

Clostridium tetani の生物性状

(I) Clostridium tetani Harvard A-47 とその耐熱株の生物性状の差異について

金沢大学医学部微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

山 岸 高 由

(受取昭和44年4月2日)

従来, Clostridium tetani (以下 Cl. tetani と略) は多くの教科書, 専門書にグルコース分解陰性と記載されている¹⁾⁻⁷⁾. しかしながら少数の人は分解するのべている⁸⁾⁻¹¹⁾. 真田¹²⁾は, 土壌を種々の温度で加熱し Cl. tetani を分離するに際し, 加熱温度をあげるにしたがい毒素原性が弱まると同時にグルコース分解株が増えてくること, およびゲラチン液化陰性の株が増えてくることを報告した. このことは Cl. tetani の無毒株がグルコース分解陽性, ゲラチン液化陰性となり, 従来 Cl. tetanomorphum と定義される species¹³⁾¹⁴⁾ と区別出来ない可能性を示した. このことは一面からいって clostridia 研究の上での難関である有毒 species の無毒株の同定という問題, および toxigenesis の解明の問題であり, 他面からいって Cl. tetanomorphum と Cl. tetani の分類学上の問題であるといえる. そこで本報では先ず Cl. tetani のグルコース分解に関する論争を解決すべく, Cl. tetani Harvard A-47 とその耐熱性の substrain を用いて検討をこころみた. 即ち, 先に真田¹⁵⁾はこの株を用い, 加熱して無毒になると共にグルコース分解陽性の substrains を得ているので, この原株および耐熱性の substrain を用いて, 単なる加熱のような単純な操作を経ただけでいかにしてグルコース分解が陰性から陽性になるのか, その機点について検討をこころみ, 更にグルコース分解以外の生物性状の変異についても併せ検討した.

実験方法

菌株は, Cl. tetani Harvard A-47 の原株およびその 100°C 10分加熱耐性株¹⁶⁾ を更に cooked meat broth¹⁷⁾ で48時間培養した菌液を100°C 30分加熱し, これに耐えた株 (K-130 と命名), グルコース分解陽

性の Cl. tetani 1110¹⁸⁾, 1113¹⁸⁾, 1303¹⁸⁾, 1131¹⁸⁾, グルコース分解陰性の Cl. tetani 6101¹⁸⁾, 6114¹⁸⁾, 陸3 (教室保存株), および Pasteur 研究所由来の Cl. tetanomorphum 1772C, CLA を使用した.

生菌数, 発育量, 培地 pH およびグルコース分解酵素活性を測定するための培地として, VF ブイオン¹⁹⁾ を pH 7.50 に調整し 200 ml の投薬ビンに 180 ml ずつ分注したものを作製し, 使用直前に煮沸急冷しチオグリコール酸ナトリウムを 0.1% の割合に加えたものを使用した.

培養方法は上記培地に, 肝々ブイオン¹⁹⁾ で24時間間隔で2回継代した菌を1% に植え, 37°C で 24, 48, 72および96時間好氣的に培養した.

また, 培地へ侵入する空気 (即ち分子状の酸素) の影響を, 表面積対深さの比の変った容器で菌を保存することによって検討した. 即ち, VF ブイオンで24時間培養した菌を培養液のまま数組のペトリ皿 (90×20 mm) と中試験管 (16.5×165 mm) に分注し (ペトリ皿には 10 ml, 中試験管には 15 ml の培養液を入れた), さらに 37°C で好氣的に培養して 0, 24, 48, 72および96の各培養時間の生菌数, 発育量および培地 pH を測定した.

蛋白分解と菌の死滅の関係を検討するために, VF ブイオンで24時間培養した菌液を等量の20%ゲラチン培地と混合して数組のペトリ皿と中試験管に分注し, (容器の大きさと分注量は前項に同じ), さらに 37°C で好氣的に培養し 0, 1, 3, 5および7日目のゲラチン液化および培地 pH を測定した.

生菌数測定は最確数測定法 (Most Probable Number, M.P.N.)²⁰⁾ で行ない, 測定用の培地, 培養時間などについては真田¹⁵⁾の方法にしたがった.

総発育量の測定は日立光電比色計 EPO-B 型を用

Biological Properties of *Clostridium tetani*. (I) Difference in the Biological Properties between a Parent Strain and its Heat-resistant Substrain of *Clostridium tetani* Harvard A-47. Takayoshi Yamagishi, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

い (フィルターは No.53), 吸光度より mgN/dl で表わした。

pH の測定はホリバ pH メーターを使用した。

グルコース分解酵素活性の測定には Warburg 検圧計を用いた。その方法は Umbreit ら²¹⁾によったが、測定用の菌液は、菌を数本の投薬ビンに作製した VF ブイヨンに培養し、各測定時間毎に1本ずつ培地をとり出し 5,000 rpm, 10分間遠心し、沈査を生理食塩水で洗滌して再び 5,000 rpm, 10分間遠心し、沈査を Krebs-Ringer-Bicarbonate 液 (0.90% NaCl : 100 ml, 1.15% KCl: 4 ml, 1.22% CaCl₂: 3 ml, 2.11% KH₂PO₄: 1 ml, 3.82% MgSO₄ · 7H₂O: 1 ml, 1.30% NaHCO₃: 21 ml, 計 130 ml とし, CO₂ ガスを通気し pH 7.4 とする) で 1 mgN/ml の菌量になるように調整した。検圧計の気相を 5% CO₂, 95% N₂ ガス系とし, 容器主室に菌液 0.5 ml, 一方の側室に 0.1M グルコース Krebs-Ringer-Bicarbonate 液 0.3 ml, 他方の側室に 0.2 ml の 1N H₂SO₄ を入れ, 温度平衡の後, 主室にグルコース Krebs-Ringer-Bicarbonate 液を混入して 1 時間に発生した CO₂ (Q_{CO₂}) の量をもってグルコース分解酵素活性 (グルコース代謝量) とした。

生物性状試験および発育量の測定には Sterne ら⁶⁾の培地およびペプトン水 (2% ポリペプトン, 0.5% イーストエキス, pH 7.2) を使用したが, 培地量は両者共小試験管 (12×105 mm) に 3.5 ml とし, 糖量は 1%, 接種菌量は 0.15 ml とした。寒天を含む培地での O. D. (発育量) の測定は, 菌液の寒天を溶解す

るため, 試験管を沸とう水中で約 1 分間加熱し寒天を溶解して均等にした後, 常温に冷えてから行なった。

20%ゲラチン培地の組成は 2%プロテオゼペプトン (Difco), 0.5%NaCl および 20%ゲラチンで pH 7.0 とした。

嫌気培養は室温触媒法²²⁾を用いた。

実験結果

Ci. tetani Harvard A-47 の原株およびその耐熱株の各培養時間 (7, 24, 48, 72 および 96 時間) における生菌数, 発育量, 培地 pH およびグルコース分解酵素活性は表 1 のごとくになった。

原株については, 生菌数は 48 時間以後になると初日の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{10}$ に減少したが, 発育量はほとんど不変であり, 培地 pH は時間の経過と共にアルカリ性が強くなった。グルコース分解酵素活性は不安定で 24 時間値で 7 時間値の $\frac{1}{2}$ 以下に減少した。

耐熱株については, 生菌数は時間が経過してもほとんど不変で, 発育量は著しい増加を示した。培地 pH は時間的变化がほとんどなく, グルコース分解酵素活性は比較的長く (48 時間以上) 安定であることがわかった。

又, 両者の生菌数を比較するとき, 耐熱株は比較的長く安定であるが, 原株は生菌数が減少する傾向を示した。元来, 死菌の増大が培地 pH をアルカリに変える作用のあることは Ci. tetani に限らず細菌培養の際にしばしば経験することであるから, この生菌数の減少が培地のアルカリ化を示し, グルコース分解によ

表 1. Ci. tetani Harvard A-47 原株および耐熱株の生菌数, 発育量, pH およびグルコース分解酵素活性の比較

使用株	培養時間 (hr.)	生菌数/ml	発育量* mgN/dl	pH	Q CO ₂ (μl/hr.)
原株	7	1.1 × 10 ⁸	4.23	7.48	98
	24	1.1 × 10 ⁸	5.18	7.42	19
	48	2.4 × 10 ⁷	5.07	7.52	10
	72	7.9 × 10 ⁶	4.46	7.80	5
	96	1.3 × 10 ⁷	4.85	7.90	—
耐熱株	7	2.4 × 10 ⁸	4.08	7.46	59
	24	3.3 × 10 ⁸	5.51	7.25	43
	48	3.3 × 10 ⁸	6.27	7.28	43
	72	4.9 × 10 ⁸	8.08	7.40	19
	96	2.4 × 10 ⁸	7.16	7.40	—

* O. D. より測定

る酸を消去しさるのでないかと考え次の実験を行なった。即ち、死菌を増大させるために、嫌気生菌であることを利用して、培地量に対して表面積をかえることを応用した。即ち、24時間培養の菌液を中試験管およびペトリ皿に分注して、培養容器で空気侵入速度の差を作り、この時点を0として、以下両培養法での培地pH、発育量および生菌数を24時間毎に96時間まで観察した(表2)。

空気の侵入速度の遅い中試験管培養と空気の侵入速度の速いペトリ皿での培養の差を比較すると、原株および耐熱株の両者共、中試験管培養に比べて、ペトリ皿培養の方が明らかに菌の死滅が速く、培地pHのアルカリ化が急速であった。原株と耐熱株を比較してみると、原株の生菌数の減少およびpHのアルカリ化の速度は、ペトリ皿および中試験管培養のそれぞれの場

合、耐熱株のそれらに比べて速いことがわかった。

以上より Cl. tetani Harvard A-47 の原株も耐熱株も共にグルコース分解酵素活性をもっているが、耐熱株のグルコース分解酵素活性が比較的安定であるのに対して、原株のそれは不安定であること、原株は耐熱株に比して培地をアルカリ化しやすいこと、これらの現象は菌の死滅と深い関係のあることなどがわかった。

ゲラチン分解に関しては、原株は陽性、耐熱株は陰性であるが、この変異も菌の死滅と関係している可能性が考えられた。そこで、表2で得られた成績をもとに、両株をVFブイオンで24時間培養した菌液と20%ゲラチン培地を等量に混合して、ペトリ皿と中試験管に分注して37°Cで好氣的に培養し、ゲラチン液化の有無を検討した(表3)。

表2. Cl. tetani Harvard A-47 原株と耐熱株の pH, 発育量
および生菌数に及ぼす培養容器の影響

使用株	培養容器	培養時間 (hr.)	pH	発育量* mgN/dl	生菌数/ml
原株	ペトリ皿	0	7.40	4.40	3.3×10^8
		24	8.30	4.15	0
		48	8.31	4.15	0
		72	8.12	4.15	0
		96	8.07	4.15	0
	中試験管	0	7.40	4.40	3.3×10^8
		24	7.75	4.82	1.3×10^7
		48	7.81	4.76	2.4×10^7
		72	7.70	5.13	9.2×10^7
		96	7.83	4.05	3.3×10^7
耐熱株	ペトリ皿	0	7.23	5.13	1.1×10^9
		24	7.73	4.90	2.0×10^8
		48	7.76	5.00	2.2×10^8
		72	7.70	5.00	4.9×10^8
		96	7.83	4.80	6.8×10^1
	中試験管	0	7.23	5.13	1.1×10^9
		24	7.48	5.75	9.2×10^8
		48	7.47	6.20	5.2×10^8
		72	7.48	6.43	1.3×10^8
		96	7.69	6.71	1.6×10^8

* O. D. より測定

菌の死滅速度の速い原株は、培養容器の差が認められず、ペトリ皿および中試験管培養の両方法で共に培地 pH の上昇が認められ、ゲラチンを1日で液化した。

生存力の安定した耐熱株は、培養容器の差が著しく、中試験管培養では pH の上昇もゲラチン液化も認められなかったのに対して、菌の死滅を速めるためにペトリ皿で培養すると1日目で pH の上昇が、5日目でゲラチン液化が認められた。ゲラチンの液化は pH の上昇と密接に関連して起ったが、培養の条件から考えてアルカリ化は菌の死滅と関連するものと思われる。即ち *Cl. tetani* Harvard A-47 の原株と耐熱株のグルコース分解とゲラチン液化の変異は、グルコース分解酵素やゲラチナーゼの欠如によるものでなく、酵素活性の安定性や菌の死滅と関係していることがわかった。

更に又、その他の反応にも差異が認められることも考えられたので、各種糖に対しての両株の生物性状を比較した(表4)。

検討した生物性状の中で、ガラクトースとキシロースの分解に変異が認められたので、原株と耐熱株がこの2種の糖を含む9種の糖を利用するか否かを検討した。即ち、両株を肝タピオンで24時間培養し、これを各糖の含まれたペプトン水に 0.15 ml の割に接種し、37°C で好氣的に培養し、1週間目と2週間目の酸産生の定性反応と O.D. (発育量)を測定した(表5)。

耐熱株はグルコースのみならずガラクトースおよびキシロースの分解に対しても陽性を示すことは生物性状試験の際と同一であるが、その発育はグルコース、ガラクトースおよびキシロースによっても特に促進されることはなかった。但し、耐熱株の発育は糖の欠如した状態でも原株に比べて2倍以上の O.D. を示すことがわかった。

この *Cl. tetani* Harvard A-47 の耐熱株はすでに無毒であることが判っているので、その糖分解(グル

コース、ガラクトースおよびキシロース分解陽性)およびゲラチン液化陰性の性状から推定して *Cl. tetanomorphum* (McIntosh, 1917., Bulloch, 1919) と

表3. *Cl. terani* Harvard A-47 原株と耐熱株のゲラチン液化および pH におよぼす培養容器の影響

使用株	培養容器	培養日数	ゲラチン液化	pH
原	ペトリ皿	0	-	7.10
		1	+	7.51
		3	+	7.48
		5	+	7.50
		7	+	7.28
株	中試験管	0	-	7.10
		1	+	7.10
		3	+	7.20
		5	+	7.43
		7	+	7.33
耐	ペトリ皿	0	-	7.03
		1	-	7.40
		3	-	7.45
		5	+	7.50
		7	+	7.50
熱	中試験管	0	-	7.03
		1	-	7.03
		3	-	7.10
		5	-	7.09
		7	-	7.05

表4. *Cl. tetani* Harvard A-47 原株および耐熱株の生物性状の比較

使用株	反応	グルコース	マルトース	ラクトース	シニークロース	サリシン	ガラクトース	フラクトース	キシロース	マンノース	マンニット	アラビノース	グリセリン	インドール産生	硝酸塩還元	凝固卵白液化	ゲラチン液化
原株		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
耐熱株		+	-	-	-	-	±	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

似ているので Pasteur 研究所より Cl. tetanomorphum 2株を得て検討を加えた。特に分解に関係する糖として、グルコース、キシロース、ガラクトース、グリセリンの他にマルトースを加えた。(Bergey's Manual には Cl. tetanomorphum がマルトース分解陽性と記載される)。即ちこれらの糖を含む生物性状用培地に各種菌株を接種し、37°C で嫌気ビンの中で培養し、48時間および7日目の O. D. (発育量) と培地 pH を測定した。この際、嫌気ビンを使用したのは、培地中に侵入する O₂ の影響をのぞき糖利用を正確に知るためである。

表6に見るごとく、Cl. tetanomorphum は2株ともグルコースとガラクトースによってその増殖が促進されるが、キシロースとグリセリンは1株のみによって利用される成績を示した。マルトースは両者の発育に対して何等影響をあたえなかった。これらの糖に対して、教室保存のグルコース分解陽性の Cl. tetani 有毒株 (1110, 1113, 1303, 1131—分離当初の毒性はそれぞれ 0, 0.5×10¹, 0.5×10¹, 0 MLD/ml, 真田のプロテオーゼペプトン培地で4日間培養, 1962) は、グルコースから酸を作り、発育の促進がみられたが、ガラクトースは2株、グリセリンは1株に発育促進を

示した。

しかし強毒株の 6101, 6114, Harvard A-47 および陸3ではグルコースによる発育促進は2株で、他のどの糖も発育とは関係がなかった。

これらの事から Cl. tetani の中にはキシロース、ガラクトースおよびグリセリンを分解する菌株の存在する可能性のあることがわかった。この見地からいえば Pasteur 研究所の Cl. tetanomorphum の生物性状は Cl. tetani のその変異域の中に入り、Cl. tetani 無毒株と区別し難いものと思われた。

考 察

多くの代表的な成書や分類学の書¹⁾⁻⁷⁾は、Cl. tetani はグルコースを利用出来ないと記載しているが、Borsma ら⁸⁾, Lerner ら⁹⁾, Martinez ら¹⁰⁾, Prévot¹¹⁾はグルコースを利用すると述べている。

著者は、生物性状試験においてグルコース分解が陰性であっても、実際にグルコース消費を測定してみると、Cl. tetani がグルコースを利用することを証明した。又、耐熱株を選ぶことによって、その株は生物性状試験の上でも培地中にグルコースの分解産物としての酸を証明し得るにいたることがわかった。

表5. Cl. tetani Harvard A-47 原株と耐熱株の発育におよぼす各種糖の影響

使用株	培養時間	判定法	グルコース	マルトース	ラクトース	シュクロース	ガラクトース	フラクトース	キシロース	マンニット	アラビノース	対照
原株	1週間	定性反応*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	培養	発育量**	0.64	0.42	0.41	0.30	0.43	0.40	0.49	0.38	0.43	0.37
株	2週間	定性反応	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	培養	発育量	0.85	0.54	0.47	0.54	0.54	0.56	0.58	0.46	0.54	0.56
耐熱株	1週間	定性反応	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	培養	発育量	1.50	1.25	1.00	1.05	1.25	1.05	1.30	1.00	1.00	1.15
株	2週間	定性反応	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	培養	発育量	1.50	1.25	1.30	1.10	1.30	1.15	1.40	1.15	1.25	1.25

* 生物性状試験法の反応

** O. D.

Cl. tetani Harvard A-47 の原株と耐熱株の生物性状における変異は、加熱によって一挙に多数の変異が現われるように見えるが genetic mutation というより、むしろ加熱によって選ばれてきた菌と原株の生存能力の差（グルコース分解酵素の安定性と培地 pH のアルカリ化の差となって現われるが）による phenotypic variation と解釈すべきものと思われた。

菌の死滅がなぜ培地 pH をアルカリ化しやすいかについてはまだ検討していないが、菌の増殖が停止したとき、強いアルカリ変性が起こることは、今泉ら²³⁾が、*Cl. histolyticum* の実験で証明しており、これは clostridia のほとんどの菌種に起る現象で一般細菌に共通の現象と思われる。

Cl. tetani のゲラチン液化に関しては陽性と記載しているものが多いが¹¹⁾⁻⁷⁾、Kendal ら²⁴⁾はゲラチン液化陰性と報告し、Fildes²⁵⁾は58株中5株にゲラチン液化陰性の *Cl. tetani* が存在すると述べ、真田¹²⁾

¹⁶⁾はゲラチン液化の多様性について報告した。

Cl. tetanomorphum のゲラチン液化については、Bergey's Manual では陰性と記載しているが、Hall²⁶⁾は彼の使用した株はゲラチン液化が陽性であったと報告し、Narayan²⁷⁾はゲラチン液化は variable と記載している。

このように研究者各人の意見が相違しているが、これは孢子形成能や耐熱性と生物性状の間に重要な関連があることが知られており、玉井²⁸⁾は *Cl. sordellii* の孢子形成の強くなったものは *Cl. bifermentans* と一致すると述べ、更に中川²⁹⁾は耐熱性の強い *Cl. welchii* の多くはサリシン分解陽性であったが、この株が耐熱性を失なうと同時にサリシン分解陰性となったと述べた。これは一面からいって、これらの変異は菌の生存力（菌の死滅）との関係において説明される可能性が考えられる。

Cl. tetanomorphum の生物性状は、多くはグルコースおよびマルトースを分解し酸を産生しゲラチン液

表 6-1. *Cl. tetani* と *Cl. tetanomorphum* の発育におよぼす各種糖の影響 (1)

使用株	使用糖	48 時間 培養		7 日間 培養	
		発育量 (O. D.)	pH	発育量 (O. D.)	pH
<i>Cl. tetanomorphum</i> 1772 C	グルコース	0.64	5.90	0.63	5.50
	マルトース	0.32	6.85	0.27	7.00
	キシロース	0.28	6.80	0.35	7.00
	ガラクトース	0.47	6.40	0.42	6.90
	グリセリン	0.25	6.75	0.20	7.00
	対 照	0.28	6.95	0.23	7.10
<i>Cl. tetani</i> 1110	グルコース	0.35	6.20	0.58	6.10
	マルトース	0.27	6.80	0.28	7.25
	キシロース	0.26	6.80	0.19	7.30
	ガラクトース	0.34	6.75	0.30	7.15
	グリセリン	0.39	6.75	0.42	7.20
	対 照	0.28	6.90	0.29	7.30
<i>Cl. tetani</i> 1113	グルコース	0.75	6.30	0.87	5.80
	マルトース	0.30	6.90	0.32	7.20
	キシロース	0.25	6.90	0.26	7.05
	ガラクトース	0.38	6.90	0.47	6.90
	グリセリン	0.41	6.80	0.38	7.05
	対 照	0.33	7.00	0.35	7.37

化陰性と記載しているが、Pasteur 研究由来の Cl. tetanomorphum はグルコースから酸を産生するがマルトース分解陰性でゲラチン液化は陽性（極めて弱く2%ゲラチン培地ではじめて陽性となる）又は陰性であり、更に検討すべき問題である。

今回は、インドール産生についての変異については検討しなかったが、Reed³⁰⁾によればトリプトファンからインドールを産生するが、この産生されたインドールを更に分解してしまうことを報告しており、Narayan²⁷⁾も同様に記載している。真田¹²⁾はすでにイ

ンドール産生は使用するペプトンや培養時間によって差が生じることを報告しているので、Cl. tetani Harvard A-47 の原株と耐熱株のインドール産生の変異も糖分解やゲラチン液化の変異と同様に説明出来ると考えられる。

結 論

Cl. tetani Harvard A-47 の原株がグルコース分解陰性なのに対して、その耐熱株のグルコース分解が陽性となるのは、後者がよく発育し生存力がよいこ

表6-2. Cl. tetani と Cl. tetanomorphum の発育におよぼす各種糖の影響 (2)

使用株	使用糖	発育量 (O. D.)		使用株	使用糖	発育量 (O. D.)	
		48時間培養	7日間培養			48時間培養	7日間培養
Cl. tetanomorphum CLA	グルコース	0.44	NT	Cl. tetani 6101	グルコース	0.41	0.27
	マルトース	0.29			マルトース	0.27	0.19
	キシロース	0.52			キシロース	0.20	0.22
	ガラクトース	0.39			ガラクトース	0.30	0.26
	グリセリン	0.44			グリセリン	0.34	0.27
	対 照	0.24			対 照	0.28	0.19
Cl. tetani 1303	グルコース	0.40	0.52	Cl. tetani 6114	グルコース	0.16	0.15
	マルトース	0.26	0.27		マルトース	0.17	0.17
	キシロース	0.23	0.24		キシロース	0.15	0.14
	ガラクトース	0.27	0.28		ガラクトース	0.16	0.16
	グリセリン	0.30	0.34		グリセリン	0.20	0.20
	対 照	0.24	0.25		対 照	0.18	0.17
Cl. tetani 1131	グルコース	0.49	0.27	Cl. tetani 陸3	グルコース	0.25	0.18
	マルトース	0.22	0.22		マルトース	0.25	0.26
	キシロース	0.19	0.22		キシロース	0.34	0.27
	ガラクトース	0.21	0.24		ガラクトース	0.27	0.20
	グリセリン	0.22	0.19		グリセリン	0.22	0.28
	対 照	0.22	0.21		対 照	0.26	0.27
Cl. tetani Harvard A-47	グルコース	0.49	0.72				
	マルトース	0.21	0.22				
	キシロース	0.17	0.18				
	ガラクトース	0.24	0.24				
	グリセリン	0.26	0.27				
	対 照	0.23	0.22				

NT: 測定しなかった。

と、両者共グルコース分解酵素をもっているが後者の方がより安定であること、前者の方が培地をアルカリ化しやすいことによるもので、これらはすべて菌の死滅と関係していることがわかった。

グルコース以外の糖分解およびゲラチン液化に対する変異も、グルコース分解の変異と同様、菌の死滅と関係しているものと思われる。したがって生物性状試験における原株と耐熱株のグルコース分解、ゲラチン液化その他の糖分解の変異は、これらの酵素を支配する loci の変化というよりむしろ菌の regulatory function によるものと推定したが、これは孢子を形成する力であると考ええる。

Cl. tetani Harvard A-47 の耐熱株は無毒であるばかりでなく、形態、生物性状の上から Pasteur 研究所由来の Cl. tetanomorphum と区別出来ない性状を示した。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導御校閲を戴いた西田教授、御助力を得た微生物学教室中村信一氏および教室員各位に深く感謝の意を表します。また菌株を分与下さった Pasteur 研究所の A. R. Prevot 博士に感謝致します。

文 献

- 1) Smith, L. D. S. : Introduction to the Pathogenic Anaerobes, 1st ed., p. 93, Chicago, University of Chicago Press, 1955.
- 2) Willis, A. T. : Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine, 2nd ed., p. 70, London, Butterworths, 1964.
- 3) Zeissler, J. : in Kolle, Kraus und Uhlenhuth's Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen, 3 Aufl., Bd. 10, s. 122, Jena, Gustav Fischer, 1930.
- 4) Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., p. 672, Baltimore, Williams & Wilkins 1957.
- 5) Wilson, G. S. & Miles, A. A. : Topley and Wilson's Principle of Bacteriology and Immunity, 5th ed., p. 1080, London, Edward Arnold 1964.
- 6) Sterne, M. & van Heyningen, W. E. : in R. J. Dubos and J. G. Hirsch (ed.) Bacterial and Mycotic Infections of Man, 4th ed., p. 545, Philadelphia, J. B. Lippincott, 1965.
- 7) Kolle, W. & Hetch, H. : Experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten, 11 Aufl., s. 301, München-Berlin, Urban & Schwarzenberg, 1952.
- 8) Boorsma, H. J., Prévot, A. R. & Veillon, R. : C. R. Soc. Biol. (Paris), 131, 1137 (1936).
- 9) Lerner, E. M. & Pickett, M. J. : Arch. Biochem., 8, 183 (1945).
- 10) Martinez, R. J. & Rittenberg, S. C. : J. Bact., 77, 156 (1959).
- 11) Prévot, A. R. : Manual de Classification et de Détermination des Bactéries Anaérobies, 3e éd., p. 250, Paris, Masson, 1957.
- 12) 真田一郎 : 十全医会誌, 70, 612 (1964).
- 13) McIntosh, J., Bulloch, W. & Fildes, P. : Med. Res. Council Spec. Rep., No. 12, 11 and 32 (1917).
- 14) Bulloch, W., Bulloch, W. E., Douglas, S. R., Henry, H., McIntosh, J., O'Brien, R. A., Robertson, M. & Wolf, C. G. L. : Med. Res. Council Spec. Rep., No. 39, 41 (1919).
- 15) 真田一郎 : 十全医会誌, 71, 7 (1965).
- 16) 真田一郎 : 十全医会誌, 73, 335 (1966).
- 17) Robertson, M. : J. Path. Bact., 20, 327 (1915-16).
- 18) 真田一郎 : 医学と生物学, 64, 174 (1962).
- 19) 伝染病研究所学友会 : 細菌学実習提要, 第5版, 82頁, 東京, 丸善, 1958.
- 20) Hoskins, J. K. : Pub. Health Rep., 49, 393 (1934).
- 21) Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F. : Manometric techniques and Tissue Metabolism, 2nd ed. p. 1, Minneapolis, Burgess Pub. CO., 1949.
- 22) 赤真清人・亀山昭一 : メディヤサークル, No. 56, 15 (1964).
- 23) 今泉昌明・西田尚紀 : 医学と生物学, 70, 41 (1964).
- 24) Kendal, A. I., Day, A. A. & Walker, A. W. : J. Infect. Dis., 30, 141 (1922).
- 25) Fildes, P. : Brit. J. Exp. Path. 6, 62 (1925).
- 26) Hall, I. C. : J. Infect. Dis., 30, 445 (1922).
- 27) Narayan, K. G. : Zbl. Bakt. (Orig.), 202, 212 (1967).
- 28) 玉井健三 : 十全医会誌, 70, 606 (1964).
- 29) 中川正明 : 十全医会誌, 投稿中, (1969).
- 30) Reed, R. W. : J. Bact., 44, 425 (1942).

Abstract

Cl. tetani Harvard A-47, when committed to heat-selection, gave rise to a sub-strain which was positive in glucose fermentatin. The manner in which the glucose-fermenting abilities of both strains differed was analysed. Viable cell counts, glucose-fermenting activities and cultural pH of both strains grown in VF broth were estimated.

Heat-resistant substrains exhibited much higher yields of viable cells as well as of growth than the parent strain. The difference in the cultural pH proved to be closely correlated with the viability of culture; this indicated that the failure of the parent strain to attack glucose was not due to the absence of glucose-fermenting activity but due to the higher yield of alkalinity which was caused by its rapidly dying cells.

Further investigations disclosed that differences in the fermentation of xylose and galactose as well as gelatinolysis were also caused by the difference in the viability between both strains.

As the heat-resistant strain of Harvard A-47 turned out to be positive in gelatinolysis and nontoxigenic, its correlation with *Cl. tetanomorphum* was analysed. The substrain proved to be indistinguishable in these respects from *Cl. tetanomorphum* 1772C & CLA, stock strains of Pasteur Institute, Paris.
