

## Clostridium tetani の毒素原性に関する研究

## II. Cl.tetani と Cl. tetanomorphum の毒素原性と孢子形成能

金沢大学医学部微生物学教室(主任 西田尚紀教授)

真 田 一 郎

(昭和39年12月22日受付)

著者は前報<sup>1)</sup>で Cl. tetani を土壌より分離するさい、その加熱温度を高くするに従って毒素原性の低い菌株が分離されてくることを述べた。また、この時分離された無毒株は、実は Cl. tetanomorphum であろうと推定するいくつかの成績を示した。いうまでもなく細菌では、加熱耐性菌とは孢子形成菌であることを意味するから、Toxigenesis<sup>2)</sup>はこの species の孢子形成能と関係があると考えられたので、本報ではこれについて検討した成績について述べたい。

分離のさいの加熱温度と Toxigenesis については前報<sup>1)</sup>にて分離株多数を用いて検討したが、一つの菌株の中で耐熱性の強いもの、弱いもの、及び非耐熱性のものに分けてこの関係が分析されるならば、Toxigenesis と Sporogenesis の関係が一層明白となると考えられた。従って、Cl. tetani の laboratory strains と分離株<sup>3)</sup>(有毒株及び無毒株)の各菌株内の substrains を分析することによつて、孢子形成能、毒素原性、生物学的性状の関係を追求した。

## 実 験 方 法

使用菌株：Cl. tetani の有毒株として、Harvard A-47 (HA-47)、及び著者分離株15株 (Nos. 6101, 6102, 6104, 6108, 6111, 6112, 6114, 6121, 611, 613, 801, 802, 803, 1110, 1113) を、無毒株として分離株8株 ((Nos. 6139, 1101, 1102, 1108, 1115, 1119, 1120, 1132) を用いた。

熱耐性試験：使用培地としては、10% (V/V), cooked meat brsth を使用した。試験法はこの培地にて 37°C 48時間培養後、培養液を約 1 ml あて小試験管に分注してそれぞれ、70°C, 80°C, 90°C, 100°C で10分間加熱した。次いでこの加熱培養液を肝片加肝ブイオンに移植して発育させ、各温度に対する耐熱株として使用した。

毒素の産生及び測定法は前報<sup>1)</sup>に記した方法によりまた、生物学的試験法も前報<sup>1)</sup>同様 Sterne<sup>4)</sup>らの記載した方法<sup>5)</sup>によつた。

孢子形成能測定法：毒素産生用培地 (Proteose peptone (大五) 培地)<sup>1)</sup>にて 37°C 48時間好気的培養を行ない、培養液 1 ml 中の総生菌数を測定した。同時に、培養液 1 ml を滅菌小試験管にとり 100°C 10分加熱後その耐熱菌数を測定した。測定法は最確定数法 (Most probable number, N.P.N)<sup>6)</sup>によつたが両者の比を“孢子形成能”と名づけ、その数値は実数または常用対数で示した。菌の稀釈には 1% peptone 水 (pH: 7.0) を用い、適当と思われる連続した5つの稀釈段階を選び、これから1つの稀釈段階につき5本の判定培地を用いてそれぞれの試験管へ 0.1 ml あて移植した。菌数計算用の判定培地としては 1% Glucose 加 cooked meat broth (小試験管) を用いた。判定は 37°C 3日間培養後に行なつた。なお孢子形成能の意義については更に本文で検討を加えた。

## 実 験 成 績

I) 孢子形成能の吟味：Clostridia の孢子形成能に関しては従来多くの報告があるが<sup>4)5)6)</sup>、この意義は Toxigenesis を考える上に重要であるので Cl. tetani を用いて再吟味を行なつた。

先ず表1では用いた条件下では、原株  $3.3 \times 10^8$ /ml の総菌中  $4.9 \times 10^3$ /ml の耐熱菌 (孢子) を作るが、この数値は  $3.3 \times 10^8$  の内、 $4.9 \times 10^3$  のみの孢子形成菌が存在することを意味しない。即ちこの菌を Zeissler 平板培地に広げて10個のコロニーから10株の Substrains を得、これらの孢子形成能を再び測定すれば、各 substrains は  $10^2 \sim 10^4$  の孢子を形成し、原株が示した孢子形成能と有意の差を認めることができな

Toxigenicity of Clostridium Tetani: II. Sporulating and Toxigenic Potencies of Cl. Tetani and Cl. Tetanomorphum. Ichiro Sanada, Department of Microbiology (Director: S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

表1 耐熱性 Harvard A-47 株とその Substrains\* の孢子形成能

Strain	総菌数/ml	100°C 10分加熱耐性細胞数/ml
原 株	$3.3 \times 10^8$	$4.9 \times 10^3$
Substrain 1	$1.7 \times 10^8$	$1.3 \times 10^3$
2	$6.4 \times 10^8$	$6.8 \times 10^3$
3	$2.6 \times 10^8$	$1.7 \times 10^4$
4	$6.1 \times 10^7$	$3.3 \times 10^4$
5	$2.4 \times 10^8$	$1.3 \times 10^4$
6	$3.5 \times 10^8$	$1.7 \times 10^2$
7	$2.4 \times 10^7$	$9.3 \times 10^2$
8	$4.9 \times 10^7$	$5.4 \times 10^2$
9	$1.9 \times 10^7$	$9.2 \times 10^3$
10	$1.7 \times 10^8$	$3.5 \times 10^3$

\* 原株を Zeissler 平板培地に広げて10個のコロニーを採ることによって得た。

つた。いいかえれば「 $3.3 \times 10^8$  の総菌数中  $4.9 \times 10^3$  の耐熱性菌を形成する菌株とは、該当条件を同一にして試験すれば主として同程度の耐熱菌を生ずる細胞から成ることを意味する。」(この現象はこれまでも他の Clostridia で証明されている<sup>45)46)</sup>。) このことは耐熱性菌数を示す [ $4.9 \times 10^3$ ] とその他の [ $3.3 \times 10^8 - 4.9 \times 10^3$ ] との間に、耐熱性という点で Genetic に殆んど差のないことを示している。孢子形成能の数値が培地の環境因地に制約された強さを意味することは、培地調整のさいの培地の種類或いは僅かな pH の差が耐熱性菌数に著しい影響を与える現象からも見出される(表 2 a)。例えば No. 6139 では 10% (V/V) cooked meat broth, Proteose peptone (4%) 培地を諸種の pH にて調整すると、この時の孢子形成能は  $10^2 \sim 10^5$  の間を上下した。これに反して等しい培地環境で孢子形成能を比較すれば、その強さは菌株間の genetic

表2 培地環境の変化に伴う孢子形成能の変動

a) 2種の培地で pH を変えた場合

	Cooked meat broth *				Proteose peptone media **			
	initial pH	final pH	孢子形成能		initial pH	final pH	孢子形成能	
			総菌数/ml	孢子数/ml			総菌数/ml	孢子数/ml
HA-47	7.0	7.6	$1.3 \times 10^6$	0	7.6	8.0	$1.1 \times 10^8$	0
	6.6	7.4	$1.7 \times 10^6$	0	7.0	7.6	$7.9 \times 10^7$	$2.0 \times 10^1$
	6.2	7.2	$1.7 \times 10^6$	0	6.4	7.4	$7.9 \times 10^7$	$2.0 \times 10^1$
No. 6139	7.0	6.8	$1.3 \times 10^8$	$3.3 \times 10^3$	7.6	6.8	$9.2 \times 10^8$	$4.9 \times 10^2$
	6.6	6.6	$2.4 \times 10^8$	$3.3 \times 10^4$	7.0	6.6	$3.5 \times 10^8$	$3.3 \times 10^5$
	6.2	6.6	$2.8 \times 10^8$	$1.4 \times 10^5$	6.4	5.4	$3.5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^5$

\* 37°C 48時間培養液について測定

\*\* 37°C 96時間培養液について測定

孢子数 : 100°C 10分加熱耐性細胞数

b) Cooked meat broth で製作ロットを異にした場合

Strain	Lot. No. 1 media	Lot. No. 2 media
No. 6101 耐熱株	2.49 *	1.89
No. 613 耐熱株	3.93	2.00
No. 6102 耐熱株	4.37	2.74
No. 611 耐熱株	4.43	2.55
No. 801 耐熱株	4.43	2.86

\* 数値は (総菌数の常用対数値) - (100°C 10分加熱耐性細胞数の常用対数値)

即ち  $-\log \frac{\text{孢子数/ml}}{\text{総菌数/ml}}$ 

な因子によつても支配されることは、次の成績から知ることができる。即ち、HA-47 と No. 6139 の2株を表 2 a) の2種の培地を用いて、培地の pH だけを 7.0, 6.6, 6.2 と異にして孢子形成能を測定すると、菌相互間ではどの培地で比較しても HA-47 株は No. 6139株の孢子形成能に及ばず、両株間に明確な差を見ることができた。このように孢子形成能は、Phenotypic な因子に影響される他に、菌相互の Genetic な因子の影響もうけているのであつて、この現象は、分離株5株を用いて孢子形成能を比較したさいにも見られた(表 2 b))。即ち同一培地でも製作ロットの異なる別の 10% (V/V) cooked meat broth による孢子形成能を比較すると、Lot No 1. に比較して Lot. No.

2. の培地環境は孢子形成に都合のよいことがわかった。更にこの場合も菌相互間には明確に孢子形成能の差が存在した。

以上を要約すれば次の如くいえる。用いられた孢子形成能測定の下条件下では、(1) 孢子形成能の数値は培地因子の Phenotypic expression である。(2) 同一の培地環境を用いた時の各菌株間の孢子形成能値を比較する時、その間に明確な差を見出すことができる。

従って同一培地を用いて孢子形成能を比較することが必要であるばかりでなく、一つの実験に関しては、常に同一ロットの培地を用意することが望ましいと考えられた。

従って、以上の如き意味を持つ孢子形成能について毒素原性との関係を検討した。

II) Harvard A-47 株における毒素原性と孢子形成能の関係： HA-47 を前述の熱耐性試験の方法に従って 70°C, 80°C, 90°C, 及び 100°C 各々10分間加熱して、それぞれの温度の耐熱株を選択し、それらの

表3 Harvard A-47 における加熱耐性substrainsの毒素原性と孢子形成能の関係

Strains	毒素原性 (MLD/ml)	孢子形成能	
		総菌数/ml	孢子数/ml*
原株	200,000	$1.3 \times 10^8$	$2.3 \times 10^1$
70°C 10分耐熱株	2,000	$2.7 \times 10^7$	$1.1 \times 10^4$
80°C 10分耐熱株	2,000	$2.4 \times 10^8$	$5.5 \times 10^4$
90°C 10分耐熱株	0	$3.9 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$
100°C 10分耐熱株	0	$2.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$

\* 孢子数：100°C 10分加熱耐性細胞数

表4 Cl.tetani 分離株 (有毒株及び無毒株)の孢子形成能

有 毒 株			無 毒 株		
菌数 No.	総菌数 /ml	孢子数 /ml*	菌数 No.	総菌数 /ml	孢子数 /ml*
6101	$1.7 \times 10^7$	0	6139	$7.9 \times 10^7$	$7.9 \times 10^8$
6102	$1.2 \times 10^7$	0	1101	$5.4 \times 10^8$	$6.8 \times 10^2$
6104	$1.3 \times 10^8$	0	1102	$2.4 \times 10^8$	$1.4 \times 10^4$
6108	$3.3 \times 10^7$	$4.9 \times 10^1$	1108	$2.4 \times 10^8$	$3.3 \times 10^4$
6111	$1.4 \times 10^7$	0	1115	$9.2 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$
6112	$2.1 \times 10^7$	0	1119	$2.4 \times 10^8$	$6.8 \times 10^4$
6114	$1.1 \times 10^7$	$3.3 \times 10^2$	1120	$3.5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^4$
6121	$6.4 \times 10^7$	$3.3 \times 10^1$	1132	$2.1 \times 10^7$	$4.0 \times 10^4$
801	$2.7 \times 10^7$	0			

\* 孢子数：100°C 10分加熱耐性細胞数

菌株について毒素原性と孢子形成能を測定した。その結果は表3に示すように、加熱温度を高くして得た耐熱 substrain ほど毒素著性は低下し、90°C, 100°C 10分加熱して得た菌株は全く毒性がなかった。これに反して孢子形成能は加熱温度を高めるに従って増大した。いいかえれば、HA-47 では加熱温度を高くして孢子形成能のよい substrain を選べばそれらの毒素原性は減少或いは消失した。耐熱 substrains のこのような性質は cooked meat broth によつて室温に8カ月間放置しても毒素原性に変化は見られなかった。また、この無毒化した HA-47 100°C 10分耐熱株の生物学的性状は Glucose fermentation (+), Nitrate reduction (+) となつて前報<sup>1)</sup>で Cl. tetanomorphum とした無毒株の生物学的性状に一致した。

III) Cl. tetani 分離株における毒素原性と孢子形成能の関係：先に記した分離株を有毒株と無毒株に分けて、双方より任意に10株を選択し孢子形成能を測定した結果は表4に示した如くである(有毒株1株、無毒株2株は実験の失敗により省略した)。この結果有毒株と無毒株の間には孢子形成能に歴然たる差異を認めることができた。従つて分離株においても HA-47 で見られたように、有毒株の子孫の中から無毒の, substrain を選択できるか否かを検討した。使用菌株は分離株の中からあらかじめ 100°C 10分加熱に耐性であることを調べた上で表5a)に記した9株を用いた。

このさいの実験方法は、これら9株を熱耐性試験に用いた cooked meat broth にて 37°C 48時間培養の後、この培養液を約 1 ml あて3本の滅菌小試験管に分注し、それぞれ 100°C 10分, 20分, 30分加熱した後各々を肝片肝イオンに移植し、最も強い加熱条件に対してまで耐えて菌の発育が見られたものを原株の1回耐熱株 (HR-1) とした。同様の方法でこの HR-1 を 100°C 10分, 20分, 30分加熱して2回耐熱株 (HR-2) を得、更にくり返して、HR-3, HR-4, HR-5 を選択した。これら各回の耐熱株についてその都度、毒素原性と孢子形成能測定した(表5a)には原株, HR-1, HR-2, HR-4, HR-5 の毒素原性と HR-5 の孢子形成能を記した。この時の毒素産生用培地は Taylor の豚胃消化培地<sup>2)</sup> pH 7.2 を用いた)。

これによると分離株の原株は加熱によつて5回耐熱株のなる間に、毒素原性は原株の 1/10~1/100 程度に減弱した。しかし5回の加熱耐性株の選択によつてもなお HA-47 で行なつたように無毒株を選択することは困難であることがわかった。但し9株中1株は完全に無毒株になつた。また、これらの HR-5 は Cl.

tetani に比較し、はるかに高い孢子形成能値を示した。

しかし以上の結果のみでは果して HR-5 の孢子形成能が、自然界から分離した *Cl. tetanomorphum* といわれてきた無毒株のレベルまで上昇しているかが問題となるので、この5回耐熱株2株と無毒株2株の孢子形成能を比較した(表5b)。これによると孢子形成能の上では No. 6101 は無毒株よりもむしろ高い孢子形成能値を示したにもかかわらず依然として毒性を有していた。従ってこれらの菌では、HA-47 の如く孢子形成能によつてのみで毒素原性が支配されているわけではなかつた。一方 HA-47 は耐熱性の substrains を選ぶと Glucose fermentation が (-) から (+) に変つたが、従来 *Cl. tetanomorphum* は Glucose fermentation (+) と記載されている。表5b)

で耐熱有毒株 (HR-5) と無毒株を比較したさい有毒株の孢子形成能は無毒株と同程度となつたのに対し、Glucose fermentation は依然として (-) であつたので、著者は糖分解能の有無が毒素原性の崩失の重要因子の1つではないかと考えるに至つた。

従つて *Cl. tetanomorphum* は *Cl. tetani* が Glucose fermentation (+) となり孢子形成力が強くなつた株ではないかと考えて次の実験を行なつた。即ち、従来の実験方向とは逆に Glucose fermentation 陰性の5株 (HA-47, 分離株 No. 6114, 1110, 1113 及び 901) を用いて、この中から Glucose 分離能の強い substrain を選ぶ目的で、1% Glucose 加 Pope-Smith 消化培地<sup>8)</sup> (pH 7.2) に 37°C 24時間毎に継代をくり返した(表6)。なお本実験では孢子形成能測定のさいの加熱温度を従来 100°C から 80°C に下げ

表 5

a) 分離株をくり返し加熱したさいの毒素原性と孢子形成能

Strain No.	毒素原性 <sup>†</sup> (MLD/ml)					HR-5/ml の孢子形成能 <sup>*</sup>	
	原株	HR-1 <sup>*</sup>	HR-2 <sup>*</sup>	HR-4 <sup>*</sup>	HR-5 <sup>*</sup>	総菌数/ml	孢子数/ml <sup>**</sup>
6101	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	4.6 × 10 <sup>7</sup>	6.1 × 10 <sup>4</sup>
6102	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	5.2 × 10 <sup>7</sup>	2.3 × 10 <sup>4</sup>
6104	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>		10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	3.3 × 10 <sup>8</sup>	1.6 × 10 <sup>6</sup>
6108	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	3.3 × 10 <sup>8</sup>	7.8 × 10 <sup>3</sup>
6121	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	以 上	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	1.4 × 10 <sup>8</sup>	9.2 × 10 <sup>5</sup>
611	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>		4.9 × 10 <sup>7</sup>	3.5 × 10 <sup>5</sup>		
613	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>		4.6 × 10 <sup>8</sup>	1.4 × 10 <sup>5</sup>		
802	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>		10 <sup>0</sup>	0	1.2 × 10 <sup>8</sup>	9.3 × 10 <sup>5</sup>
803	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	3.3 × 10 <sup>7</sup>	3.3 × 10 <sup>4</sup>

\* 本文参照

\*\* 孢子数 : 100°C 10分加熱耐性細胞数

b) 5回耐熱株と無毒株の孢子形成能及び生物学的性状の比較

Strain No.	毒素原性 (MLD/ml)	孢子形成能		生物学的性状							
		総菌数/ml	100°C 10分 加熱耐性細胞数/ml	糖分解							
				グ ル コ ー ス	マ ル ト ー ス	ラ ク ト ー ス	サ ツ カ ロ ー ス	イ ン ド ー ル 形 成	硝 酸 塩 環 元	凝 固 卵 白 消 化	ゲ ラ チ ン 液 化
6101	10 <sup>2</sup>	3.3 × 10 <sup>7</sup>	1.7 × 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	+	-	-	+
6102	10 <sup>2</sup>	4.9 × 10 <sup>7</sup>	1.4 × 10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	+	-	-	+
* 6139	0	2.2 × 10 <sup>8</sup>	1.3 × 10 <sup>4</sup>	+	-	-	-	+	-	-	+
* 1120	0	3.5 × 10 <sup>8</sup>	4.9 × 10 <sup>4</sup>	+	-	-	-	+	-	-	+

\* 無毒株

表6 Cl. tetani から Cl. tetanomorphum への変化 (Glucose 加 (1%) Pope-Smith 培地による)

Strains	毒素原性 (MLD/ml)	生物学的性状		胞子形成能	
		グルコース分解	ゲラチン液化	総菌数/ml	80°C 10分加熱耐性細胞数/ml
HA-47 原株	10 <sup>1</sup>	—	+	9.2×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>
	10代継代	0	+	2.3×10 <sup>8</sup>	4.9×10 <sup>5</sup>
6114 原株	10 <sup>2</sup>	—	+	9.2×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>
	10代継代	10 <sup>0</sup>	—	9.2×10 <sup>8</sup>	2.3×10 <sup>5</sup>
	継代後100°C 10分加熱	0	+	5.4×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>
1110 原株	10 <sup>2</sup>	—	+	9.2×10 <sup>8</sup>	6.8×10 <sup>4</sup>
	10代継代	10 <sup>2</sup>	±	5.4×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>5</sup>
	継代後100°C 10分加熱	0	±	7.0×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>
1113 原株	10 <sup>2</sup>	—	+	2.2×10 <sup>8</sup>	2.3×10 <sup>2</sup>
	30代継代後 80°C 30分加熱	10 <sup>2</sup>	—	5.4×10 <sup>8</sup>	2.2×10 <sup>3</sup>
901 原株	10 <sup>1</sup>	—	±	4.6×10 <sup>7</sup>	3.3×10 <sup>4</sup>
	30代継代後100°C 30分加熱	10 <sup>1</sup>	—	5.4×10 <sup>8</sup>	4.3×10 <sup>6</sup>

て行なった。この実験に使用した HA-47 は前以て Pope-Smith 消化培地 (pH 6.8) に30代継代して毒性が既に 10MLD/ml に低下したものであるが、この時上記の継代法を10代を経ただけで Glucose fermentation (+) となり毒素原性が消失した。また No. 6114 及び 1110 の両株は10代継代後なお毒性を有していたが、これを 100°C 10分加熱し耐性株を選ぶとその株の毒素原性は消失した。毒素原性を失ったこの両株とも Glucose 分解能は陽性となった。

これに反して No. 1113, 及び 901 の両株は10代継代後も毒性を有し, Glucose fermentation には変化なく, またその耐熱株も依然として Glucose fermentation (—), 毒性 (+) で, 更に 30代継代しても, その継代株を加熱しても変化がなかった。この時 No. 901 株はかなり胞子形成能が増大したが毒素原性の消失は見られなかった。従つて胞子形成能の他に, Glucose fermentation が毒素原性の消失に影響を及ぼしていることがわかった。

### 考 案

胞子の形成過程は複雑な生化学的变化にもとづくもので, 胞子形成の多寡は一般にはその環境因子を考えるべきであるとされている<sup>9)10)11)12)</sup>。

著者の用いた培地で pH 調整の変化によつてその培

地の胞子形成能が著しく異なつたが、これについては既に Hardwick<sup>13)14)</sup> は培地から遊離してくる脂肪酸によることを明らかにしている。cooked meat broth ではアルカリ性に処理すると脂肪酸が遊離してくることは山岸ら<sup>15)</sup>が述べている。また、本文に記した如く形成される胞子の量は培地の環境因子によつて著しく異なるが、一定の環境を用いる限り、各菌株間の胞子形成能は有意義の差があり、この胞子形成能の Frequency は遺伝的な因子にも支配されていると考えられた。

本文での実験によつて著者は Cl. tetani が Cl. tetanomorphum の胞子形成力を失つたようではないかと一層確信するに至つた。更に遺伝学的、免疫学的検討が必要であらう。

### 結 論

土壌から分離した Cl. tetanomorphum はすべて胞子形成能が強く, Cl. tetani は極めて弱い株であつた。Cl. tetani の代表株 HA-47 の中から加熱耐性の強い(胞子形成能の強い)株を選ぶに従つて毒性は消失し, 且つグルコース分解は陽性となった。但し他の wild strains では, 胞子形成力の他に糖分解能の差が Toxigenesis に密接な関係をもつことがわかつた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導御校閲を頂いた恩師西田尚紀教授に感謝致します。また菌株の分与を受けた久保田憲太郎博士と絶えず御支援下さった細菌学教室の方々に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 真田一郎 : 十全医会誌, 未刊 (印刷中), (1964).
- 2) **Sterne, M. & von Heyningen, W. E.** : Bacterial and Mycotic Infections of Man (Dubos), 3rd ed., p. 343, J. B. Lippincott Co., Philadelphia. (1958).
- 3) **Hoskins, J. K.** : Pub. health Rep., 49, 393 (1935).
- 4) 石田勝一 : 十全医会誌, 69, 67 (1963).
- 5) 中川原儀三 : 十全医会誌, 70, 141, 147, 153 (1964).
- 6) 玉井健三 : 十全医会誌, 70, 365 (1964).
- 7) **Taylor, A. J.** : J. Immunol., 50, 385 (1945).
- 8) **Pope, C. G. & Smith, M. L.** : J. Path. Bact., 35, 573 (1932).
- 9) **Lamanna, C. & Mallette, M. F.** : 基礎細菌学, P. 292, 丸善, 東京 (1962).
- 10) **Murrel, W. G.** : Microbial Reaction to Environment, P. 100, Univ. Press, Cambridge (1961).
- 11) **Grelet, N.** : J. appl. Bact., 20, 315 (1957).
- 12) 蜂須賀養悦 : 芽胞, p. 145, 岩波, 東京 (1962).
- 13) **Hardwick, W. A., Guirard, B. & Foster, J. W.** : J. Bact., 61, 145 (1951).
- 14) **Rode, L. J. & Foster, J. W.** : J. Bact., 81, 768 (1961).
- 15) 山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 65, 83 (1962).

### Abstract

Sporulating potency was strong in all strains of *Cl. tetanomorphum* examined, whilst it was feeble in all strains of *Cl. tetani* examined. When heat-resistant substrains were selected from *Cl. tetani* HA-47, a stock strain in our laboratory by heating it to various temperatures, it was proved that the higher the temperatures applied, the weaker was the toxigenicity of strains recovered from heating. Since atoxic strain obtained turned out to be positive in glucose fermentation, it could not be differentiated from *Cl. tetanomorphum*.

From wild strains of *Cl. tetani*, atoxic strains could not be obtained merely by heating them to various temperatures, but atoxic strains were obtained when these strains were sub-cultured in 1% glucose Pope broth and then heat-selected.