

## Cl. welchii PB6K の substrains 内での 毒素原性と孢子形成能との関係

金沢大学医学部微生物学教室(主任 西田尚紀教授)

石丸 幹 夫

(昭和39年10月2日受付)

最近、石田ら<sup>1)~3)</sup>は土壤材料から *Cl. welchii* を分離する際、加熱をませばます程、毒性の弱い株が分離されること、或いはまた毒性株のすべては耐熱性を欠き、耐熱性の株のすべてはまた毒性を欠くと述べた。この耐熱性(100°C 10分)は当然細菌の孢子形成を意味するから、この菌の toxigenesis がこの菌の孢子形成の生理機構と密接な関係をもつことが予想された。石田は諸種の加熱温度を用いて多数の株を分離し、如上の推定を行なつたが、同一株の substrains について toxigenesis と孢子形成能を検討することによつて、この関係は一層明らかとなると思へたので本邦ではこれについて検討した。

### 実験方法

使用菌株 PB6K は予研細菌第2部村田良介氏より得たものであり、WF1603 は当研究室によつて糞便より分離されたものである。

孢子形成能の測定は石田<sup>3)</sup>らが先に報告した方法に従つた。即ち cooked meat broth に24時間前培養後、更に48時間 cooked meat broth で本培養し、ここから小試験管に0.5ないし 1.0ml をとり、80°C 10分或いは 90°C 10分加熱した後、直ちに冷却し、生残菌数を most provable number method (MPN 法)によつて測定した。この時、菌数計算用としては 1% lactose 加 cooked meat broth を用いた。

$\alpha$ -toxin の測定は Evans の法<sup>4)</sup>にしたがい、毒素 1ml を中和するに要する antitoxin の titer であらわした。この抗血清は千葉血清の永井吉郎氏の好意により、試験用血清(1ml あたり300単位)として分与を受けた。その1単位は  $\alpha$ -toxin 産生用培地<sup>5)</sup>からの毒素 57LD<sub>50</sub> を中和するから表記の単位より実際の単位は、やや低いと考えられる。しかし、以下の報告は表記そのままの単位を用いることとした。 $\alpha$ -toxin 測

定の際、用いた卵黄溶液は Van Heyningen<sup>6)</sup>によつた。

$\theta$ -toxin の測定は 0.2ml の 1.5% 羊血球浮游液の 100% haemolysis を生ずる培養濾液の最小量(最高稀釈の end point)を求めることとなされた。用いた毒素液は前もつて M/5 thioglycollate 0.1ml+培養濾液 0.4ml、これに生理食塩水 0.3ml をくわえたものを 37°C の水槽で20分ひたし、 $\theta$ -toxin を活性化したものを用いた。その術式は、0.2ml の段階稀釈培養濾液、0.3ml の M/5 phosphate buffer (pH 6.5)、0.1ml の M/20 thioglycollate これに 0.2ml ずつの 1.5%羊血球浮游液をくわえて、37°C の水槽で1時間の後、1夜室温に放置し、翌日判定した。測定に用いる小試験管の口径は 7~8mm で一定にすべきである。

$\kappa$ -toxin (collagenase) の測定は Azocoll 法<sup>7)</sup>を使用した。Azocoll の懸濁液(1% Manucol-British Drug House 製—100ml 中 Azocoll 330mg 含む)の 0.5ml、段階稀釈液の培養濾液 0.5ml、これに M/15 phosphate buffer (pH 6.8) を 0.5ml くわえ、更にトルエンを 3~4 滴くわえて表面を覆い、雑菌の混入を防ぎながら 35~36°C の水槽に1夜置き、Azocoll から赤い azo 色素の遊離されるのを観察測定した。

$\mu$ -toxin (hyaluronidase) の測定は ACRA-test<sup>8)</sup>法で測定された。牛の synovial fluid は採取してから氷室に静置し、清澄になつた上清を小試験管に 1ml ずつ分注、冷蔵庫(-25°C)に保管した。必要に応じてそれを取り出して使用した。

$\alpha$ -toxin 産生用培地<sup>5)</sup>は 3% 亜鉛ペプトン 加の cooked meat broth に 1% フラクトースを菌移植前にくわえ、容器は中試験管を用いた。培用は15時間培養の菌を 1%にくわえ、7時間 37°C で行なつた。 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\kappa$ -toxin の測定には、この培養液を 3000r.p.m. 20

Correlation between Toxigenicity and Sporulating Potency in the Substrains of a *Cl. Welchii* Strain, PB6K. Mikio Ishimaru, Department of Microbiology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

分間遠心し、その上清液を用いた。この培地は  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ -toxin の産生には都合よいが、 $\theta$ -toxin (oxygen labile haemolysin) の産生には全く適せず、この目的には pH 8.0 に調整した普通ブイヨンにフラクトース0.25%をにくわえて培養した。もちろん培養に用いるすべての培地は菌移植直前15~20分煮沸した後、急冷し使用した。

### 実験結果

#### —強毒株から PB6K 無毒株の選択—

耐熱性と毒素原性との関係を見るため、PB6K 株の培養液を諸種の条件下で加熱し、加熱に耐えて発育して来た substrains をえらび、その毒素原性を検した。原料を cooked meat broth に48時間培養後、肉をまじえぬようにしてその培養液を小試験管に 0.5ml うつし、これを 80°C 10分加熱して直ちに別の cooked meat broth にうつし、熱に耐えて発育して来たものに対して PB6K-NO. 2 と名づけた（なお加熱したあとで Zeissler 平板培地上でコロニー選択を行なっていない。したがって、80°C 10分に耐えたものを培養しただけで、この中には更に高温に耐えるものも含まれる可能性はある。以下、何度何分に耐えた株という時は如上と同様な意味をもつ）。

この株を更に同上の培地で 48時間培養後 0.5ml を小試験管にとり、更に 100°C 10分加熱した所、これに耐えて発育してくるのを認め、これを PB6K-NO. 3 と名づけた。この際原株の培養を同様に 100°C 10分加熱しても、決して耐性の菌株をうる事ができなかった。これらの菌の毒素原性は原株、NO. 2, NO. 3 の順で 9.3~0.8, 0.8~0.2 となり NO. 3 はこの後長期保存の結果、現在 (1964) は安定した弱毒株 (0.1  $\alpha$ -toxin 値を示しつつある) として保存されている。この原株に対する耐性株の他の毒素産生能及び孢子形成能を表 1 に示した。

孢子形成能の差は今まで我々の同僚がたびたび他の clostridia で説明したものであるが、この数値の意義

を示すため、念のため次の如き実験を行なつた。即ち原株と NO. 3 について、各々の孢子形成能をしらべた。それらの菌株を Zeissler 平板にひらき、各々から 9 個のコロニーをとり 9 株ずつの substrains を確立し、その孢子形成能を測定したが (表 2)、個々の substrains の殆んどは原株の孢子形成能に近いものから成立していることが判つた。以上の結果から耐熱性をえらぶことによつて無毒株をえられることが判つた。

#### —コロニー選択による種々の毒素原性株の選択—

これまで多くの研究者は強毒株をうるために絶えず

表 2 PB6K 原株と PB6K-No. 3 の孢子形成能

使用菌株	加熱前の生菌数/ml	加熱後の生菌数/ml (90°C 10分)
PB6K 原株	$1.7 \times 10^7$	0
substrain 1	$3.3 \times 10^7$	0
NOs. 2	$4.9 \times 10^7$	0
3	$1.1 \times 10^7$	0
4	$2.3 \times 10^7$	0
5	$0.8 \times 10^7$	0
6	$1.3 \times 10^7$	0
7	$2.3 \times 10^7$	0
8	$3.3 \times 10^7$	0
9	$2.2 \times 10^7$	0
PB6K-No. 3	$2.2 \times 10^7$	$8 \times 10^0$
substrain 1	$5.4 \times 10^7$	$2 \times 10^0$
NOs. 2	$0.8 \times 10^7$	$8 \times 10^0$
3	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^1$
4	$3.5 \times 10^7$	$2 \times 10^0$
5	$1.7 \times 10^7$	$3.3 \times 10^1$
6	$1.1 \times 10^7$	0
7	$3.5 \times 10^7$	0
8	$2.4 \times 10^7$	$1.7 \times 10^1$
9	$1.7 \times 10^7$	0

表 1 PB6K 原株とその耐熱性株の各種毒産生能と孢子形成能

菌 株	toxins				孢 子 形 成 能	
	$\alpha$ ( $\alpha$ -toxin 値/ml)	K (I.D.)*	$\theta$ (I.D.)*	$\mu$ (I.D.)*	加熱前の生菌数/ml	加熱後の生菌数/ml (90°C 10分)
PB6K 原株	9	8	1024	50	$2.4 \times 10^8$	0
PB6K-No. 3	0.2-0.8	8	256	5	$3.5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^1$

\*I.D. Indicating dosis 単位のとおり方については Nishida et al.: Japan J. Microbiol. 6: 33 (1962) 参照.

コロニー選択を行なつて来たが、私はコロニー選択によつて強毒株、弱毒株或いは無毒株がえられればこれについて耐熱性との関係を検討したいと考えた。しかし実験をすすめているうちに我々の cooked meat broth はかなりの培地誤差による毒素産生力の差があることが推定されるに至つたので、先ず24時間培養の中試験管前培養から 0.2ml ずつ同一培地50本にうえて毒素原性の変異する分布をしらべた。表3に見る如く算術平均を 7.29 にもつ 4 から 9  $\alpha$ -toxin 値において正規分布カーブを示した (3本の中試験管培養破損のため47本の成績)。

表3 PB6K の同一培養菌液を同一ロットの  $\alpha$ -toxin 産生培地47本で培養した場合の  $\alpha$ -toxin 値のばらつき

$\alpha$ -toxin値/ml	左記の毒性を示す試験管数
4	1
5	4
6	14
7	15
8	11
9	2

表4(a) PB6K の 51 substrains\* の  $\alpha$ -toxinogenicity のばらつき (第1回の実験)

$\alpha$ -toxin 値/ml	左記の毒性を示す株数
4	21
5	8
6	13
7	9

\*51 substrains は Zeissler 平板培地上のコロニー-51より確立された。

表4(b) PB6K の 52 substrains\* の  $\alpha$ -toxinogenicity のばらつき (第2回の実験)

$\alpha$ -toxin 値/ml	左記の毒性を示す株数
2	1
3	1
4	18
5	16
6	12
7	4

\*52 の substrains は Zeissler 平板培地上のコロニー-52より確立された。

これに対して Zeissler 上の51個のコロニーをとり確立された51の substrains について毒素原性の変異域を検査すると、その正規分布カーブは表4(a)の如くなり、先の正規分布カーブではなく、そのモード値(流行値)を毒性の最低の所におく非対称のカーブとなつた。この実験を再度くり返して表4(b)の如き成績をえたが、コロニー選択をすると毒素のひくい株のポピュレーションが多いという前記の事実を確認することとなつた。これらの事実は cooked meat broth の中で前培養1代の内に毒性の高い菌が outgrowth することを暗示した。

如上の分離株の中から  $\alpha$ -toxin が 2, 3, 4, 5, 6, 7 と異なる 6 株について 4 本ずつを用いて毒性を検査すると表5(a)の如くで、分散分析法により NO. 24 とそれ以外の 5 株との間には 1%以下の危険率で有意の差を示した。しかしこの 5 株の間には20%の危険率でも有意の差はなかつた。事実、再度しらべると 3  $\alpha$ -toxin 値を示した NO. 40 も 7  $\alpha$ -toxin 値を示した NO. 48 も差がなく、主として培地誤差によるものと思われた。一方 cooked meat broth の中で継代と共に毒性菌が outgrowth すると考えられたが、事実、2  $\alpha$ -toxin 値を示したこの NO. 24 株は継代と共に

表5(a) PB6K の substrains の  $\alpha$ -toxinogenicity

sub-strains NOs.	分離時の $\alpha$ -toxin 値/ml	cooked meat broth 1代継代後、再測定された $\alpha$ -toxin 値/ml
24	2	2, 4, 4, 4 *
40	3	7, 8, 6, 7
2	4	8, 7, 6, 6
52	5	7, 7, 7, 6
5	6	7, 8, 5, 8
48	7	5, 6, 7, 6

\*各 substrain につき4本の培地にうえた際の  $\alpha$ -toxin 値

表5(b) 数代継代した後の No. 24, No. 48 の各 20 substrains (コロニーより分離)の毒素原性の上昇

菌株	$\alpha$ -toxin 値/ml	左記の毒素原性を示す substrain 数
PB6K No. 24	4	5
	5	15
PB6K No. 48	7	10
	8	10

表 6 保存により弱毒化された PB6K 株の  $\alpha$ -toxinogenicity と耐熱性

測定日/月	17/VI	3/VII	16/VII	19/VII	2/VIII	4/VIII	6/VIII
菌 株							
A	4 (+)	4 (-)	5 (-)		4 (-)		8 (-)
B	2 (+)	4 (-)	3 (+)	4 (-)	5 (-)	6 (+)	8 (+)
D	4 (+)	4 (-)	5 (-)		5 (-)		8 (+)
E	4 (+)	5 (+)	4 (+)		5 (-)	6 (-)	8 (-)
F	3 (-)	4	3 (+)	3 (-)	5 (-)	5 (-)	
G	2 (-)	3 (+)	2 (+)	1 (-)	3 (+)	3 (+)	
J		4	3 (+)	3 (-)	5 (-)		
K							
L	2 (-)	4 (+)	5 (-)		5	5 (-)	5 (+)
No. 3	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)	0.1 (+)

(+): 80°C 10分間に耐熱性あり (-): 80°C 10分に耐熱性なし 数値は  $\alpha$ -toxin 値/ml

表 7 (a) 各種培地継代による  $\alpha$ -toxinogenicity の変化

菌 株	PB6K-No. 3			WF1603		
	cooked meat broth pH 7.4	Pope 培地 pH 6.0	Nagler 培 地 pH 7.0	cooked meat broth pH 7.4	Pope 培地 pH 6.0	Nagler 培 地 pH 7.0
5	0.4 *	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	0.4
	0.4	0.4	0.8	0.2	0.4	0.4
	0.4	0.2	0.6	0.2	0.4	0.2
	0.4	0.8	0.4	0.2	0.4	0.4
	0.4	0.4	0.6	0.1	0.2	0.4
10	0.4	0.6	0.4	0.2	0.4	0.4
	0.4	0.6	0.2	0.2	0.4	0.6
	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.6
	0.4	0.6	0.4	0.4	0.2	0.4
	0.4	0.6	0.4	0.4	0.2	0.4
	0.6	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4
20	0.2	0.8	0.2	0.2	0.4	0.8
	0.2	0.6	0.2	0.6	0.6	0.8
	0.2	1.0	0.4	0.2	0.4	1.0
	0.2	1.0	0.4	0.6	0.4	0.8
	0.2	0.6	0.2	0.4	0.6	0.8
	0.2	0.8	0.4	0.6	0.8	0.8
30	1.0	0.6	0.2	0.1	0.2	0.6
	0.1	0.8	0.2	0.2	0.4	0.4
	0.1	0.8	0.2	0.1	0.4	0.4
	0.1	0.6	0.2	0.1	0.6	0.6
	0.2	0.6	0.2	0.1	0.4	0.6
	0.2	0.6	0.2	0.2	0.4	0.6

\* 同時に 6 本の培地にうえた際の  $\alpha$ -toxin 値, 原性株の毒素原性は PB6K No. 3: 0.8, 0.8, 1.0, 1.0 0.8, 0.8 WF1603: 0.6, 0.6, 0.8, 0.8, 0.6, 0.6

表 7 (b) 各種培地継代と孢子形成能の変化

継代前の原株* の孢子形成能	PB6K-No. 3			WF 1603		
	$\frac{1.1 \times 10^4}{9.2 \times 10^7}$			$\frac{4.9 \times 10^3}{4.5 \times 10^6}$		
継代培地	cooked meat broth pH 7.4	Pope 培地 pH 6.0	Nagler 培地 pH 7.0	cooked meat broth pH 7.4	Pope 培地 pH 6.0	Nagler 培地 pH 7.0
30代継代後の* 孢子形成能	$\frac{2.8 \times 10^4}{7.9 \times 10^6}$	$\frac{7.9 \times 10^4}{4.1 \times 10^6}$	$\frac{4.9 \times 10^3}{2.1 \times 10^6}$	$\frac{7.9 \times 10^3}{2.3 \times 10^6}$	$\frac{1.7 \times 10^3}{4.5 \times 10^6}$	$\frac{3.3 \times 10^4}{1.3 \times 10^7}$

\*  $\frac{80^\circ\text{C} \text{ 10分加熱後の生菌数/ml}}{\text{加熱直前の生菌数/ml}}$

4  $\alpha$ -toxin 値を主として示すに至り、更に数代継すると 6  $\alpha$ -toxin 値を示すものへと変化した。表 5 (b) に NO. 24 の 20 substrains と NO. 48 の 20 substrains (コロニーよりそれぞれ 20 substrains をえらんだ) について検査した成績を示した。即ち、NO. 24 と NO. 48 の間にはなお差をもちつつ毒素原性は上昇した。したがってこれらの実験から、無毒のコロニーを選ぼうとして弱毒株を Zeissler 培地でえらんで行つてもこれらの毒素原性は低下せず、むしろ上昇してゆき、この条件では安定して毒素原性に差のある菌をうることは不可能であることが判つた。

——培地保存により弱毒化された株の毒素原性及び耐熱性——

毒性株を研究室に永く放置すると、自然に毒性が低下していることはよく経験する所であるが、我々も PB6K を数本の小試験管の cooked meat broth に培養したものを 200日以上保存した際、これらの数本が弱毒化されていることが判つた。しかるにこれらの株は時々その後、毒性をしらべると次第に強毒化した(表 6)。この間、培養に先だつて cooked meat broth に継代されたのみである。対照に耐熱性の NO. 3 株を用いて耐熱性との関係をしらべたが(80°C 10分を用いた)、耐熱性の毒素原性との間に何らの関係も見出せなかつた。

以上はコロニー選択によつてえられた 2~9  $\alpha$ -toxin 値に及ぶ様々の毒素原性をもつ PB6K の substrains の間には結局、安定して有意の差のある毒素原性をもつ株を発見しえないこと、同時にまた、これらの substrains の間には孢子形成能の上でも差を見つけることは不可能であることを示した。しかし乍ら、加熱によつてえた NO. 3 株は安定して無毒のまま保持された(孢子形成能の上でも差をもつ)。

——継代による毒性の変化——

PB6K-NO. 3 の未だ毒性を僅かにのこしているもの(0.8  $\alpha$ -toxin 値)を cooked meat broth, Pope

消化培地<sup>9)</sup>、Nagler 培地<sup>10)</sup>に継代した。この時、同時に弱毒株 WF 1603 をも同一培地に同様な条件で継代した。表 7 (a) の 5代、10代、20代、30代目に毒性を測定した(これらの毒素産生培地のロットは同一でないので培地産生力によつて、いくらか影響をうけると考えられる)。cooked meat broth で 24時間継代をつづけると、その毒性は落ちたが、この時、孢子形成能は強化していた。但し孢子形成能は Pope 培地で継代すると弱化した。その毒素原性は増大しなかつた。この傾向は同時に実験した WF 1603 株についてもあてはまつた(表 7 (b))。

## 考 案

Clostridia の各 species で孢子形成能によつて toxigenesis が強く左右されていることは我々の同僚によつて、これまで Cl. welchii<sup>3)</sup>、Cl. tetani<sup>11)</sup>、Cl. novyi<sup>12)</sup>、Cl. sordellii<sup>13)</sup> でたびたび述べられて来た。しかし、私は Cl. welchii 強毒株 PB6K を用いて 2  $\alpha$ -toxin 値から 9  $\alpha$ -toxin 値までの毒素原性を示すものについて、その耐熱性を定性的並びに定量的(孢子形成能)にしらべても、遂にその関係を見出しえなかつた。これは一つには PB6K 株が殊に耐熱性の弱い株であり、2~9  $\alpha$ -toxin 値のものは、我々の培養条件では 90°C 10分の加熱にさえ耐えないことによると思われる。石田<sup>2)</sup>は沢山の株を用いて、その毒素原性と耐熱性を検討した際、彼の培養条件下では 100°C 10分の耐熱性機構をもつ菌はすべてが無毒である旨述べたが 90°C 10分或いは 80°C 10分は用いられないことを示した。私が PB6K に 80°C 10分の加熱条件を用いたのは、止むをえぬ上述の理由の他に、同一株の substrains であれば比較的統一であり、この温度で検討しうるかとも考えたのであるが、これが不可能であることが判つた。しかしまた一面ではこれらの substrains の間では孢子形成能の差のないことが、毒素原性の上でも実際には確実な差をもたないことと

一致しているようにも見えた。

胞子形成能が強化すれば毒性は弱体化しても、この逆は必ずしも真ではないことは、私の継代における毒性の変化実験或いは石田の成績から明白である。耐熱性は様々の因子から成立し<sup>14)</sup>、毒性とかわりなく失われることがあるものと考えられる。

### 結 論

*Cl. welchii* の強毒株 PB6K の substrains の中で加熱耐性の株をえらぶと、弱毒株 (1  $\alpha$ -toxin 値以下) がえられた。この株は胞子形成能及び毒素原性の上で原株と確実に区別された。これに反してコロニー選択或いは長期保存によりえられた 2~9  $\alpha$ -toxin 値の株はいずれも胞子形成能及び毒素原性の上で確実な差をもたなかった。

稿を終るに当り終始御懇切な御指導と御校閲を賜った恩師西田尚紀教授に感謝の表を表します。

### 文 献

1) 石田勝一・山岸高由・河合康守・西田尚紀：医

- 学と生物学, **62**, 41 (1962).      2) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀：医学と生物学, **62**, 89 (1962).      3) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀：医学と生物学, **62**, 151 (1962).      4) Evans, D. G. : J. Path. Bact. **57**, 75 (1945).  
5) 村上政夫・山岸高由・西田尚紀：医学と生物学, **64**, 166 (1962).      6) Van Heyningen, W. E. : Biochem. J. **35**, 1246 (1941).  
7) Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Van Heyningen, W. E. : J. Path. Bact. **58**, 229 (1946).      8) Oakley, C. L. & Warrack, G. H. : J. Path. Bact. **53**, 335 (1941).  
9) Pope, C. G. & Smith, M. S. : J. Path. Bact. **35**, 673 (1932).      10) Willis, A. T. : Nature, **180**, 92 (1957).      11) 真田一郎：医学と生物学, **67**, 283 (1963).      12) 中川原儀三・西田尚紀：医学と生物学, **66**, 116 (1963).  
13) 玉井健三・山岸高由・西田尚紀：医学と生物学, **63**, 38 (1962).      14) 蜂須賀養悦：芽胞, p. 70, 岩波書店 (1962).

### Abstract

Correlation between toxigenicity and sporulating potency was analysed among substrains of *Cl. welchii* PB6K, strongly toxigenic strain. The results obtained were as follows;

1. A substrain with distinctly higher sporulating potency was obtained by heating the parent strain. The heat-resistant substrain was distinctly less toxigenic than the parent strain. The attenuated toxicity have remained stable for about a year.

2. The attenuated substrains obtained from colony-fishing or after a long storage of the parent strain were not different from the parent strain in toxigenicity and sporulating potency, when they were examined after several processes of subculture.