

人腸管内の Normal Flora としての *Clostridium perfringens*

〔I〕 その耐熱性について

金沢大学医学部細菌学講座(主任: 西田尚紀教授)

中 川 正 明

(昭和44年2月7日受付)

Cl. perfringens による食中毒は Klein¹⁾ により報告されて以来、多くの報告²⁾⁻⁴⁾があるが、Hobbs⁵⁾によりそれは耐熱性 *Cl. perfringens* によるものとして体系づけられた。Hobbs らは患者糞便からはこれらの耐熱性 *Cl. perfringens* が90%に分離されるに反し、*Cl. perfringens* 食中毒以外の人の糞便から5.2%にしか分離されないことを示した。したがって *Cl. perfringens* の食中毒が疑われるケースで、この耐熱性 *Cl. perfringens* の高い分離率をもって *Cl. perfringens* 食中毒推定の基準とした。

Hobbs ら⁵⁾の論文以後、ヨーロッパにおいて同様の方法で多くの *Cl. perfringens* による食中毒が報告⁶⁾⁻⁸⁾され、その際に正常人糞便からの耐熱性 *Cl. perfringens* の分離も試みられ、殆んどが2.2~23%にしか分離されないことが示された⁹⁾⁻¹²⁾。しかし Turner¹³⁾は香港において *Cl. perfringens* 食中毒以外の中国人からは55~63%に分離されたが、英国へもどって同様の方法で正常人の糞便をしらべたところ9%にしか分離されなかったと述べている。わが国においても盛永ら¹⁴⁾⁻¹⁶⁾、赤真ら¹⁷⁾、吉村ら¹⁸⁾は耐熱性 *Cl. perfringens* が高い頻度(50~82%)で正常人より分離されることについて述べている。

著者は従来、糞便を加熱して *Cl. perfringens* の分離を試みているうちに、耐熱性菌が分離される際には糞便中の *Cl. perfringens* 菌数が一般的に言って多いことに気づいた。最近 Sutton ら¹⁹⁾は *Cl. perfringens* 食中毒の際、患者糞便中の菌数が多いことを述べているので、菌数の多いことが耐熱性菌の出現と関係があるかもしれないと考えて本実験を行なった。

実験材料および実験方法

I. 被検対象

学生を主な対象とし、福祉施設・金沢大学附属病院入院患者および小児科医院来院患者などの糞便を用いた。学生および福祉施設の対象者には腹痛・下痢などの症状を訴えるものは全く見られなかった。入院患者および来院患者においては、その種の症状を持つ患者および抗生物質服用患者は対象から除外した。被検材料は可及的新鮮なものをを用いた。

II. 加熱分離

小指頭大の糞便を1%乳糖加肉カスブイヨン3本の各々に投じ懸濁液とした後、70°C・100°C各10分および100°C60分加熱した。実験の後半では専ら100°C60分加熱分離のみ行なった。加熱後急冷し、そのまま37°Cに一夜培養し、翌日1白金耳をとり Zeissler 平板培地に広げた。一夜の培養で混濁の見られない場合は48時間観察した。Zeissler 平板培地はピロガロール炭酸ソーダ法または room temperature catalyser による嫌気 jar 法²⁰⁾によって嫌気性に培養した。分離時の加熱により腸管内にいる殆んど菌は死滅し、多くの場合 *Cl. perfringens* が純培養状に発育したが、他菌の混入がないことを確かめる意味で serial subculture を行なった。それより肉カスブイヨンにとり以後の検査に用いた。

Hobbs ら⁵⁾は材料を100°C60分加熱し、それに耐えて発育してきた菌を耐熱性菌と呼んでいるが、著者は分離菌株を肉カスブイヨンで培養しそれについて耐熱性を検討しているため、後者を培養耐熱性と呼び、糞便の100°C60分加熱に耐えた場合を糞便内耐熱性といって両者を区別することとした。

Clostridium perfringens as a Member of Normal Human Intestine Flora. I. Its Heat Resistance. Masaaki Nakagawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

Ⅲ. 非加熱分離

糞便 1 白金耳を Kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有の Zeissler 平板培地 (KM-Zeissler 培地と略) に塗抹し嫌気性に培養した。Cl. perfringens は Zeissler 平板培地上で溶血を示すボタン状の集落で、空気との接触によって緑変した。扁平で rough な集落も見られた。発育コロニーの性状が多岐にわたった時はその比に応じて釣菌し、Zeissler 平板培地に serial sub-culture を行ない、純培養であることを確かめた後肉カスピオンに移した。

同定は Willis の法²¹⁾ にしたがった。

Ⅳ. 菌数測定

生理食塩水 9 ml 中に糞便 1 ml 容量を入れ、よく攪拌後その懸濁液 0.2 ml を生理食塩水 1.8 ml を入れた小試験管で次々と希釈し、各々の希釈液より 0.1 ml を KM-Zeissler 培地に落として均等に拡げた。3 段階の希釈液について培養を行ない、各々に発育した集落数のうち 10~100 程度段階のものの集落数を算え、糞便 1 ml 容量中の菌数に換算した。

Ⅴ. 耐熱性テスト

石田の方法²²⁾により 10% (v/v) 肉カスピオンに 48 時間培養した後、滅菌小試験管に 1 ml とり 100°C 10 分または 60 分加熱した。水にて急冷後、その 0.5 ml を 1% 乳糖加肉カスピオンに移した。加熱に耐えた菌の殆んどは 24 時間で発育するが、発育の遅れる菌もわずかながら認められたので 48 時間の観察後に判定した。以後本文中において石田の方法で 100°C 10 分の加熱に耐えて発育してきたものを糞便内耐熱性と区別して培養耐熱性と呼ぶこととした。

他の研究者の耐熱性テストとの比較実験では、Brooks の方法²³⁾、飯田の方法²⁴⁾を検討した。その他に、石田の方法で用いた 10% (v/v) 肉カスピオン 48 時間培養に代えて肝臓ブイオン 48 時間培養および脳粥 48 時間培養についても同様に 1 ml を小試験管にとって耐熱性テストを行ない比較実験に加えた。

Ⅵ. 耐熱性テストに使用した菌株

正常人糞便より 100°C 60 分加熱を行なって分離した Cl. perfringens 16 株、Hobbs の各 serotype の 13 株、耐熱性 Cl. perfringens による食中毒より分離された 20 株 (これらは食物および糞便より 100°C 60 分加熱または非加熱で分離された菌株である) について種々の耐熱性テストを行なった。

実験結果

著者は Hobbs の手技⁵⁾ にしたがって、正常人から 100°C 60 分の加熱による分離を 2 回にわたって試み

た。最初は 51 例中 20 例 (39.2%) より Cl. perfringens (糞便内耐熱性) を分離し、次のグループでは 46 例中 20 例 (43.5%) より分離し得た。

後半の実験に際し糞便内耐熱性の Cl. perfringens を含む 20 例の糞便から非加熱で得た 133 株について培養耐熱性を調べたところ、5 株を除いて 100°C 10 分の加熱に耐えたものはなかった。この 5 株は同一人から得た株であるが、食中毒を疑わせるような症状は全くなかった。正常人の糞便から非加熱により数株を分離し得た例で、分離株すべてが 100°C 10 分の加熱に耐えたという例はこの 1 例を除いて見られず唯一の例外であった。この 1 例以外は非加熱で直接塗抹により分離された菌がすべて 100°C 10 分の加熱に耐えず、たとえ糞便内耐熱性の Cl. perfringens を分離し得た人といえども、その人の腸管内 normal flora として存在する Cl. perfringens は 100°C 10 分の培養耐熱性を持たない菌が大部分であることがわかった。

如上の実験に際して糞便の直接塗抹培養によって発育してきた集落数を見ると、糞便内耐熱性の Cl. perfringens を分離し得た糞便の方が、それを証明しなかった糞便の直接塗抹培養よりもはるかに多くの集落を発育させている傾向を知った。そこで 56 人の糞便について定量培養を行ない、糞便 1 ml 容量中の Cl. perfringens 菌数を知ると同時に、Hobbs にしたがって 100°C 60 分加熱分離を併用して糞便内耐熱性の Cl. perfringens の分離を行なった。表 1 に見られる如く大多数の人はその糞便 1 ml 容量あたり 10^4 またはそれ以上の Cl. perfringens を含むことがわかった。それらの中で 6 例は 10^7 もの Cl. perfringens を持っていた。同時に行なった 100°C 60 分加熱分離の成績より、菌数が多くなるにしたがって糞便内耐熱性を示す菌が分離し易くなり、その分離率が高まることわかった。

如上の実験より菌数が多ければ多い程糞便内耐熱性を示す菌の分離率が高まること示されたが、一方、盛永ら¹⁵⁾により年齢が増すにつれてその種の菌の分離率が高まることが報告されている。著者は菌数と年齢

表 1 正常人腸管内の Cl. perfringens 菌数

被検例数	糞便 1 ml 容量あたりの菌数		
	$\leq 10^3$	$10^4 \sim 10^5$	$\geq 10^6$
56	17*(3)**	21(8)	18(11)

* 上記菌数を含む例数

** Hobbs 法により耐熱性菌を証明し得た例数

との関係を検討すべく種々の年齢層にわたってその糞便中の *Cl. perfringens* 菌数を算定することとした。表2に見られる如く、54例の糞便について定量培養を行ない52例より $10^3 \sim 10^8$ /ml の *Cl. perfringens* を検出し得たが、それを年齢別に見ると年齢が高くなるにつれて菌数が多くなる傾向が見られた。

表2 年齢別の *Cl. perfringens* 菌数

年 令	糞便 1 ml 容量あたりの菌数		
	$\leq 10^3$	$10^4 \sim 10^5$	$\geq 10^6$
8~30	5*	8	2
41~58	1	9	7
60~82	2	4	16

* 上記菌数を含む例数

Hobbs ら⁵⁾は糞便を100°C60分加熱し、それに耐えて発育した菌を耐熱性 *Cl. perfringens* と言っているが(糞便内耐熱性)、著者は分離株をさらに石田の方法²²⁾により、すなわち48時間肉カスブイオンで培養しそれを加熱して耐熱性の有無を調べている(培養耐熱性)。この糞便内耐熱性と培養耐熱性との相違をみるために、また糞便内耐熱性をさらに細かく検討するために70°C10分・100°C10分・100°C60分の加熱分離を行ない、そこから分離された菌について培養耐熱性を調べた(表3)。Hobbs らのいう糞便内耐熱性(100°C60分加熱分離)を示した20株のうち17株(85%)が

表3 分離条件と耐熱性

分離条件	非加熱	70°C 10分	100°C 10分	100°C 60分
分離株数	34	28	24	20
分離株中の* 耐熱性株数	1	0	4	17

* 肉カスブイオンにて48時間培養後 100°C 10分加熱(石田の方法)に耐えたもの

石田の方法による加熱に耐え、糞便内耐熱性と培養耐熱性との間にあまり差のないことがわかった。一方100°C10分加熱分離株はその16.7%しか培養耐熱性を示さず70°C10分加熱分離株および非加熱分離株では62株中1株しか100°C10分の加熱に耐えなかった。さらにこれまでの分離株すべてについての耐熱性テストの成績をまとめて見ると、Hobbs らの手技にしたがって40例より分離された132株の糞便内耐熱性を示す *Cl. perfringens* のうち120株(90.9%)が培養耐熱性を示した。それに反し非加熱で109例より分離された393株の *Cl. perfringens* は7株が培養耐熱性を示すのみであった。このうち5株は前述した1例から分離されたものである。この結果より糞便内で100°C60分の加熱に耐える胞子を作る菌は、著者の使用した培地の条件下では100°C10分の加熱に耐える胞子を作ることがわかった。すなわち石田の耐熱性テストにより糞便内での100°C60分加熱耐性株を区別し得ることがわかった。

分離株の培養耐熱性を見るために著者は上述の如く石田の方法²²⁾によっているが、Brooks ら²³⁾は分離株を glucose semi-solid agar に4日間培養し、それを100°C60分および120分加熱して耐熱性の有無を判定している。胞子を持つ菌の耐熱性はその培地による違いが大きく、したがって研究者により耐熱性の成績が著しく異なるので、著者の用いた石田の方法とそれらとを比較検討した(表4)。著者の用いた方法はBrooks らの方法と極わめて近い成績を示し、結果の一致しなかったのはわずか4.5%にすぎなかった。

考 察

著者の成績は糞便中に *Cl. perfringens* が多ければ耐熱性菌が多いことを示している。わが国において耐熱性菌の分離率が高いのは多くの人の normal flora に多数の *Cl. perfringens* を含むためと考えられ

表4 耐熱性テストの比較

使用培地	培養時間 培養温度	加熱時間および温度	
		100°C 10分	100°C 60分
肉カスブイオン*	48時間	38/49****(77.6%)	35/49(71.4%)
1%ブドウ糖加半流動寒天**	96時間	—	34/44(77.3%)
肝臓ブイオン***	14日(室温)	—	27/49(55.1%)
肝臓ブイオン	48時間	34/49(69.4%)	31/49(63.3%)
脳 粥	48時間	33/49(67.3%)	29/49(59.2%)

* 石田の方法

*** 飯田の方法

** Brooks の方法

**** 加熱陽性株数/被検株数

る。英国のそれは少ないものと思われ、Sutton ら¹⁹⁾は平均 $10^3/\text{gram}$ と報告している。また Sutton らは非耐熱性菌による食中毒を報告し、菌が多いこと ($10^6/\text{gram}$ 以上) を診断の基準とすべきだと述べているが、著者の正常人 110 例についての検査で 43 例 (39.0%) もの人が $10^6/\text{ml}$ またはそれ以上の *Cl. perfringens* を持っていることを考えるならば、わが国では $10^6/\text{ml}$ または $10^7/\text{ml}$ でもなお健康であることは留意すべきであろう。また一方たとえ菌数が少なくとも耐熱性菌が分離される (耐熱性菌に感染している) 人もあることは留意すべきである。

糞便内耐熱性を示す菌の大部分は培養耐熱性を持っているが、少数の菌で培養耐熱性を示さず両方の成績の一致しないものが見られた。これに関連して石田²²⁾は土壌内耐熱性を示しながら培養耐熱性を持たない *Cl. perfringens* について検討し、この種の耐熱性菌は $100^\circ\text{C}60$ 分の加熱により分離されながら $90^\circ\text{C} \cdot 80^\circ\text{C}$ 、時には 70°C の加熱にも耐えない位の耐熱性の弱いものとなっていると述べた。これらは分離時の加熱によって孢子形成機構に変異をきたし、もはや完全にその耐熱性を失ったものと思われる。著者の分離実験においても糞便内耐熱性を示しながら $100^\circ\text{C}10$ 分の培養耐熱性を持たない菌が 10~15% 出現したが、これら菌群もそれ以下の温度の加熱に耐えない耐熱性変異株と思われる。

わが国の *Cl. perfringens* 食中毒の殆んどの事例²⁵⁾⁻³³⁾で耐熱性菌分離率が極めて高く、耐熱性菌による感染が考えられていることは留意すべきである。この際 Hobbs 法によって耐熱性菌を分離し得ても、それらが腸管内で感染状態にあり増殖しているのかあるいはわずかに混在しているにすぎないかわかないという不利な点があるが、直接塗抹培養で分離して個々の菌株について培養耐熱性をしらべることにより腸管内に優勢な *Cl. perfringens* が耐熱性であるか否かを検討し得るであろう。正常人腸管内には耐熱性菌が少数存在するにすぎないから、もし耐熱性 *Cl. perfringens* に感染した場合は直接塗抹培養で分離された菌の大部分が培養耐熱性であろうと予測したのであるが、事実、浅川³²⁾および安川³³⁾は西田²⁰⁾にしたがって糞便の直接塗抹培養を行ない、分離した *Cl. perfringens* の殆んどが培養耐熱性であったと述べた。また浅川らは直接塗抹培養の利点として、加熱増菌培養からは種々の血清型を示す菌が分離されたのに反し、直接塗抹培養により分離された菌株は殆んどが免疫学的に一定の型を示したことを挙げている。*Cl. perfringens* 食中毒の証明には現行の分離株につい

ての免疫学的検査の他に、糞便中の菌数が多いということ ($10^7/\text{ml}$ 以上) および分離株の耐熱性などが考慮されるべきである。それにより *Cl. perfringens* 食中毒を細菌学的に推定し得るであろう。

耐熱性テストに用いる培地としては 10% (v/v) 肉カスプイオンがよいが、市販の肉カスプイオン (日水) を用いた場合はその陽性率が非常に低く現われ、用いられないことがわかった。これはその高いアルカリ性のために孢子形成が阻害されるものと思われる³⁴⁾。市販のハートインフュージョン培地 (栄研) に 0.1% 寒天未を加えた培地についても比較検討し、著者の用いた培地と似た成績を得たが、正常人から非加熱で分離されたものについても検討し、区別し得ることが判明するまでは用いられないであろう。

結 論

糞便の直接塗抹により *Cl. perfringens* を分離しその分離株について耐熱性テストを行ない、腸管内をしめる菌群の培養耐熱性を検討した。それによれば正常人腸管内の *Cl. perfringens* は殆んどが $100^\circ\text{C}10$ 分の培養耐熱性を認めず、Hobbs らの方法にしたがって糞便内耐熱性を示した菌を分離し得た例といえども、糞便の直接塗抹による分離では殆んどが $100^\circ\text{C}10$ 分の加熱に耐えない菌であった。

健康人腸管内の *Cl. perfringens* 菌数についても検討し、大部分の人が $10^3 \sim 10^6/\text{ml}$ の菌を有していることを示した。年齢別にみると年齢が高くなるにしたがって菌数が多くなる傾向が得られた。

Hobbs の方法にしたがって分離された *Cl. perfringens* (糞便内耐熱性) は著者の用いた耐熱性テストに耐え (培養耐熱性)、双方の耐熱性を規定する基準に著しい差を認めなかった。また著者の用いた耐熱性テストを他の研究者の方法と耐熱性菌および非耐熱性菌により比較したところ、Brooks らの方法にかなり近い結果を得た。

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に衷心より感謝の意を表します。また *Cl. perfringens* 食中毒株および Hobbs の各 serotype 株の分与を受けた予研・赤真清人先生、東京都衛研・善養寺浩先生、静岡衛研・浅川豊先生に感謝致します。

文 献

- 1) Klein, E. : Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.), 18, 737 (1895).
- 2) Andrews, F. W. : Lancet, I, 8 (1899).
- 3) McClung, L. S. : J. Bact., 50, 229 (1945).
- 4) Zeissler, J.

- & Rassfeld-Sternberg, 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) Beck, A., Foxell, A. W. H. & Turner, W. C. : Brit. Med. J. II, 686 (1954). 7) McNicol, M. & Mckillop, E. : Lancet, I, 787 (1958). 8) Parry, W. H. : Brit. Med. J. II, 1616 (1963). 9) Hain, E. : Brit. Med. J., I, 271 (1949). 10) Dische, F. E. & Elek, S. D. : Lancet, II, 71 (1957). 11) Horodniceanu, T. et Săsarman, A. : Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 20, 709 (1961). 12) Keleti, J. & Rusinko, M. : Excerpta Med. [IV], 17, 419 (1964). 13) Turner, G. C. & Ming, M. W. : J. Path. Bact., 82, 529 (1961). 14) 盛永五作・吉沢 潤 : 日細菌誌, 17, 899 (1962). 15) 盛永五作・吉沢 潤 : 日災医学会誌, 11, 393 (1963). 16) 盛永五作 : 日災医学会誌, 12, 169 (1964). 17) 赤真清人・大谷 昌・龜山昭一・伊藤明治・村田良介 : 日細菌誌, 21, 619 (1966). 18) 吉村 陽・安川章・飯田才一・岩尾守義・大森玄洞 : 日公衛誌, 14, 147 (1967). 19) Sutton, R. G. A. & Hobbs, B. C. : J. Hyg. (Camb.), 66, 135 (1968). 20) 西田尚紀 : 微生物検査必携, 第一版, 197頁, 日本公衆衛生協会, 東京, 1966. 21) Willis, A. T. & Hobbs, G. : J. Path. Bact., 75, 299 (1958). 22) 石田勝一 : 十全医学会誌, 69, 67 (1963). 23) Brooks, M. E., Sterne, M. & Warrack, G. H. : J. Path. Bact., 74, 185 (1957). 24) 飯田広夫・唐島田隆・熊谷 満・清水 敏・西村裕司・岩田一郎 : 北海道衛研報, 12, 1 (1961). 25) Yamagata, H., Iwafune, Y. & Shimamura, Y. : Jap. J. Microbiol., 3, 365 (1959). 26) 中村 豊・飯田広夫 : 北海道衛生研究所特報, 1頁, 北海道衛生研究所, 札幌, 1959. 27) 林 薫・釘田芳文・田原守大・山県 宏 : 長崎大風土病紀, 3, 1 (1961). 28) 林 薫・釘田芳文・田原守大・山県 宏 : 長崎大風土病紀, 3, 87 (1961). 29) 堀 道紀・松本達昭 : 食品衛研, 4, 53 (1961). 30) 杉谷 哲・高松茂夫 : 日公衛誌, 8, 681 (1961). 31) 長崎 護・善養寺 浩・坂井千三 : 公衆衛生, 28, 40 (1964). 32) 浅川豊・中津川修二 : 食衛誌, 7, 266 (1966). 33) 安川 章・吉村 陽・高尾 剡・外村佳子・清田亮夫・明橋八郎・飯田才一・岩尾守義・大森玄洞 : 日公衛誌, 14, 129 (1967). 34) Hardwick, W. A. & Foster, J. W. : J. Gen. Physiol., 35, 907 (1952).

Abstract

Heat-resistant strains of *Cl. perfringens* were incriminated to be causative organisms for food-poisoning by Hobbs et al. They isolated heat-resistant strains from the patients of food-poisoning by heating their feces samples at 100°C for 60 min., and reported that the recovery ratios of heat-resistant strains in the food-poisoning were distinctively higher (ca 89%) than that of normal persons. However, many investigators in Japan and in Hong Kong reported that high ratios of the heat-resistant strains could be obtained from normal persons (50-82%).

Following the Hobbs' method, therefore, I attempted to examine the recovery ratio of heat-resistant strains with 97 feces samples heated at 100°C for 60 min. and 40 samples proved to contain the heat-resistant strains. Heat-resistance in 48 hr broth cultures of 132 strains of *Cl. perfringens* isolated from the 40 feces samples were reinvestigated according to the Ishida's method. Of them, 120 strains proved to be resistant to 100°C for 10 min., whilst *Cl. perfringens* strains as normal flora which were isolated from the feces samples directly smeared on Zeissler's blood agar plates containing 100 µg/ml kanamycin were examined as to heat-resistance and of 393 strains examined, 386 did not show heat-resistance to the test at 100°C for 10 min. This was true of the strains of normal flora isolated from the persons in whom the heat-resistant cells could be demonstrated.

Considering that the higher ratios of heat-resistant cells were obtained from the feces samples which included more cells of *Cl. perfringens*, I attempted to examine

their correlation. The majority of normal persons in Japan contained 10^3 to 10^6 /ml of *Cl. perfringens* cells in one ml volume of feces samples and some carried 10^7 /ml or more cells without exhibiting any symptoms of intestinal disorder. As mentioned above, it could be recognized that the more the cells contained, the higher the ratios of heat-resistant cells were. That is, the ratio of heat-resistant cells from persons who had 10^6 or more was 61.1% but the one from persons of 10^3 or less was only 17.6%. Moreover, I found that the older the ages were, the more the cells contained in their intestines were.

Different methods in heat-resistance test for *Cl. perfringens* cultures were investigated and the 48 hr-old cooked meat broth culture proved to be the most satisfactory method for the objective.