者の用いた培地と, 既に, ウエルシュ菌の孢子形成用培地として報告されている Ellner²⁰⁾と Angelotti ら²¹⁾そして, Duncun ら²²⁾の諸培地と比較した。この比較実験には, 土壌より分離した5株を用いた。各々の培地で培養されたものの, それぞれの染色スライドの20視野を前述の方法で定量した。表2に示す如く, 著者の培地では, 他の培地よりも一貫してより多くの孢子形成が認められた。即ち, 著者の培地では, 使用した5株全てに0.6~18%に及ぶ孢子形成を認め, Angelotti ら²¹⁾の培地では4株, Duncun ら²²⁾の培地では3株, そして, Ellner²⁰⁾の培地では1株に孢子形成を認め, 又, 各々の孢子形成度においても, 著者の培地が勝っていた。この実験を再度試みたが, 同様の結果を得た。

II. ウエルシュ菌各型の孢子形成

孢子形成のためには, 前培養として3%プロテオーゼペプトン, 1%グルコース加肉カスブイヨンを用い, 後培養の孢子形成用本培地としては, 2%ポリペプトン, 0.5%食塩(pH7.8)を用いた。使用菌株としては, A型41株, B型2株, C型37株, D型34株, E型2株, F型2株を用い, これらの菌株の孢子形成を調べた。表3に示す如く, この培地でD型菌を除く他

表1 ウエルシュ菌14株の前培養培地の孢子形成用培地に及ぼす影響

前培養培地 (pH 7.2)		3%プロテオーゼペプトン 1%グルコース加培地		3%ポリペプトン 1%グルコース加培地		3%プロテオーゼペプトン 1%グルコース加 肉カスブイヨン	
孢子形成用培地 ペプトン水(pH7.8) (各2%ペプトン)		ポリ (大五)	プロテオーゼ (Difco)	ポリ	プロテオーゼ	ポリ	プロテオーゼ
孢子形成度*	+	10**	4	6	4	13	3
	±	2	1	0	0	0	0
	-	2	9	8	10	1	11

* 孢子形成度(+): 顕微鏡10~15視野中各々1ヶそれ以上の孢子を認めた場合
 (±): 同数視野中孢子を認めた視野と認めぬ視野のある場合
 (-): 同数の視野にほとんど孢子を認めぬ場合
 (注) 1視野中の総菌数は約 100~300 個

** 数値は左欄の孢子形成度を示す株数

表2 種々の孢子形成用培地の比較

使用菌株	孢子形成用培地			
	Ellner	Angelotti	Duncan	改良培地
S 00102	0*	1.7* (66/3960)**	0*	1.5* (55/3703)**
S 00104	0	0.7 (18/2564)	1.2 (75/6151)**	3.7 (167/4558)
S 00105	0	0.6 (23/3563)	0.6 (31/4680)	1.5 (43/2861)
S 00118	0.7 (12/1721)**	7.0 (115/1630)	6.9 (159/2295)	18.0 (415/2300)
S 118-2	0	0	0	0.6 (21/3667)

* : 孢子形成率 (%)

** : () 内は20視野中の(総孢子数/総菌数)

の型の株の大部分に孢子形成を認めた。D型菌のみに孢子形成が認められなかったが、これは1 mlのような大量の菌移殖量では、菌移殖と共に前培養の栄養分をかなり後培養培地に持ち込み、両培地の差がなくなることによるのではないかと考え、D型菌(孢子形成度(-)と判定した株)の1株を用いて、その菌移殖量を0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5...1.0mlと変えて検討した。その結果、0.2mlまでに孢子形成が認められ、それ以上の量では認められなかった。従って、0.2mlの菌移殖量を用いて、D型菌34株について再度試みた。この際、ほとんどの29株に孢子形成を認めた。以上の株は著者の教室で分離されて1年以上の年月を経過したものであり、肉カスピオンで半年毎に継代されている株であるため、孢子形成の強い菌のみが選択されて残り、このため孢子形成が良いのではないかと考え、新しく分離された株を用いて実験を行うべきだと考えた。人糞便を浮遊液とし、60°C10分加熱後、分離された新鮮分離株について孢子形成を観察した。0.2mlの菌移殖量で実験を行ったところ、被検株16株中、15株に孢子形成を認めた。

Ⅲ. ウェルシュ菌孢子の位置、形

ウェルシュ菌の数株は、Ellner²⁰⁾や Angelotti²¹⁾の培地において端位に孢子形成を認めた。又、著者の培地においても同様の所見を認めた。生物学的性状試験¹⁶⁾でウェルシュ菌の性状^{23) 24)}に一致し、かつ、Nagler 培地で Willis¹⁵⁾の同定法に一致する10株を用いて、上記の培地条件下で孢子形成を観察した。スポランギアをみるためには、孢子染色よりメチレン

表3 ウェルシュ菌各型の孢子形成

型	使用菌株数	孢子形成度**		
		+	±	-
A	57	46*	4*	7*
B	2	2	0	0
C	37	34	1	2
D***	24	3	3	18
E	2	1	1	0
F	2	2	0	0

* : 各孢子形成度を示した株数

** : 表1参照

*** : この値は他のA, B, C, E, F型に対して行なったと同様に菌移殖量1 mlの値であるが、特にD型については34株を用いて0.2mlの菌移殖量で再検査し、(+)27株、(±)2株、(-)5株の成績を得た。(本文参照)

青の単染色がわかり易いためこれを用いた。使用した10株中9株は subterminal というより、寧ろ terminal の孢子を多く認めた。7時間培養(図1)では、スポランギアの被染色性は既に弱まり、境界不明瞭であった。30時間培養では、スポランギアは全く溶解して free spore のみとなった。又、孢子の形態は大多数の場合、卵円形であったが、円形の孢子を見ることは稀ではなかった。又、強染色性の円形顆粒

(恐らくは孢子形成への過程)として現われる場合も時々認められた。

IV. 耐熱性と孢子形成との関係

土壤より分離する際の加熱条件と菌の耐熱性、及び、孢子形成との関係は表4、に示す如く、低温加熱の材料からの分離株程形態的に孢子を形成することがわかった。非加熱分離株、70°C10分加熱株の殆んどは、90°C10分加熱に耐性であったが、100°C10分加熱に耐性ではなかった。これに反し100°C10分、100°C60分加熱分離株は著者の用いた孢子形成用培地では、弱いか若しくは殆ど陰性の孢子形成力しか示さなかったが、いずれも100°C10分の加熱に耐性であった。即

ち、之等の成績は「ウェルシュ菌の耐熱性は高温で加熱し分離される程、増大するが、逆に、その形態的な孢子形成力は、かえて減少すること」を示している。耐熱性と形態的な孢子形成力との、この稍奇妙な関係を更に精細い検討すべく、非加熱分離株4株、100°C60分加熱分離株5株、計9株について、種々の加熱条件で加熱後の耐熱性菌数を定量した。その結果は、表5に示す如くであった。即ち、100°C60分加熱分離菌群(接頭語として16-の符号を持つ)は、100°C、10分、20分、30分の加熱試験に対して非加熱分離の菌群(接頭語に00-の符号を持つ)より多数の耐性菌数を示したが、70°C下の加熱耐性試験では非加熱

図1 端位の孢子を示すウェルシュ菌(S115) ×4,000

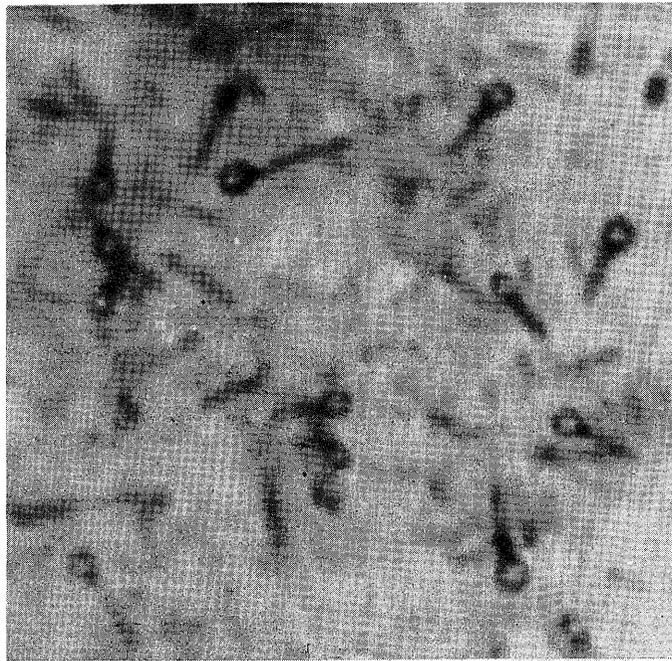


表4 耐熱性と孢子形成度

分離時における加熱条件	分離菌株数	孢子形成度(+) の株数	100°C 10分* 加熱耐性菌株数
非加熱	11	11	0
70°C 10分	16	11	1
100°C 10分	10	5	10
100°C 60分	16	2	13

* : 加熱耐性試験 cooked meat broth 48時間培養に対し
100°C 10分加熱(本文参照)。

分離菌群より少ない耐性菌数を示すことが判った。形態的な判定による孢子形成度は、寧ろ、70°C10分加熱と平行し、100°C10分、30分、60分のいずれの加熱試験下の耐性菌数とも平行しない様に見えたので、このことを更に確かめるため70°C、80°Cを用いて形態的な孢子形成と該温度に対する耐熱菌数を比較検討した(表6)。この実験成績から形態学的な値に近い値をとるならば、80°Cよりむしろ70°Cが望ましい事が判った。表5の成績から60°C10分より望ましいかも知

れないと考えられたが、60°Cという温度は孢子と栄養細胞を区別する温度としては不十分と考え、以後70°C10分の加熱に際して得られた値を形態学上の孢子数に近い値と見なすこととした。(70°C10分の加熱にさえ耐性でない孢子が多数存在することは注目すべきである)。上述の成績をもとにし、非加熱分離株8株、加熱分離株9株を用いて、70°C10分と100°C10分の加熱条件を用いて、耐性菌細胞数を測定した(表7)。即ち、非加熱分離群は70°C10分の加熱に対する

表5 孢子形成能と耐熱性

使用株	分離時における加熱条件	孢子形成度	移植総菌数	加熱耐性菌数						
				60°C10分	70°C10分	80°C10分	90°C10分	100°C10分	100°C10分	100°C60分
S00104	非加熱	+	6.19*	2.69	3.89	3.38	0.89	0	0	0
S00105		+	5.95	4.04	4.23	2.69	1.23	0	0	0
S00108		+	7.25	4.38	4.20	2.73	1.66	0	0	0
S00120		+	6.50	3.84	4.20	3.73	1.89	0	0	0
S16102	100°C 60分	+	6.13		4.11	3.69	3.32	2.84	2.69	0.30
S16105		+	6.53		3.04	3.23	2.84	0.89	0.83	>0
S16111		-	6.63	2.23	2.11	2.34	2.14	2.14	0.30	>0
S16115		-	6.66	1.89	1.11	0.87	>0**	>0	>0	>0
S16116		-	6.50		2.66	1.30	1.96	>0	0	0

* : 生菌数の対数値

** : 定性的に耐性を認めた場合

表6 耐熱性と孢子との関係

使用菌株	耐熱性菌数/総菌数(%)*		孢子数/20視野中の総菌数(%)
	70°C10分	80°C10分	
S00101	0.9	0.17	1.5 (49/3130)**
S00104	0.5	0.15	1.36(39/2869)
S00120	0.5	0.17	7.2 (278/3817)
S16102	1.0	0.37	2.0 (61/3111)
S00102	0.13		1.49(55/3703)
S00105	3.94		1.50(43/2861)
S00118	5.51		18.04(415/2300)
S115-1	1.08		1.95(32/1623)
S118-2	0.04		0.5 (21/3667)

* : 最確数法による(総菌数は $1.7 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^6 / \text{ml}$)

** : 20視野中の(孢子数/総菌数)

耐性菌数は多かったが、100°C10分加熱に対する耐性菌はなかった。これに反し、後者の100°C60分加熱分離株は、3グループに分けられた。被験9株のうち5株は70°C10分の加熱に対しての耐性菌数は少なかったが、100°C10分に対する耐性菌を含んでいた。この2群の内、1つの群は、(100°C60分加熱菌群には寧ろ少い例)70°C10分の加熱に対して孢子をよく作り且第1群の如く100°C10分の加熱にも耐える菌を生ぜしめた2株である。今1つの群は、土壤サンプルを100°C60分加熱して、ここから分離されているにも拘らず用いられた条件下では、70°Cにも100°Cのいづれにも耐性でなかった2株である。之等のグループについて更に検討するため次の実験を行った。即ち

- (1) 形態的には孢子をつくるが、100°C10分には耐えないもの(90°C10分には耐える) Sporogenesis (+), Heat resistance (±) 略してSp[±], HR[±]と記す。
- (2) Sp⁺, HR⁺ (100°C10分に耐えるものをHR⁺と記す)
- (3) Sp[±] (孢子を顕微鏡下では見難い), HR⁺
- (4) Sp[±], HR[±] (90°C10分に耐えぬもの)

の4群の菌を用いて形態的孢子形成力と耐熱性との関係を検討した。之に用いた株は、非加熱分離株(00-の接頭数値を持つ)5株、100°C10分加熱分離株(11-)4株、100°C60分加熱分離株(16-)3株で実験に先だち、孢子形成力(形態より判定)と耐熱性から表8の4群に分けた。そして、各々の群に属する株を Zeissler 平板培地に開き、10個のコロニーから10株の substrains を作り、この10株の耐熱性を検し、親株がどのような耐熱性株からなっているかについて比較検討した。この結果、Sp[±]の菌株は耐熱性の強弱に関係なく、その10株のほとんどが、70°C、80°C、90°C各々10分の加熱に耐性であった。Sp[±]の株では耐熱性の強いもの(高温加熱で分離した株に多い性質)では耐熱性細胞の中に70°C10分にさえ耐えぬ菌が混入していることがわかった。(S16106, S16108, S11104, S11103, S11113)。このSp[±], HR⁺の菌群の個々の株の substrains (個々の菌を平板にひらき10個のコロニーから10株を得た。)の孢子形成能(100°C10分加熱耐性菌数, 対, 総菌数の比)を定量的に測定した。ここでは、S11113の例について記すと、4株の substrains が $3.3 \times 10^{-2} / 10^{5-6}$ の孢子形成能を示したが、他の6株の substrains は耐熱性菌を生じなかった。之等の事実、100°C60分加熱菌が3群に分かれるのみならず、100°C60分加熱分離を受けた菌の個々の株も又如上の群の如き性状を示す菌を

表7 70°C及び100°C10分加熱に対する耐熱性菌数

分離条件	使用菌株	耐熱性菌数/総菌数(%)*	
		70°C 10分加熱	100°C 10分加熱
非加熱 分離株	S 00101	1.6	0
	S 00102	5.0	0
	S 00104	15.3	0
	S 00105	2.2	0
	S 00107	0.2	0
	S 00117	2.3	0
	S 00108	0.3	0
100°C 60分 加熱 分離株	S 00119	0.4	0
	S 16105	0.05	0.003
	S 16111	0.045	0.0016
	S 16113	0.004	0.006
	S 16114	0.023	0.00028
	S 16210	0.0003	0.0002
	S 16104	0	0
	S 16112	0	0
	S 16102	0.9	0.09
S 16106	1.1	0.1	

* : 最確数法による。総菌数は $1.7 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^6$ 。

表8 食中毒由来株の耐熱性
実験(I) 東京都食中毒株

株名	総菌数*	70°C 10分加熱, 耐性菌数*	100°C 10分加熱, 耐性菌数*
W393	7.84	3.59	2.23
W1033-1	6.68	2.08	0.30
W1033-2	6.84	0.89	0.30
W1073	6.45	2.11	1.23
W1075	6.53	3.04	1.23
W1087	6.68	2.60	2.11

* : 総菌数, 70°C 10分, 100°C 10分加熱後の耐性菌数を対数値で示した。

表 8
実験(II) 大阪市食中毒株

株 名	総菌数	70°C 10分加熱 耐性菌数	100°C 10分加熱 耐性菌数
4108	6.64	3.23	2.52
4109	5.82	1.89	1.36
4110	6.85	3.69	2.38
4113	6.85	2.69	2.23
4201	6.42	2.69	2.69
4202	6.00	2.90	2.85
4204	6.56	2.52	1.25
4205	6.86	1.69	1.36
4114	6.75	2.69	1.88
4311*	6.42	0.65	0.65
4340*	6.86	2.52	2.52
4340	6.20	0.65	0
4365	6.53	1.36	1.69
4369*	6.86	3.23	2.52
4369	6.63	2.90	1.52

* : 材料の直接塗抹により分離された株 (即ち 100°C 60分の加熱をうけていない)

表 8
実験(III) 静岡食中毒株

株名名	総菌数	70°C 10分加熱 耐性菌数	100°C 10分加熱 耐性菌数
K4-S*	5.66	1.65	1.11
K11*	6.53	2.49	1.32
K18*	6.45	1.69	0.65
S 2*	6.20	2.90	1.69
S 6*	5.82	4.23	1.23
S 8*	6.20	1.86	1.11
S 9*	5.66	3.11	1.52
722	6.64	4.11	3.23

* : 材料の直接塗抹により分離された株 (即ち 100°C 60分の加熱をうけていない)

含むことを意味している。

V. ウェルシュ菌食中毒株の孢子形成と耐熱性

ウェルシュ菌食中毒が耐熱性ウェルシュ菌によって起る場合が多いとされ、この際、糞便を100°C60分加熱して、ここから菌を分離する事が行われているので、現在、衛生研究所、大学などから手に入れられる食中毒由来のウェルシュ菌は100°C60分の加熱をうけて分離されている場合が多いと思われる。この様なウェルシュ菌は先述の如く、非加熱の菌群とは可也異った性質をもっていると思われる。そこで東京都、大阪市、静岡市の衛生研究所から実際のウェルシュ菌食中毒の際に分離された株の送付を受け、之等の株について、70°C及び100°C10分加熱下の耐熱性菌数を測定し次の結果を得た。(表9)即ち、東京都、及び、大阪府(昭和41、42年度)のウェルシュ菌食中毒株は100°C60分加熱し分離されたもので、これらの株のほとんどは、腸管内のノーマルフローラ菌 (in vitroの耐熱性試験で、100°C10分加熱に非耐性)²⁵⁾と異なり、耐熱性(100°C10分の加熱)はあるが、孢子形成を認めることの少ない(+)株であることが判った。昭和39年度の静岡食中毒株、及び、43年度の大阪府の食中毒株の一部は材料を加熱せず、直接塗抹により分離した株であるが、これらの株の孢子形成度、及び、耐熱性は100°C10分加熱分離した株とは異なるものではなく、いずれもノーマルフローラのウェルシュ菌とは異なるものであった。すなわち、非加熱分離によるノーマルフローラとしてのウェルシュ菌は、耐熱性を持たないことは、既に、Nakagawa²⁵⁾の報告で明らかであるが、著者もコントロールとして人糞便より非加熱で分離した14株について、これらの菌を培養しその耐熱性を試験した。その結果、全株が90°C10分加熱に耐性であったが、100°C10分加熱には非耐性であった。

考 案

Bergey's manual²⁶⁾ 或いは、Prevotの著書²⁷⁾によれば、ウェルシュ菌の孢子は ovoid で central to eccentric と記されている。しかし、Ellner²⁸⁾は孢子は一旦は、terminal に来るが、時間の経過と共に菌体中央に帰る傾向を示すと述べ、terminal に孢子が存在する可能性を暗示している。しかし、著者の培地では、この経過は明らかではなく、孢子が菌体から離れる速度が速く、数視野に1個位菌体の付着した孢子をみつけるに過ぎぬ場合が多かった。このような際、孢子の位置が terminal にあると、他の clostridia と誤まれる恐れがあると思われた。ウェルシュ菌孢子が terminal に存在

表9 孢子形成と耐熱性の分析

S P	HR*	加熱条件 使用菌株	10分			10分	30分	60分
			70℃	80℃	90℃	100℃		
+	干	S 00105	9**	10	10	0	0	0
		S 00107	10	10	8	0	0	0
		S 00117	10	10	10	0	0	0
		S 00118	10	10	10	0	0	0
+	+	S 16106	9	9	9	9	3	1
		S 11102	10	9	9	9	8	7
		S 11114	10	10	9	6	5	0
干	+	S 11104	9	7	7	4	4	2
		S 11113	6	5	5	5	3	3
		S 11103	7	5	5	3	0	0
		S 16108	7	6	6	5	1	0
-	-	S 16107	0	0	0	0	0	0

* : HR; 耐熱性(+)は100℃10分加熱耐性, (干)は100℃10分加熱非耐性だが90℃10分加熱耐性, (-)は70℃10分加熱にさえ耐えぬもの。
Sp; 孢子形成度。本文参照。但し孢子は認めぬが70℃10分加熱耐性を示す時孢子の存在を想定して(干)とした。(-)は70℃10分加熱非耐性かつ孢子の認めぬもの。

** : 子孫株10株中の各温度に対する耐熱性株数

することは、Ellner²⁰⁾の培地のみならず、著者の培地でも、かつまた、特定の菌株に限らず、かなり広範囲に起り得るものであることは、注目にあたいることと思われる。

孢子形成と耐熱性との関係についての著者の結果は、材料の低温加熱によって分離された菌株は高温(100℃60分)加熱によって分離された菌株よりも孢子形成は強いが、耐熱性では劣るということを示した。この結果はHobbsら⁵⁾のウェルシュ菌食中毒の際の分離された菌群が耐熱性はあるにもかかわらず、孢子を作り難いのに、米国の食中毒、及び、自然環境から分離した菌株の多くは、耐熱性はないが孢子形成は良いと述べたHallら¹³⁾の意見や、低温加熱材料から分離した株のほとんどは耐熱性は弱く、高温加熱材料からの分離株は耐熱性は強いと述べているYamagishiら¹⁴⁾の報告をうらづけた。

一般に、孢子形成菌を分離する際、材料の加熱が用いられている。このようにして得られた菌株を孢子研究者は該speciesのprototrophと考えている

が、Curranら²⁸⁾Nelson²⁹⁾やChiassonら³⁰⁾は加熱してここから得られた菌株が原株に較べて、いくつかの栄養要求をする変異株を生じたと述べている。又、Northropら³¹⁾はB. subtilisの孢子を真空中で90~100℃で加熱することにより、変異菌を得たと述べている。従って、100℃60分加熱した時、耐熱性の強い菌の撰択されてくる可能性が当然考えられるが、同時に、熱によって変異菌が生じてくることも考えられる。かくて、耐熱性としては強いが、孢子形成力としては弱い株が出来るのではないかと著者は考えている。従来の孢子形成能の概念からいって、子孫株は親株の示す孢子形成能を持つ個々の細胞から成るはずであるが、100℃60分加熱分離株の場合はSp HRの菌とSp HRの菌とを混合したものであるという結果を得た。この両者はいずれとも、熱によって孢子形成能の上に相当の変異を起している株であるといえる。高温加熱(100℃60分)でSp HRの菌が現われるのは"選択"によるとともに、mutagenic effectが加わって出来る可能性が考えられる。しかし、静岡

と大阪府の食中毒検索に見るごとく、100°C60分の加熱に関係なく、材料の直接塗抹からも Sp^+HR^+ 、 Sp^+HR^+ の菌が分離されてくるのがわかった。ただし、このような菌が種々の環境下で前もって加熱によって生成されてくる可能性は否定出来ないと思う。

ウェルシュ菌食中毒の際に分離される耐熱性ウェルシュ菌は、むしろ、普通分離されるウェルシュ菌よりも、 α 、及び、 θ 毒素原性が弱いということが知られている。これらのウェルシュ菌が中毒を起す力はむしろ、熱に耐えて腸管まで達し、そこで増殖し得る力によっていると思われるが、この点、従来の耐熱性のみを指標とせず、 $HR Sp$ の菌が食中毒の起炎菌として注目されるべきかも知れない。Dische⁸⁾は3株の耐熱性株を用いた人体実験の中で、1株のみが確実に人間に食中毒を起している事実を述べているが、この株はHobbs⁵⁾によれば、彼女らの耐熱性株のコレクションの中では、数少ない孢子形成菌に他ならない。このような $HR Sp$ の株は材料の100°C10分加熱によって得られやすいことは注目されるべきと思う。著者は耐熱性の指標として100°C10分加熱を用いたが、これはYamagishi¹⁴⁾の用いたこの条件に重要な生物学的意義を認めたこと、更に又、この100°C10分加熱に耐性のものは、ほぼ100°C30分、60分に耐える力が強いことのため、耐熱性の指標としても好適と考えたからである。

前に、Nishida³²⁾は彼らの条件下で培養し、100°C10分加熱に耐えたものは無毒であるといつて良いと述べた。Weiss³³⁾も又、D-valueの測定で100°Cの耐熱性のあるものは毒性が低いと述べた。

結 論

ウェルシュ菌の孢子形成条件を吟味し、このための培地を考案し、その各型(A, B, C, D, E, F)計124株、新鮮分離株16株を用いて、その効用性を吟味した。その結果、ほとんどの株がこの培地で孢子を形成することが出来、又、今までに報告されているどの培地よりも優れていることがわかった。孢子は多くの場合、遊離した状態で得られたが、菌体に付着している時、terminalに位置するものを見ることは稀ではなかった。この培地を用いてウェルシュ菌の耐熱性と、孢子形成との関係について更に検討した。即ち、ウェルシュ菌を分離する際、材料の加熱温度を種々変え、加熱温度を上昇させるに従い、ここから分離された菌株の耐熱性と形態的に見た孢子形成能について検討し、次の結果を得た。即ち、一般土壌、及び、正常細菌叢から非加熱及び低温で分離した菌株のほとんど

は孢子形成能は強かったが耐熱性は弱いのに、高温加熱によって分離された菌株の中には、耐熱性は強いが孢子形成能の弱い株が数多く見られた。

ウェルシュ菌食中毒の際に、加熱によって得られたウェルシュ菌の孢子形成能と耐熱性との関係について検討し、次の結果を得た。これらの菌のほとんどは、孢子を作る力は弱かったが、耐熱性の強い孢子を作った。これに反し、正常人糞便からの正常細菌叢のウェルシュ菌の全ては孢子形成能が強かったが、耐熱性は弱かった。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導御校閲を賜った恩師西田尚紀教授、並びにウェルシュ菌食中毒株の分与を受けた東京都衛生研究所善養寺博士、静岡県衛生研究所浅川博士、大阪市衛生研究所安川章氏に衷心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) Klein, E. : Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.), **18**, 737 (1895).
- 2) Andreus, F. W. : Lancet, **I**, 8 (1899).
- 3) McClung, L. S. : J. Bact., **50**, 229
- 4) Zeissler, J. & Rassfeld-Stenberg, L. : Brit. Med. J., **I**, 267 (1949).
- 5) Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Cruickshank, J. C. : J. Hyg. (Camb.), **51**, 75 (1953).
- 6) Hain, E. : Brit. Med. J., **I**, 271 (1941).
- 7) Beck, A., Foxell, A. W. H. & Turner, W. C. : Brit. Med. J. **II**, 686 (1954).
- 8) Dische, F. E. & Elek, S. D. : Lancet, **II**, 71 (1957).
- 9) McNicol, M. & Mckillop, E. : Lancet, **I**, 787 (1958).
- 10) Horodniceanu, T. et Săsarman, A. : Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., **20**, 709 (1961).
- 11) Parry, W. H. : Brit. Med. J. **II**, 1616 - (1961).
- 12) 小酒井望・鈴木祥一郎：嫌気性菌と嫌気性菌症，第1版。239頁，東京，医学書院，1968。
- 13) Hall, H. E., Angelotti, R., Lewis, K. H. & Forter, M. J. : J. Bact., **85**, 1094 (1963).
- 14) Yamagishi, T., Ishida, S. & Nishida, S. : J. Bact., **88**, 646 (1964).
- 15) Willis, A. T. & Hobbs, G. : J. Path. Bact., **75**, 299 (1958).

- 16) Sterne, M. & van Henyningen, W. E. : Bacterial & Mycotic Infections of man, 4th Ed., p. 545, Philadelphia, Lippincott, 1965.
- 17) Oakley, C. L. & Warrack, G. H. : J. Hyg., 51, 102 (1953).
- 18) Hoskins, J. K. : Public Health Rep., 49, 393 (1934).
- 19) Grélet, N. : Ann. Inst. Pasteur, 81, 430 (1951).
- 20) Ellner, P. D. : J. Bact., 71, 495 (1956).
- 21) Angelotti, R. Hall, H. E., Foter, M. J. & Lewis, K. E. : Appl. Microbiol., 10, 193 (1962).
- 22) Duncun, C. L. & Strong, D. H. : Appl. Microbiol., 16, 82 (1968).
- 23) Smith, L. Ds. : Introduction to the Pathogenic Anaerobes, p.22, Chicago, University of Chicago Press, 1955.
- 24) Willis, A. T. : Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine, p.58, London, Butterworth, 1964.
- 25) Nakagawa, M. & Nishida, S. : Japan J. Microbiol., 13, 133 (1969).
- 26) Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., p.666, Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
- 27) Prévot, A. R. : Manual de Classification et de Détermination des Bactéries anaérobies, 3rd Ed., p.245, Paris, Masson, 1957.
- 28) Curran, H. R. & Evans, F. R. : J. Bact., 34, 179 (1937).
- 29) Nelson, F. E. : J. Bact., 45, 395 (1944).
- 30) Chiasson, L. P. & Zamenhof, S. : Can. J. Microbiol., 12, 43 (1966).
- 31) Northrop, J. & Slepecky, R. A. : Science, 155, 838 (1967).
- 32) Nishida, S., Tamai, K. & Yamagishi, T. : J. Bact., 88, 1641 (1964).
- 33) Weiss, K. R. & Strong, D. H. : J. Bact., 93, 21 (1967).

Abstract

A sporulation medium for 140 *Clostridium perfringens* strains, including types A, B, C, D, E, and F, was devised according to Grelet's observation that sporulation occurred when cultural environment became limited in any nutritional requirement indispensable for the growth of the organism. Sporulation took place most prominently when 10% cooked-meat broth (pH 7.2) containing 3% proteose peptone and 1% glucose was used for preculture and 2% Poli peptone medium (pH 7.8) was used for subculture medium. Sometimes terminal spores could be observed. A correlation between sporulation and heat resistance was examined by use of *C. perfringens* strains isolated from samples heated at different temperatures. Almost all strains isolated from unheated samples and from those heated at lower temperatures gave rise to spores in our sporulation medium, but the spores were weakly heat-resistant, whereas most of the strains isolated from samples heated at 100 C for 60 min. were highly heat-resistant but sporulated poorly. Further investigation was performed on *C. perfringens* food poisoning strains which were recovered from samples preheated at 100 C for 60 min. Most of these strains proved to be highly heat-resistant but poorly sporulated, as described above.
