

Proteolytic clostridia の凝集反応

〔II〕 *Cl. bifermentans* 及び *Cl. sporogenes* の抗原分析

金沢大学医学部微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

経 田 政 人

(昭和42年12月1日受付)

Clostridia の免疫学的研究の1940年以前のは、McCoy の綜説¹⁾に詳しいので今ここに述べないが、之以後はこの方面の研究は著じるしく少くなっている様に見える。最近の研究としては、Mandia²⁾らの *Proteolytic Clostridia* に関する研究があり、彼らは *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum*, *Cl. botulinum*, 或いは *Cl. tetani* について血清型分類を行っている。又新しい方法として Agar gel diffusion³⁾や、螢光抗体法⁵⁾を利用しての抗原分析、或いは同定を行うものも発展してきているが、一般的には血清学的手技を *clostridia* の抗原分析、同定に用うることは、その不安定性のために信頼をおかれていない。著者らは血清学的検討を行なう上には、血清学的な手技の新旧を問題とする前に、この不安定性の原因が何であるかを明らかにしておくことが必須であると考える。そこでこの不安定性をもたらす原因として孢子形成能の獲得、或いは喪失が関係するのではないかと考え、その不安定性の本態解明のために本実験を志した。即ち前報⁶⁾で著者は、*Cl. bifermentans* と *Cl. sordellii* が同一 *species* に属すべきものであるに拘わらず、孢子形成能が異なっているばかりに生物学的性状の上でも免疫学的性状の上でも異なつて現われてくるにすぎぬと述べた。この面から本報では、*Cl. bifermentans* 及び *Cl. sporogenes* を用いて検討した成績について述べる。

実験材料及び実験方法

I. 使用菌株

Cl. bifermentans は前報⁶⁾において記載した No. 315, 317, 506, 302, 7031, 7037, 7039, SJ₂, SJ₃ の計9株を使用した。

Cl. sporogenes は10株を使用した。金沢市内及び、近郊の土壌より著者が分離、同定した株である。

コロニーの観察は、Zeissler 血液平板に37°C 24時間嫌氣的培養したもので行ない、生物学的性状は *Sterne*⁷⁾らや *Smith*⁸⁾ の記載により、*Cl. sporogenes* と一致し、*Willis* らの *Nagler* 反応⁹⁾もあわせ行なった。

II. 抗血清の作製法

前報の記載に従い *Cl. bifermentans* 8株の抗血清を作製した。

Cl. sporogenes については、Cooked meat broth に37°C 24時間培養後、1% glucose 加 cooked meat broth (50 ml スクリウド、キャップ付投薬ビン)に移植し、37°C 24時間培養後、その上清液を肉かすを混じらないよう注意して採集し、遠心(3000 r.p.m. 20分)した。その沈渣を滅菌生食水で洗浄し、遠心後、その沈渣に0.4% ホルマリン加生食水を加えて、一定の濃度に希釈し懸濁液とした。免疫法は *Mandia and Bruner*¹⁰⁾の方法に従った。即ち、約2.5~3.5 kg の家兎を使用し、上記の希釈液を0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, 2.0 ml, 各々4日間隔で家兎の耳静脈に注射した。最終回の注射後、5日目に試験採血を行ない、凝集価5000以上を示したので全採血を行なった。得られた血清を56°C 30分間不活性化し、マーズニン(1:50000)を加え、氷室(4°C)で保存した。

III. 交差凝集反応

前報⁶⁾で述べた方法に従った。

IV. 加熱耐性株の選択

各菌株を10% Cooked meat broth 37°C 24時間培養し、その菌液1 ml を100°C 10分、90°C 30分、或いは80°C 10分加熱し、この加熱菌液を Zeissler 平板に塗抹し、37°C 24時間嫌氣培養(無水炭酸ソーダ、ピロガロール法)後、生えてきたコロニーから得たものを加熱耐性株とした。この加熱耐性株を用いて1% glucose 加 10% cooked meat broth culture を用

Agglutination Reaction of Proteolytic Clostridia (II) Agglutination of *Cl. bifermentans* and *Cl. sporogenes*. Masato Tsuneda, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University.

いて抗原を作製した。

V. 吸収試験

吸収試験法は Robertson¹¹⁾, Henderson¹²⁾, Gun-
ninson¹³⁾, Mandia and Bruner¹⁰⁾, 或いは Walker¹⁴⁾
の方法に従って検討したが、充分な吸収を得ることが
できなかった。そこでスクリウド、キャップ付投薬
ビン (全容量 400 ml) に 10% (V/V) cooked meat
broth (1% (W/V) glucose 加) を作製し、これに
37°C 24時間培養後、遠心 (3000 r.p.m 20分) 集菌し
たものに生理的食塩水 3 ml を加え、均等化した菌液
を作製した。この菌液 1 ml に抗血清 1 ml を混じ、
よく振盪混和した後、50°C 2時間水浴槽に保った。
温浴中度々振盪を繰返した。反応後遠心 (3000 r.p.m
20分) し、その上清 1 ml を採り、更に菌液 1 ml を
加え、前回同様よく振盪した後、37°C 24時間反応さ
せた。反応後遠心 (3000 r.p.m 20分) し、その上清
液を吸収血清として使用した。従って吸収後の抗血清
の希釈は 1:4 のものである。

実験結果

I. *Cl. bifermentans* について

Cl. bifermentans No. 315, 317, 506, 302, 7031,
7037, 7039 の計 7 株で各々抗血清を作製し、これに
SJ₂, SJ₃ 菌株を加えて相互に交差凝集反応を行った。
その結果は、表 1 に示す如く *Cl. bifermentans* 相
互には凝集反応の上で血清型が存在すると思われる成
績を再び確認した。即ち、315, 317, SJ₂ 群, 506,
302, SJ₃ 群, 及び 7031, 7037, 7039 群にわけられ
た。これらの各群内の菌は相互に完全に交差吸収が
成立した。そこで著者は *Cl. bifermentans* と *Cl.*
sordellii の交差凝集反応の上で、菌株の孢子形成能
が重要な役割をもつという事実に基づき、これら *Cl.*
bifermentans の孢子形成能を測定したが、いずれも
従来の方法では区別することはできなかった。(すべ
ての菌株が 10⁸ 中 10⁸ 前後の孢子数を示した。) しか
し、これらの菌株を加熱し、(100°C 10分、或いは 90
°C 30分)、この中から熱に耐えて生えてくる菌株につ
いて検討すると、表 2 に示す如く、その殆んどは高い
凝集価を示すようになり、非加熱株の場合における血

表 1 *Cl. bifermentans* の交差凝集反応

抗血清	<i>C. bifermentans</i> の抗原								
	315.	317.	SJ ₂ .	506.	302.	SJ ₃ .	7031.	7037.	7039.
315	3*	3	3	1	1	1	2	1	3
317	3	3	3	1	1	1	2	1	3
506	1	1	1	3	2	3	1	1	3
302	1	1	1	3	3	3	2	1	3
7031	1	1	1	1	1	1	3	3	3
7037	1	1	1	1	1	1	3	3	3
7039	1	1	1	1	1	1	3	3	3

* 凝集価 1; 20~80, 2; 160~640, 3; 1280~5120.

表 2 *Cl. bifermentans* 加熱耐性株の交差凝集反応

抗血清	<i>Cl. bifermentans</i> 加熱耐性株の抗原								
	315H.*	317H.	SJ ₂ H.	506H.	302H.	SJ ₃ H.	7031H.	7037H.	7039H.
315	3*	3	3	2	2	3	3	3	3
317	3	3	3	2	2	3	3	3	3
506	2	1	3	3	3	3	3	3	3
302	2	1	3	3	3	3	3	3	3
7031	2	2	2	3	3	3	3	3	3
7037	2	2	2	3	3	3	3	3	3
7039	2	2	2	3	3	3	3	3	3

* 凝集価 1; 20~80, 2; 160~640, 3; 1280~5120

** H = 原株の加熱耐性株.

清型の存在は消失した。このことは clostridia において血清学的な差異が孢子形成能によって支配されていることを暗示した。これを一層明白にするために加熱前の菌株の交差吸収試験を行ない、型決定後、加熱耐性菌株について抗原分析を行なった。この成績は表3に示した。先ず7031菌株で吸収した場合、315, 317, SJ₂群と506, 302, SJ₃群は態度を異にし、それぞれ吸収できない因子を残した。この因子をII, IIIと定めた。逆に7031群の血清を315群、或いは506群で吸収すると完全に消失した。従ってこの相違をもとにして Cl. bifermentans の抗原を次の3因子に分けた。

I: Cl. bifermentans 7031 のもつ抗原をIとする。

II: Cl. bifermentans 315, 317 の抗血清を Cl. bifermentans 7031 で吸収した残余の抗体に

反応する抗原。

III: Cl. bifermentans 506, 302 の抗血清を Cl. bifermentans 7031 で吸収した残余の抗体に反応する抗原。

以上のような3因子に分けると、使用した Cl. bifermentans の抗原構造は表3, 4の如くなる。

次に加熱耐性株については、前述のように殆んど高い凝集価を示し、交差凝集反応の上では差をみなかったが、これを吸収試験の上でしらべてみると、その殆んど菌株は7031菌株で吸収され、これらの菌株の抗原構造を分析すると表3, 4の如くなる。即ち、その加熱耐性株については、315, 317菌株のみは、なおII抗原の存在を示すが、SJ₂のII抗原は失われてI抗原のみとなり、506, 302, SJ₃群のIII抗原はすべて失われてI抗原のみとなることが判明した。

II, Cl. sporogenes について

表 3

i) Cl. bifermentans の交差吸収試験

吸 収 血 清		Cl. bifermentans の抗原								
抗 血 清	吸収抗原	315.	317.	SJ ₂ .	506.	302.	SJ ₃ .	7031.	7037.	7039.
315, 317	7031	640*	640	640	—	—	—	—	—	—
506, 302	7031	—	—	—	640	640	640	—	—	—
7031, 7037, 7039	315 506	—	—	—	—	—	—	—	—	—

ii) Cl. bifermentans 加熱耐性株と吸収血清の交差凝集反応

吸 収 血 清		Cl. bifermentans 加熱耐性株の抗原								
抗 血 清	吸収抗原	315H.	317H.	SJ ₂ H.	506H.	302H.	SJ ₃ H.	7031H.	7037H.	7039H.
3 1 5	7031	640	640	—	—	—	—	—	—	—
5 0 6	7031	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 凝集価

表4 Cl. bifermentans 非加熱株及び加熱耐性株の抗原構造

Cl. bifermentans No.	Cl. bifermentans 原株の抗原構造	Cl. bifermentans 加熱耐性株の抗原構造	備考 加熱条件
3 1 5	I, II	I, II	100°C 10分
3 1 7	I, II	I, II	100°C 10分
SJ ₂	I, II	I	100°C 10分
5 0 6	I, III	I	100°C 10分
3 0 2	I, III	I	100°C 10分
SJ ₃	I, III	I	100°C 10分
7 0 3 1	I	I	90°C 30分
7 0 3 7	I	I	90°C 30分
7 0 3 9	I	I	90°C 30分

Cl. sporogenes No. 50301, 50101, 80062, 10071, 80052, 80022, 10051, 80008, 80071, 30122計10菌株の抗血清を作製し、相互の交差凝集反応を行なった。その結果、免疫学的に幾分異なる菌が存在することを認めた。そこで著者は、*Cl. bifementans* 同様、これら各々の菌株の加熱耐性株 (100°C 10分, 90°C 30分, 或いは 80°C 10分) を選択し、その耐熱性菌株を用いて抗原を作製し、前記の *Cl. sporogenes* 抗血清と交差凝集反応を行なうと、その殆んどは相互に極めて強い凝集価を示し、加熱前の幾つかの型の存在が否定され、同一の血清学的性質をもつたことが予想された。この成績は表5, 6に示した。このような現象については加熱耐性株を選ぶことによって単純化されるという前の実験から予想されたので、前と同様

Cl. sporogenes についても行なった。即ち、加熱前の菌株相互の吸収試験を繰返すと、50103, 50101, 80062, 10071, 80052 は相互に全く吸収され、全く等しい抗原構造をもつ1群であることが判明した。一方において、80022, 10051 群, 80008, 80071 の1群、及び 30122 の異なった抗原構造をもった菌株のあることを認知した。そこで著者は代表株として 80022, 80071, 30122を選び、再度吸収試験を行ない抗原分析を試みた。その成績は表7, 8に示すように、*Cl. sporogenes* を4つの抗原構造をもつものに分けることができた。即ち、次の4型である。

I: *Cl. sporogenes* のすべてがもつ共通抗原。
(30122 に共通する抗原)

II: 80022抗血清を30122で吸収した抗血清に対して

表5 *Cl. sporogenes* の交差凝集反応

抗血清	<i>Cl. sporogenes</i> の抗原									
	50103.	50101.	80062.	10071.	80052.	80022.	10051.	80008.	80071.	30122.
50103	3*	3	3	3	3	3	3	3	3	3
50101	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
80062	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2
10071	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
80052	3	3	3	3	3	2	2	3	2	2
80022	3	3	2	3	2	3	3	2	2	1
10051	3	3	2	3	2	3	3	2	2	1
80008	3	3	3	2	3	2	2	3	3	1
80071	3	3	2	2	2	2	2	3	3	1
30122	3	2	2	2	2	1	1	1	1	3

* 凝集価, 1; 20~80, 2; 160~640, 3; 1280~5120

表6 *Cl. sporogenes* 加熱耐性株の交差凝集反応

抗血清	<i>C. sporogenes</i> 加熱耐性株の抗原									
	50103H.	50101H.	80062H.	10071H.	80052H.	80022H.	10051H.	80008H.	80071H.	30122H.
50103	3*	3	3	3	3	3	3	3	3	3
50101	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
80062	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
10071	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2
80052	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3
80022	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
10051	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
80008	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
80071	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
30122	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3

* 凝集価, 2; 160~640, 3; 1280~5120

** H: 加熱耐性株

反応する抗原.

Ⅲ: 80071抗血清を30122で吸収した抗血清に対して
反応する抗原.

Ⅳ: 30122抗血清を80022で吸収した抗血清に対して
反応する抗原.

以上4つの抗原構造を明らかにして、これらの因子血清で、加熱耐性株の抗原分析を行なったところ、表7, 8に示す如く、Ⅱ, Ⅲ, Ⅳの抗原は失われて、すべて共通のⅠ抗原にかえる傾向を示した。但し80022菌株にはⅡ抗原、80071菌株にはⅢ抗原を依然として認めた。

考 察

Clostridia の凝集反応については、古くから Hall¹⁵⁾や McCoy and McClung¹⁶⁾ら、数多くの学者により研究がなされているが、分類、同定の上では余り

重要視されていない。最近、Mandia⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾らは蛋白分解性の clostridia である *Cl. sporogenes*, *Cl. histolyticum*, *Cl. tetani* 等についての抗原分析を行ない、その抗原構造を明らかにすると共に、多くの型を設定した。Oakley¹⁹⁾は Mandia らの研究は clostridia における分類、診断の点で進歩のめざましい成績であると述べた。しかし従来から clostridia の凝集反応が何故に価値を持たないかを考慮するに、その抗原構造が不安定であること、及び、その血清学的分類が毒素原性と一致しない点にあると思われる。この2点を解決しない限り Mandia らの分類もなお且、従来の報告と差はないと考えられる。著者らが解決を志したのは当然如上の2つの点についてであり、この意味で前報⁶⁾において、*Cl. bifermentans* と *Cl. sordellii* の血清学的差異点は加熱耐性株を選択することにより消失すると述べたことも、*Cl. bifer-*

表 7

i) *Cl. sporogenes* 原株と吸収血清の交差凝集反応

吸 収 血 清		C. sporogenes の抗原									
抗血清	吸収抗原	50103.	50101.	80062.	10071.	80052.	80022.	10051.	80008.	80071.	30122
80022	30122	—	—	—	—	—	5120	5120	—	—	—
80071	30122	—	—	—	—	—	—	—	5120	5120	—
30122	80022	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5120

ii) *Cl. sporogenes* 加熱耐性株と吸収血清の交差凝集反応

吸 収 血 清		Cl. sporogenes 加熱耐性株の抗原									
抗血清	吸収抗原	50103H.	50101H.	80062H.	10071H.	80052H.	80022H.	10051H.	80008H.	80071H.	30122H
80022	30122	—	—	—	—	—	5120	—	—	—	—
80071	30122	—	—	—	—	—	—	—	—	5120	—
30122	80022	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表 8 *Cl. sporogenes* 原株及び加熱耐性株の抗原構造

Cl. sporogenes No.	Cl. sporogenes 原株の抗原構造	Cl. sporogenes 加熱耐性株の抗原構造	備 考 加熱条件
50103	I	I	100°C 10分
50101	I	I	90°C 30分
80062	I	I	90°C 30分
10071	I	I	90°C 30分
80052	I	I	100°C 10分
80022	I, II	I, II	90°C 30分
10051	I, II	I	90°C 30分
80008	I, III	I	100°C 10分
80071	I, III	I, III	90°C 30分
30122	I, IV	I	80°C 10分

mentans 及び *Cl. sporogenes* の抗原分析を行ない、両者共にその血清型が意義のうすいものであることを示した。clostridia の凝集反応の不安定性は孢子形成能に原因するところ大であろうことが判明され、また、孢子形成の強い菌が選ばれることによって凝集反応が単一化するとすれば、長い間の放置によってもこのようなことが起る可能性があり、放置によって凝集反応が色々と変化することについても理解しうることになる。

自然界では、たえず孢子形成株への選択または、逆にこの変性作用が働き、この意味では Gram 陰性菌のように、型を決定することに無理があると思われる。しかしながら最近著者の同僚ら²⁰⁾²¹⁾²²⁾が、clostridia の或る species では毒素原性が孢子形成能により強く支配されていることを述べているので、このような菌では免疫の変化そのものが孢子形成能に一致して変化する限り、免疫反応と毒素原性が孢子を媒介としてかなり整一な関係にあることが予想される。

結 論

Cl. bifermentans 9 株を用いて交差凝集反応を行ない、いくつかの血清型の存在するかの如き成績を得たが、個々の菌株の加熱耐性株を選ぶと、相互によく凝集し、且つ、吸収試験で、いくつかの血清型の存在は孢子形成能の差にすぎないことが判明した。

同様に *Cl. sporogenes* 10 株を用いて交差凝集反応を行ない、*Cl. bifermentans* 同様、いくつかの血清型の存在を認めたが、これも加熱耐性株を選ぶと殆んど同一の血清型となった。これらの事実により、著者らは clostridia の各 species の血清型は孢子形成能によって強く支配されており、血清型の設定は意義のうすいものと考えられる。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに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。また絶えず御助力、御支援下さった細菌学教室の玉井健三博士並びに諸先生方に深く感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) McCoy, E. & McClung, L. S. : *Bacteriol. Rev.* 3, 47 (1939).
- 2) Mandia, J. W. : *J. Infect. Dis.*, 97, 66 (1955).
- 3) Ellner, P. D. & Green, S. S. : *J. Bact.*, 83, 284 (1962).
- 4) Ellner, P. D. & Green, S. S. : *J. Bact.* 86, 1084 (1963).
- 5) Batty, I. & Walker, P. D. : *J. appl. Bact.*, 28, 112 (1965).
- 6) 経田政人 : 十全医会誌, 印刷中.
- 7) Sterne, M. & Van Heyninigen, W. E. : *Bacterial and Mycotic Infections of Man* (edited by R. Dubos) 3rd ed., p 343, Lippincott Co., Philadelphia (1958).
- 8) Smith, L. DS. : *Introduction to the pathogenic Anaerobes*, 1st ed. p 172, The University of Chicago Press, Chicago (1954).
- 9) Willis, A. T. & Hobbs, G. : *J. Path. Bact.*, 75, 299 (1954).
- 10) Mandia, J. W. & Bruner, D. W. : *J. Immunol.*, 66, 497 (1951).
- 11) Robertson, M. : *J. Path. Bact.*, 23, 153 (1919).
- 12) Henderson, D. W. : *Brit J. Exp. Path.*, 16, 393 (1935).
- 13) Gunninson, J. B. : *J. Immunol.*, 38, 63 (1937).
- 14) Walker, P. D. : *J. Path. Bact.*, 85, 41 (1963).
- 15) Hall, I. C. & Stark, N. : *J. Infect. Dis.*, 33, 240 (1928).
- 16) McCoy, E. & McClung, L. S. : *J. Bact.*, 31, 557 (1936).
- 17) Mandia, J. W. : *J. Immunol.*, 67, 49 (1951).
- 18) Mandia, J. W. : *J. Infect. Dis.*, 90, 48 (1952).
- 19) Oakley, C. L. : *Bull. Off. int. Epizoot.*, 59, 1411 (1963).
- 20) 石田勝一 : 十全医会誌, 69, 67 (1963).
- 21) 中川原儀三 : 十全医会誌, 70, 2 (1964).
- 22) 真田一郎 : 十全医会誌, 71, 7 (1965).

A b s t r a c t

Results of cross-agglutination tests by the use of 9 strains of *Cl. bifermentans* suggested that there were several serotypes among the strains used, but that these strains, when committed to heat selection and recovered from the heating, turned out to lose their serotype distinction into the same serotype. This was demonstrated to be true of 10 strains of *Cl. sporogenes* examined. These findings implied that the clostridial serotypes were closely associated with sporulating potency and that establishment of serotypes was not reliable because of the variable character of sporulating ability.