

## 凝集反応と蛍光抗体法によるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) C型及びD型の分離と同定

金沢大学医学部微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

河合光輝

(昭和46年2月2日受付)

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) のA, B, C, D, E, F型の同定はその産生する  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  の主毒素とその抗毒素による中和反応によってなされており<sup>1)2)</sup>, 凝集反応や沈降反応は用いられていない。私は本報で, *in vitro* の方法, すなわち, 上記の凝集反応あるいは蛍光抗体法を用いて, 慣行のマウスを用いての *in vivo* 法による毒素型判定法に代え得るか否かについて検討を試みた。従来まで, 凝集反応はA型を用いてなされて来たが, この際は, 当該菌と当該菌抗血清とはかなりの高単位に凝集するにも拘らず, 他の菌株とは殆んど反応しないことが知られている<sup>3)</sup>。しかし, 元来, Henderson<sup>4)</sup> ならびに, Bergmann ら<sup>5)</sup> はA型以外の菌については, 型特異性の抗原があることを述べているので, この抗原を用いて各型を検出し得る可能性は, あり得ると思われるが, 未だ嘗つて, これ等の抗原を用いて, A型以外のこれ等の菌を血清学的に同定しようとする試みはなされなかった。

本報ではC型D型に対して, この型特異性の抗原を利用して自然界から, この型の菌を分離することを試みた。これ等の分離されたC型およびD型菌を同定中, 従来知られてきた生物性状といくらか相違するものがあつたので, これ等について検討した結果について併せ報告する。

### 実験材料および方法

#### I. 実験材料

北海道滝川市の滝川畜産試験場, 札幌市月寒の農業試験場の主として羊および一部牛の糞便, 北海道紋別郡雄武町の羊の糞便をウェルシュ菌の分離材料とした。材料採取後一部は直ちに分離に使用し, 他は嫌気的狀態にし氷室に保存, 数回にわたって菌を分離した。

#### II. 菌の分離および同定法

分離材料の糞便の少量を生食水または蒸留水中で懸濁液とし, 主に60°C10分, 一部70°C10分または80°C10分加熱後, その約0.5 mlを0.5%に乳糖を加えた肉カスプイオンに入れ, 18時間前培養し, それを0.01%に硫酸カナマイシンを含む Zeissler 平板に拡げ, 24時間嫌気培養後のコロニーをもう一度平板に開き, 純化した後試験に供した。ウェルシュ菌の同定は Nagler 培地<sup>6)</sup>上の血清反応で行なった。

#### III. 凝集反応

0.4% ホルマリン加抗原または加熱抗原とこれに対して作成した抗血清との間で凝集反応を行なったが, 反応の様相によって, Henderson<sup>4)</sup> の定義に従って, L-凝集反応, O-凝集反応と名付けて区別した。L-凝集反応は易熱性抗原による反応であるが, その凝集塊は極めてこわれ易く, 従って小試験管(13×130 mm)の管底の沈澱の様相によって判定した。時として, 菌液そのものが自然凝集の傾向を持つ時は, 対照と比較して, 確実に差のある希釈を終末点とした。O-凝集反応は耐熱性の抗原による反応で, その凝集塊は極めて強固で反応試験管を振っても容易に拡散せず, 終末点の判定は明確に判定することが出来た。L-ならびに O-凝集反応共 37°C 2時間反応させた後, 室温で翌朝まで放置し判定した。

#### IV. 凝集反应用抗血清の作成

免疫に使用した菌株としては, B型4969, C型3182とCWC11, D型L<sub>9</sub>とVX81, E型L<sub>10</sub>, 無毒株としてはAA220を用いた。4969, 3182, L<sub>9</sub>とL<sub>10</sub>は西田尚紀教授が, 英国のLeeds大学細菌学教室から1959年に持参し, 今日まで肝タプイオンで継代しているものである。またCWC11とAA220は豚の中毒性腸炎からDr. Høgh(国立獣医学血清研究所, Copenhagen, Denmark)が分離した<sup>7)8)</sup>もので,

Isolation and Identification of *Clostridium Perfringens* Types C and D by the Use of Agglutination and Fluorescent Antibody Methods. Mitsuteru Kawai, Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University.

Dr. Høgh より送られて来たものである。VX81 は著者が健康な羊の糞便から分離した株である。抗原として、2% (V/V) ポリペプトン (大五栄養), 1% グルコース, 0.5% 食塩 (pH7.2) の培地に18時間培養したものから、次の2種類のものを作成した。すなわち、0.5% ホルマリン液に浮遊液としたものと浮遊液を100°C 60分加熱したものを使用した。免疫の日程および注射量は、0.5, 1.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.0, 3.0, 3.0, 3.0 ずつそれぞれを3日間隔で、家兎の耳静脈に注射した。D型菌の一部、すなわち、O-抗原が VX 81 群に属するものは、そのホルマリン菌液は自然凝集性が強く、菌液を2~3時間放置すると容易に凝塊を作ってしまうので、80°C 10分加熱した後遠心しホルマリン生食水で均等な浮遊液としたものを免疫用抗原とした。(この加熱によって、L-凝集反応を起こす力はなくなるが、抗体をつくる力は依然残されている。本文参照)

#### V. 凝集反応によるスクリーニングの方法

肉カスブイオンで前培養した上液約0.1mlを1%にグルコースを含む3% プロテオーゼペプトン (Difco No. 3 または日水) 培地 (pH7.2) に移し、18~24時間培養後、Mandia ら<sup>9)</sup>の手法に習い、遠心することなく培養後に0.5%にホルマリンを加え、一晚放置後それを凝集反應用抗原液とした。B, C, D, E, F各型のL-抗血清の各々50倍希釈液を0.5ml ずつ小試に分注し、上記の抗原液を0.15ml ずつ加え、予備凝集反応を行ない、スクリーニングの方法とした。後さらに、凝集したものについては、あらためて遠心し0.5%ホルマリン生食水で菌液とし定量凝集反応を行なった。

#### VI. $\alpha$ 毒素の測定法

$\alpha$ 毒素はNishida ら<sup>10)</sup>の方法に従った。

#### VII. $\beta$ ならびに $\epsilon$ 毒素の測定法

毒素産生用培地<sup>11)</sup>として20% (V/V) の肉カス, 2% (W/V) プロテオーゼペプトン, 0.5% 食塩を含むクックドミートブロス (pH7.0) を使用した。この培地 10ml にフラクトースを加えたが、 $\beta$ 毒素産生用には最終濃度1% (W/V) に、 $\epsilon$ 毒素産生用には0.5%を用いた。培養時間は $\beta$ 毒素産生には9時間、 $\epsilon$ 毒素産生には24時間とした。 $\beta$ 毒素と $\epsilon$ 毒素の測定はOakley ら<sup>12)</sup>の方法に従った。

#### VIII. $\delta$ 毒素 ( $\delta$ 溶血毒) の測定法

$\delta$  溶血毒の測定は、最初1%にフラクトースを加えた毒素産生用培地の8時間培養の遠心上清液である $\beta$ 毒素測定用の液を使用した。糖を加えない肉カスブイオンで5~6時間培養した方がはるかによく $\delta$  溶血

毒を産生することが判ったので、この方法を用いた。 $\delta$  溶血毒の強さの測定法としては次の如くである。すなわち、0.5ml の被験液に100 u/ml の $\alpha$ 抗毒素 (千葉血清製造所) 0.1ml 生食水 0.4ml 加え全量1.0ml とし中和後、倍々希釈して2%羊血球浮遊液を0.2ml 加え37°C の水溶に入れた。判定は1時間後に行なったが、翌日もう一度確認した。 $\delta$  溶血毒同定のためには、C型の抗毒素血清 (Wellcome Res. Lab., England) ( $\delta$  抗毒素を含む) で溶血が抑えられること、および $\alpha$ 抗毒素血清、コレステリンで溶血が阻止されない<sup>2)</sup>ことから $\alpha$ ,  $\theta$ による溶血と区別した。肉カスブイオンでは $\theta$  溶血毒は濾液中には全く証明されないのは日常経験する所である。

#### IX. 螢光抗体法 (FA-test)

螢光抗体血清の作成と螢光抗体染色はBatty ら<sup>13)</sup>の方法に従った。FA血清はC型の毒素産生株3182ならびにCWC11 および無毒株AA220 およびD型の毒素産生株2株、すなわち、VX81ならびにL<sub>9</sub>で作成した。

#### X. 莢膜染色

Keppie ら<sup>14)</sup>の方法に従った。

#### XI. ウレアーゼテスト

Brooks<sup>15)</sup>の方法に従った。ただしpH試薬としてはMR-BTB混合液を用いた。

## 結 果

#### I. C型およびD型の特異抗原に対する再検討

予備実験として、各型のホルマリン抗原または加熱抗原とこの2種の抗原で作成した抗血清と間の交差凝集反応を行ない、型特異性について確かめるべく実験を行なった(表1)。11株のD型のホルマリン抗原の総ては、2種の抗血清のいずれとも極めて高い値(10<sup>4</sup>程度)のL-凝集価を認め得たが、これ等の菌液を100°C 1時間加熱することによって、この反応値は直ちに50~100または0と低い値に下った。(後になって80°C 10分の加熱によってもこの下落が容易に起こることが解った)。表1に示される結果はD型菌浮遊液は加熱によって容易にL-凝集反応を示さなくなったけれども、この加熱D型菌で作成された抗血清は、依然としてホルマリン抗原で作成された抗血清と同じ程度にL-凝集反応を示す抗体を含むことを示している。従って、L-凝集反応を引き起こす抗原は易熱性というより菌体から拡散し易い表面抗原ではないかと考え抗毒素血清(当然培養濾液で免疫して作成してある)の中に抗体が作られているのではないかと験した所D型菌抗毒素血清はいずれも高単位にこの抗体を含むこ

表1. ウェルシュ菌C型およびD型の凝集反応における型特異性

抗原		抗血清				
型	被験菌株数	種類	3182 (C型)		L <sub>9</sub> (D型)	
			ホ*	加**	ホ	加
B	4	ホ*	-#	-	(干)	(干)
		加**	-	-	-	-
C	6	ホ	+	+	-	-
		加	+	+	-	-
D	11	ホ	-	-	(++)	(++)
		加	-	-	+-	+-
E	2	ホ	-	-	-	-
		加	-	-	-	-
F	3	ホ	-	-	-	-
		加	-	-	-	-

\*ホ: ホルマリン抗原と当該抗血清

\*\*加: 加熱抗原と当該抗血清

#: 凝集反応の程度. -: 凝集せず, 干: 凝集陽性だが凝集値無視し得る, +: 凝集陽性, ++: 終末凝集値非常に高い場合. ( ) 内のもはL凝集反応で ( ) のないものはO凝集値.

とが解った. この抗毒素血清は他のいずれの抗原とも反応しなかった.

D型の2種類の抗血清に対してB型のホルマリン抗原が弱いL-凝集反応を示したが, 他のC型, A型, E型, F型のいずれも反応しなかった.

C型菌の凝集反応はホルマリン抗原を用いても, 加熱抗原を用いても, その被凝集性に変わりはなく, その反応はO-凝集反応の様相を呈した. すなわち, C型には易熱性の抗原は見出すことは出来なかった. C型以外の菌はC型の抗血清とは反応しなかった.

上記の事実に基づき抗血清を利用してC型およびD型菌を自然界から分離したいと考えた. C型菌の検索にはホルマリン抗原で作成された抗血清を用い, 被検抗原としては, 0.5%ホルマリン加菌液を用いた. D型菌の検索には抗血清としてホルマリン抗原で作成されたものを用いた. 被検抗原としては2種類のもの, すなわち, まず0.5%ホルマリン加抗原を用いて検査し, この内L-凝集反応陽性の菌液を100°C 60分加熱し, この加熱抗原をO-凝集反応の検査に供した.

## II. 菌の分離

菌分離の材料としては羊の糞便および少数の牛糞便

を検査した. 1個の糞便から3~5株のウェルシュ菌を分離し, 合計393株を分離し, これに対してC型およびD型の抗血清を用い, 抗原処理は前記の方法に従って検索を行なった. C型菌3182の抗血清に被凝集性を示したものは50株, D型菌L<sub>9</sub>の抗血清に被凝集性を示したものは(L-凝集反応)49株が見出された. C型菌抗血清に凝集された50株のいずれもD型菌抗血清によって凝集されず, またD型菌抗血清によって凝集された49株のいずれもC型菌抗血清によって凝集されなかった.

### 1. C型菌に対する検索

上記のC型菌抗血清によって凝集される菌に対してδならびにβ毒素原性の有無について検査した結果50株の総てはδ毒素原性陽性であったが, この内23株のみがβ毒素を産生した. δ毒素(溶血毒)はC型菌特有の毒素である所から, β毒素陰性であったとしてもδ毒素が陽性であればC型と判定した.

上記の50株のC型の内48株を用いて(2株は被検直前に雑菌混入のため用いなかった)C型菌抗血清との定量凝集反応を行なった(表2). 表2の中で対照としてC型およびD型のいずれも凝集しない122株を選び, その毒性を試験した結果を示したがいずれもβ, ε毒素原性陰性であった.

表2. C型菌3182の抗血清に対する凝集価とβ毒素原性

凝集価	800*	400	200	0
各凝集価の菌株数	3	40	5	122
β-, δ-の両毒素産生株数	2	18	1	0
δ-毒素のみを産生の菌株数	1	22	4	0
ε-毒素産生株	0	0	0	0
一致する比率** (%)	100	100	100	

\* 凝集反応陽性の抗血清の最大希釈倍数

\*\* 毒素による型同定法と血清学的型同定法とが一致する率

これ等の実験が行なわれている途次, デンマークのDr. Høgh<sup>78)</sup>(国立獣医学血清研究所, Copenhagen, Denmark)より, 彼が豚の中毒性腸炎から分離したウェルシュ菌49株に対して, 我々の抗血清での検査を依頼されたのでこれ等の菌に対して凝集反応を行なった. しかしながら, これ等の49株の総てのC型菌は我が国でのC型菌同定に使用された3182の抗血清によって凝集されなかった. これに反して, デンマーク由来株の大多数はデンマーク由来の有毒株CWC11および

表 3. デンマーク由来49株の被凝集性と  $\beta$ -毒素原性

抗血清*	凝集反応陽性または陰性の菌株数	$\beta$ -毒素原性陽性または陰性の菌株数	付 記
CWC11	+ 43	+ 39 - 4	凝集価: 800, 400, 200, 200.
	- 6	+ 0 - 6	
AA 220	+ 38	+ 35 - 3	凝集価: 800, 400, 400 MLD/ml: 640, 320, 320, 80
	- 11	+ 4 - 7	
3182	+ 0	+ 0 - 0	
	- 49	+ 39 - 10	

\* A型菌55株(内20株は人, 35株は家畜から分離)に対してこれ等の血清のいずれも凝集反応陰性であった。

無毒株 AA220 で作成した抗血清によって200以上の高い値で凝集された(表3), 49株のデンマーク株の内, 43株は CWC11 の抗血清に凝集されこの43株の内39株は  $\beta$  毒素陽性であった。ただし, どの株も  $\delta$  毒素原性陰性であった。残りの4株は被凝集性は示すが  $\beta, \delta$  毒素陰性であった。6株の凝集反応陰性の株のいずれも  $\beta, \delta$  毒素原性は示さなかった。

上記の49株のデンマーク株は AA220 の抗血清に対しては, 38株が凝集反応陽性で38株の内35株が  $\beta$  毒素原性陽性であった。

## 2. D型菌の凝集反応と毒素原性

D型菌 L<sub>9</sub> の抗血清に L-凝集反応を示した49株の他に, 東大農学部の近藤房生氏によって分離された L-凝集反応陽性の15株もこの実験に用いた。合計64株の総ては 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> の極めて高い凝集価を示した。共通の L-凝集反応を示すこれ等の菌株をさらに加熱抗原で検査した場合に3群に分かれることが解った(表4), すなわち, VX81, L<sub>9</sub> およびその他の3群である。VX81 群の菌株はこれに属する13株の総てが  $\epsilon$  毒素原性陽性であった。L<sub>9</sub> 群の菌株40の内  $\epsilon$  毒素原性陽性のものは9株に過ぎなかった。その加熱抗原が L<sub>9</sub> 群にも, VX81 群にも凝集しない11株の総ては  $\epsilon$  毒素原性を見ることはなかった。また対照として用いた L-凝集反応陰性の122株はいずれも  $\epsilon$  毒素原性陰性であった。

表 4. L-凝集反応陽性菌の O-凝集反応と  $\epsilon$ -毒素原性

O-抗原	抗血清に対する O-凝集反応値		$\epsilon$ -毒素原性の比率 (%)
	VX81	L <sub>9</sub>	
I. VX81 群	100~200	0	13/13(100) <sup>*</sup>
II. L <sub>9</sub> 群	0	50~100	9/40(22.5)
III. その他	0	0	0/11(0)

\* 分母は菌株の合計数, 分子は各群に属する  $\epsilon$ -毒素原性陽性の菌株数

## III. 螢光抗体法による血清学的研究

実験に供された株は, 我国由来の32株の C型菌および上述のデンマーク由来の49株およびこの他にさらにその後 Dr. Høgh によって分離された10株を加えた59株 合計91株, これに A型53株, B型3株, D型7株, E型4株, F型8株合計75株を用いた(表5)。

### 1. C型菌に対して

59株のデンマーク株の内48株が  $\beta$  毒素原性陽性で総てが  $\delta$  毒素原性陰性であった。  $\beta$  毒素原性陽性の45株は CWC11 の螢光抗体血清 (FA-血) で清螢光抗体染色 (FA-test) 陽性であった。これに反し, 3182の螢光抗体血清に対しては全く反応しなかった。一方我国

表5. C型ウェルシュ菌の蛍光抗体法による同定

	毒素型	被験株数	FA血清CWC11	FA血清3182
			陽性の菌株数	陽性の菌株数
デンマーク由来株	$\beta$ (+), $\delta$ (-)	48	45	0
	$\beta$ (-), $\delta$ (-)	11	4	0
我国由来株	$\beta$ (+), $\delta$ (+), $\epsilon$ (-)	20	0	20
	$\beta$ (-), $\delta$ (+), $\epsilon$ (-)	16	0	16
対照 (C型以外の菌)	A型	53	0	0
	B型	3	0	0
	D型	7	0	0
	E型	4	0	0
	F型	8	0	0

由来の32株は  $\beta$  毒素の産生の有無に拘らず、総て3182の蛍光抗体血清と反応陽性であったが、CWC11の蛍光抗体血清とは反応陰性であった。また対照として用いた75株のウェルシュ菌の他の型の菌はいずれも上記の2つの抗血清 (FA-血清) とは反応しなかった。

2. C型菌の生物性状に対する検討

C型菌の中で上記のデンマーク由来株と我国由来株の上述の著しい血清学的差異から考えて、私は他の培養性状について検討しておく必要があると考えた。表6に示される如く、上記の2群は  $\alpha$  毒素原性の上で著しい差異を持つことが解った。他の相異とも併せて表7にまとめて示した。すなわち、44株のデンマーク由来株の総ては  $\delta$  毒素原性陰性であるのに対して、3182群の20株の総ては陽性であった。ただし  $\beta$  毒素原性の強さの上での差異を見ることはなかった。また44株のデンマーク株の内わずか2株がウレアーゼ反応が陽性であった。また44株のデンマーク由来株の内39株に荚膜の形成を見ることが出来たが、我国由来の20株の内わずかに1株のみが荚膜を形成したに過ぎなかった。我国由来の株が私が用いた荚膜培地<sup>14)</sup>中でも荚膜を形成しなかったことに対してさらに確認のため、A、

表6. デンマーク由来C型菌株の我国由来C型菌株の  $\alpha$ -毒素原性の相違

菌株	被験菌株数	$\alpha$ -毒素原性 (Lb/ml)	
		範囲	平均値
デンマーク由来株 (CWC11群)	48	<0.05~0.6	0.21
我国由来株 (3182群)	18	0.4~1.5	1.15

B, C, D, E, Fの各型156株を用いて実験を行なった。表8に見られる如く、実験に供された67株のA型菌は内66株がこの培地中で荚膜を形成したにも拘らず、我国由来のC型菌34株の内33株は荚膜形成陰性の

表7. デンマーク由来C型菌株と我国由来C型菌株間の比較

菌株	被験菌株数	凝集反応陽性の菌株数			
		抗血清CWC11	抗血清3182	ウレアーゼ産生	荚膜形成
デンマーク由来株 (CWC11群)	44*	44	0	2	39
我国由来株 (3182)	20#	0	20	19	1

\* この44株の全ては  $\beta$ -毒素原性陽性、 $\delta$ -毒素原性陰性。

# この20株の全ては  $\beta$ -,  $\delta$ -両毒素原性陽性。

表8. ウェルシュ菌各型の荚膜形成

型	被験株数	荚膜形成菌株数	(%)
A	67	66	98.2
B	13	10	76.9
C*	34	1	2.9
D*	32	2	6.3
E	5	4	80.0
F	6	4	66.7

\* それぞれ3株以外は全部我国で分離されたもの。

結果を示した。

この実験でD型菌もまた私の用いた培地で莢膜を形成し難いことが解った。しかしながら、これ等のC型およびD型菌をマウス腹腔内に注射し、この腹腔液中の菌を染色するといずれも莢膜形成陽性であることが解った(金大医学部微生物学教室の菌株蒐集の中からC型D型の各型について4株ずつ無作為に選び検査した)。これ等の莢膜を形成している腹腔液中の菌に対して3182の蛍光抗体血清で染色するとC型のいずれも依然として反応陽性であり、またCWC11の蛍光抗体血清に対しては反応しなかった。D型菌の腹腔からの菌の腹腔からの菌は、いずれもVX81の蛍光抗体血清によって染色陽性であった。

### 3. D型菌について

D型菌 L<sub>9</sub> の抗血清に L-凝集反応を示す45株に対してFA-testを行なった。表9に見る如く、FA-testの成績は加熱菌体抗原を用いての凝集反応(O-凝集反応)と全く一致した。すなわち、被験45株中37株はO-凝集反応陽性であったがFA-testもまた陽性であり、8株はO-凝集反応陰性であったがFA-testもまた陰性であった。またO-凝集反応陽性のもは2群に分けられたが、蛍光抗体血清による群別もまた全くこれと一致して現われた。

表9. FA血清によるD型ウェルシュ菌の同定

型	被 験 菌 数	各FA血清陽性菌株数	
		FA血清 VX81	FA血清 L <sub>9</sub>
A	20	0	0
B	4	0	0
C	54	0	0
D-I*	22	22	0
D-II*	15	0	15
D-III*	8	0	0
E	5	0	0
F	8	0	0

\* 表4. 参照

## 考 察

A型以外の型のウェルシュ菌の凝集反応による抗原分析はこれ迄数少ない研究者<sup>4)5)16)</sup>によって行なわれて来たに過ぎなかった。彼等は総てC型およびD型は型特異抗原を所有していることに意見の一致を見ている。しかしながら、彼等は偽陽性反応すなわち凝集反

応は陽性なのに毒素原性を証明出来ない場合、あるいはまた偽陰性反応すなわち凝集反応は陰性であるのに毒素原性は陽性である場合の有無について論じていない。これらの例外についての吟味は実際にこの凝集反応を用いる際に必要な事項であると私は考えこれについて述べておきたい。すなわち、C型菌の同定に際して3182とCWC11の抗血清を用いる限り、あるいはまたD型菌の同定に際してVX81およびL<sub>9</sub>の両抗血清を用いる限り偽陰性の場合は見られなかった。これに反して、偽陽性の場合にはC型の同定に際して少数見出され、D型の場合には数多く見出された。しかしながら、偽陽性の定義は議論の余地があるように思われる。すなわち、現行のclostridia同定の慣行としては、ある病原性をもつspeciesの無毒株が検出された時これを強いて当該speciesと同定しないで、unidentifiedとしておいた方が良いとされている<sup>1)</sup>。この立場がとられる限り、自然界からは有毒speciesの無毒株は発見されないという不合理が生ずるわけで、換言すれば偽陽性とはこの問題に関連するものと思われる。C型の同定に際して偽陽性が少なかったのはin vivoでのマウス致死毒であるβ毒素の測定という不鋭敏な反応に由らずにin vitroでのδ毒素を同定の指標として用いた所による場合が多いことは私の実験で述べた通りである。δ毒素原性のないC型菌の同定に際しても凝集反応がC型無毒株の判定に相当の意義をもつものと思われる。例えばHøghはC型菌による中毒性腸炎の際無毒株AA220を分離した。この株はδおよびβ毒素陰性でこのような株を到底C型とは判定し難いが、この株はCW11の抗血清によってよく凝集され、またCW11のFA-血清に対して陽性であった。この株がC型と関係が深いものであることはこの株でウサギを免疫してAA220の抗血清をつくとC型菌のみを高率に凝集する抗血清(抗AA220血清)を生じたことによっても推定し得る。

D型菌の同定に際して私の用いたD型菌の総てにL<sub>9</sub>の抗血清に対して反応する共通抗原(ホルマリン抗原)を認めた。しかしながら、このホルマリン抗原には3つの型があると述べかつまたこの3つの型は国別によって異なると述べられている<sup>4)</sup>事に留意しなければならないと思っている。私の分離したD型菌が唯一つの抗血清によって総て凝集し、このもの以外にD型菌を見出せなかったとしても分離される国の相異によってL-凝集反応の抗原が異なることが考えられる。Henderson<sup>4)</sup>はまたD型の加熱された抗原にもかなりの多様性があると述べている。彼は彼の用いた13株のD型菌で9種以上の加熱抗原を証明している。これ

に反して、私は $\epsilon$ 毒素原性に関係する加熱抗原としては唯2つのものがあるに過ぎないと述べた。またこの2種の型があるとしても VX81 抗血清のように凝集するもの総てがD型菌と同定されたものに較べ L<sub>9</sub> 抗血清のように凝集されるもの40株のうちわずかに9株のみがD型菌であるとするようにD型菌同定の上にも差のあることを併せ述べた。しかしながら、もし他国由来のD型菌を手に入れることが出来たら上記2種以外の加熱抗原が存在する可能性を充分考慮に入れておく必要があると思われる。

C型菌に関しては Henderson<sup>4)</sup> は唯一つの共通の抗原があるに過ぎないと述べているが私は確実に2つの抗原があることを証明した。Henderson の結論は彼が使用した菌数が限られていたことに原因するものと思われる。

Brooks<sup>ら</sup><sup>17)</sup> はC型菌に2種類すなわち $\delta$ 毒素産生株と非産生株があることをすでに示しているが、彼等はそれらの菌群の血清学的生物学的性状の差異について何も述べていない。我国由来の菌株とデンマーク由来の菌株との間のこれ等の顕著な差異は、これ等の菌が分離された国の差に原因しているようには思われぬ。すなわち、Henderson<sup>4)</sup> 自身種々の国々から蒐集したC型の菌株に対して共通の熱安定の抗原が存在することを証明しているからである。私はむしろ、私が現在同定したC型菌の殆んどが羊から分離されたものであるのに対し、Høgh<sup>ら</sup>の株が総て豚から分離されたものであることについて、すなわち宿主特異性が将来さらに検討されるべきものと考えられる。

Bergmann<sup>ら</sup><sup>5)</sup> はウェルシュ菌の各型の間にかんがりの共通抗原のあることを述べている。私の現在用いた培地でC型D型を培養する限りこのような共通抗原は無視し得る程度であるが、このような共通抗原の出現は私の経験でも牛肉消化培地を用いた際に認められた。そこで種々のペプトン培地を比較検討した結果1%にグルコースを含む2%ポリペプトン培地が型特異性の抗原を調整するに最適であることが解った。

ウェルシュ菌の抗原構造の分析は私が行なった凝集反応以外にも、補体結合反応<sup>5)16)</sup>、沈降反応<sup>5)16)18)</sup>、寒天拡散法<sup>16)19)20)</sup>などで種々試みられて来たが、これらの方法では私が上に述べて来たような型同定に到る実際的方法となり得る可能性は殆んどないものと思われる。

## 結 論

羊、牛の糞便から393株のウェルシュ菌を分離し、C型およびD型の検索を行なったがこの際これ等の菌

をスクリーニングする目的で凝集反応および蛍光抗体法を用いた。

1. 教室保存のC型(3182)1株での免疫血清に凝集した50株の総てはC型に属することが解った。しかしながら、この抗血清はデンマーク由来のどのC型株とも反応しなかった。デンマーク由来のC型株の総てはデンマーク由来のC型株1株(CWC11)で免疫した抗血清と凝集した。

2. D型同定に際しては先ず L<sub>9</sub> 菌で免疫した抗血清と被験菌のホルマリン浮遊液との間に起こる L-凝集反応によってスクリーニングを試みた。64株の L-凝集反応陽性のものの内22株が $\epsilon$ 毒素原性を持つことが解った。このD型菌は加熱処理後の O-凝集反応によって3群に分けることが出来た。L-凝集陽性で O-凝集反応が陰性(L<sub>9</sub> および VX81 の抗血清で)のものには $\epsilon$ 毒素は証明されなかった。VX81 の抗血清と O-凝集反応を示した13株のウェルシュ菌の総ては毒素学的にD型に属した。

3. 蛍光染色の結果はC型では殆んど凝集反応法と一致した。D型の同定では O-凝集反応の結果と総ての点で一致する成績を得た。

4. 私の用いたC型D型の抗血清によって凝集されなかった122株の対照株の中で、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 毒素が証明されるものはなかった。

5. 我国由来のC型とデンマーク由来のC型の生物性状について比較検討し、ウレアーゼ産生能、莢膜の形成および $\delta$ 、 $\alpha$ 毒素原性の上で両者に著しい差のあることが解った。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師西田尚紀教授に謹んで謝意を表します。また、教室の山岸高由氏の御協力に感謝します。

## 文 献

- 1) Smith, L. Ds. : Introduction to the pathogenic anaerobes, 1st ed., p. 53, Chicago, The university press of Chicago, 1955.
- 2) Willis, A. T. : Anaerobic bacteriology in clinical medicine, 2nd ed., p. 180-186, London, Butterworth, 1964.
- 3) Wilson, G. S. & Miles, A. A. : *Cl. welchii*. Principle of bacteriology and immunity, 5th ed., p. 1057-1059, London, Edward Arnold, 1964.
- 4) Henderson, D. W. : J. Hyg., 40, 501-512 (1940).
- 5) Bergmann, J. & Rapp, G. : Zbl. Bakt. Orig. 1, 159, 500-508 (1952).
- 6) Willis, A. T. & Hobbs, G. : J. Pathol.

- Bacteriol., 76, 299-305 (1957).      7) Høgh, P. : Acta Vet. Scand., 8, 26-38 (1967).
- 8) Høgh, P. : Acta Vet. Scand., 10, 84-100 (1969).      9) Mandia, J. W. & Bruner, D. W. : J. Immunol., 66, 495-505 (1951).
- 10) Nishida, S., Murakami, M. & Yamagishi, T. : Jap. J. Microbiol., 6, 33-40 (1962).
- 11) 西田尚紀・吉沢 潤 : 医学と生物学, 71, 5-9 (1965).      12) Oakley, C. L. & Warrack, G. H. : J. Hyg., 51, 102-106 (1953).      13) Batty, I. & Walker, P. D. : J. Pathol. Bacteriol., 85, 517-521 (1963).
- 14) Keppie, J. & Robertson, M. : J. Pathol. Bacteriol., 56, 123-132 (1944).      15) Brooks, M. E. : J. gen. Microbiol., 26, 231-237 (1961).      16) Bytchenko, B. D. : Zh. Microbiol., 2, 131-136 (1965).      17) Brooks, M. E., Sterne, M. & Warrack, G. H. : J. Pathol. Bacteriol., 74, 185-195 (1957).
- 18) Orr, J. H. & Reed, G. B. : J. Bacteriol., 40, 441-448 (1940).      19) Orleans, E. S. & Jone, V. E. : Immunology, 1, 268-290 (1958).      20) Ellner, P. D. & Bohan, C. D. : J. Bacteriol., 83, 284-296 (1962).

#### A b s t r a c t

Agglutination and fluorescent antibody methods were employed to screen *Clostridium perfringens* types C and D from 393 isolates of this organism. All of 50 isolates agglutinable with an antiserum prepared against a stock strain of type C, No. 3182, toxigenically belonged to type C, but this antiserum showed no cross-agglutination with any type C strains isolated in Denmark. All of the latter strains, however, were agglutinable with an antiserum prepared against a Danish strain, CWC11. Of 64 strains, showing heat-labile agglutinability by type D antiserum L9, 22 strains were toxigenically identified as type D strains which were divided into three groups by the heat-stable antigens. None of the strains which were L-agglutination positive but O-agglutination-negative were  $\epsilon$ -toxigenic. All of 13 strains, the O-antigen of which were agglutinable by a type D antiserum VX81 proved to be type D strains. The results of FA-test were almost in agreement with those of O-agglutination test with type D strains. No  $\beta$ -,  $\epsilon$ - or  $\delta$ - toxigenicity could be demonstrated in strains which were not agglutinated by our test sera for types C and D strains.

Further examination on cultural properties of Japanese and Danish type C strains revealed that both group strains were considerably different in urease production, capsule formation, and  $\delta$ - and  $\alpha$ - toxigenicities.