

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

金沢大学医学部細菌学教室(主任: 西田尚紀教授)

石丸 幹 夫

(昭和40年1月5日受付)

先に石田¹⁾は土壤材料の加熱温度が高ければ高いほど、そこから分離されてくる菌の毒素原性が弱いことを述べ、毒素原性と孢子形成能との間に密接な関係が存在するであろうと推定した。著者は前報²⁾で PB6K の substrains について耐熱性の強いものの中に安定した無毒株をうることが出来たが、耐熱性の弱い弱毒 PB6K はすべて元の強毒株にもどり、安定した弱毒株になり得ることが出来なかつた旨を述べた。PB6K は強毒株として知られる株であり、無毒の substrains をうることは極めて困難なことが予想されるが、自然界から分離した株は総じて毒性が PB6K の如く強くなく¹⁾、また毒素原性も無毒化しやすいものが多いことは、日常経験することであるが、このような各 wild strains について毒素原性と耐熱性との間に、上述の如き関連が見出せるか否かについて検討を行なつた。

実験方法

使用菌株: wild strains WS 021S, WS 1103, WS 028, WS 064, WF 9101, WF 7101, WF 1603, WS 003R, WS 6003R, W 9, W 8 であり、WS は土壤より分離された Cl. welchii を意味し、あとの数字は分離加熱条件と菌株番号である。例えば WS 1103 は土壤を100°C 10分加熱して分離した菌3号の意味である。また WF は人糞便より分離した Cl. welchii で番号は土壤の場合と同様の意味をもつ。また 021S の S は S 型を、003 R の R は R 型を示し、W 8, W 9 は Cl. welchii type C で Leeds 大学(英国)由来の株である。

毒性をしらべる方法として α -toxin 産生能を用いたが、 α -toxin 産生用培地³⁾として、20%に肉かすを入れた cooked meat broth に使用時1%に、fructose を加えたものを用い、これに10% cooked meat bro-

th に24時間前培養液 0.2 ml をうえ、7時間培養した後遠心、その上清の α -toxin を中和するに要する抗毒素血清の titer でもつて、 α -toxin 値と称した²⁾。

耐熱性試験は前報²⁾と同様な方法により、10% cooked meat broth に24時間前培養した菌液を更に、10% cooked meat broth に48時間本培養し、meat をはなした培養菌液を小試験管に 0.5 ml ずつとり加熱した後1% lactose 加 cooked meat broth に後培養し、ここに生存して発育してくるものを、各温度に対する耐性菌とした。またこの場合、加熱後特にコロニー分離をしていない。本報では更に、heat selection の環境をしらべるため Ellner 培地⁴⁾ liver broth, broth, brain mash 及び half fluid agar でも48時間培養したものについて前記の方法で耐熱性試験を試みた。

有毒株及び無毒株の判定基準として、すでに石田¹⁾は lecithovitellin による α -toxin 値と生体内の値とを比較しているが、それに従つた。即ち、0.1 α -toxin 値/ml 及びそれ以下の α -toxin 値を有するものを、non-toxic strain (無毒株)と呼び toxic strain (有毒株)は培地による変動も考慮して 0.4 α -toxin 値以上のものを呼ぶことにした。また toxic strain でも 0.4 α -toxin 値前後のものを弱毒株と称することとした。

実験結果

加熱による弱毒株或いは無毒株の選択

加熱耐性株をえらぶことによつて、弱毒株或いは無毒株がえられるかどうかについて実験を試みた(表1)。大多数のものが耐熱性株をえらぶことによつて弱毒株或いは無毒株をうる事が出来たが、株によつては加熱で殆んど影響をうけない株(WF 7101—表1)もあることが判つた。一方、実験をつづけて行く

Correlation between Sporulating Potency and Toxicity in Substrains of Wild-type *Clostridium Perfringens* Strains. Mikio Ishimaru, Department of Microbiology (Director: Prof. S. Nishida) School of Medicine, Kanazawa University,

うちに、培地環境によつて、heat-selection の効果が異なることが判つたので、この環境の条件を吟味した。使用株は WS 021S (毒素原性は分離当初 3.0 α-toxin 値/ml の毒素原性を示したが、3年間 cooked meat broth に保存しておいた所、1.0 α-toxin 値/ml を示す株になつていた) で、この株を種々の培地で heat-selection を行なつたところ、cooked meat broth の中で heat-selection の効果が現われ、その他の培地では、その効果をみる事が出来なかつた(表2)。

この heat-selection によつて得られた無毒株は継

表1 諸種の温度で加熱選択*された熱耐性菌のα-毒素原性

菌 株	熱耐性菌を得た際の加熱温度 (各10分)				
	非加熱 (原株)	60°C	70°C	80°C	90°C
WS 021S	1.0†		0.1	0.1	—
WS 1103	1.0	0.5	0.1	0.1	0.1
WS 028	0.8		0.1	0.1	—
WS 064	0.6		0.1	0.1	—
WF 7101	2.0	1.5	1.5	1.5	—
WF 9101	0.8	0.1	0.1	0.2	—
WF 1603	0.8	0.8	0.8	0.1	0.1
WS 003R	1.5	0.5	0.5	—	—
WS 6003R	1.0	0.5	0.5	—	—
W9(Type C)	3.0	0.5	0.5	—	—
W8(Type C)	4.0	1.0	2.0	0.1	—

* heat-selection に用いられた培養条件は 10% cooked meat broth. 24時間培養液
† 数字は α-toxin 値/ml
— 加熱耐性菌なし

表2 各種培地に培養された菌*の耐熱性と加熱選択された耐性菌のα-毒素原性

培 地	加 熱 温 度 (各10分)					
	非加熱 (原株)	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Ellner medium	**	0.1	0.5	0.5	—	—
10% Cooked meat broth	1.0	0.1	0.1	0.1	—	—
Liver broth	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	—
Broth	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—
Brain mash	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—
Half fluid agar	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0

* 使用株 WS 021S
** 数値は α-toxin 値/ml
— 加熱耐性なし

代によつて元の毒性にもどる傾向を示した。表3a, 3bに任意にえらんだ2株 (WS 021S, WF 9101) についての結果を示したが、高温で selection されたもほど、毒性は安定していた。

継代により毒性が元にもどる際、この菌株を構成する個々の細胞が全体的に有毒になるのか、それとも毒性菌の out-growth によるのかをしらべた。即ち加熱によつて無毒化された菌を Zeissler 培地地にひらき、培地上の任意のコロニーをとり、更に Zeissler 培地にコロニーとしてひらくというように、コロニー分離を平板から平板へ行なつてゆく限り、この菌は殆んど20代を経てもなお 0.1 α-toxin 値以下であつた。これに対し、無毒化された菌を Zeissler 平板に混和して塗抹し、コロニーとしてとらず、塗抹をくりかえ

表3a Cl. welchii 021S の加熱により得られた無毒株の安定性

無 毒 株	*左記無毒株を得るために加熱に用いられた培地並びに継代用培地	続 代 数		
		2	3	4
80°C 10分加熱して得た菌	Cooked meat broth pH 7.2	** 0.1	0.1	1.0
90°C 10分加熱して得た菌		0.1	0.1	0.1
80°C 10分加熱して得た菌	Cooked meat broth pH 6.4	0.1	0.1	0.1
90°C 10分加熱して得た菌		0.1	0.1	0.1
70°C 10分加熱して得た菌	Liver broth	0.1	0.5	0.8
90°C 10分加熱して得た菌		0.1	0.1	0.1

* 各培地に48時間培養液を加熱
** 数値は α-toxin 値/ml

表3b Cl. welchii 9101 の加熱により得られた無毒株の継代による毒素原性の不安定性

継代数†	2	3	5	7	9
* 菌株					
原 株	**	0.8	0.8	0.8	0.8
60°C 10分加熱して得た菌	0.1	0.8	0.8	0.8	0.8
70°C 10分加熱して得た菌	0.1	0.2	0.2	0.8	0.8
80°C 10分加熱して得た菌	0.2	0.2	0.2	0.8	0.8

* cooked meat broth 48時間培養液を加熱
** 数値は α-toxin 値/ml
† cooked meat broth で24時間毎に継代

表4 Cl. welchii 9101 を加熱して得られた無毒 substrains* の継法**と α -toxinogenicity の変化

実験番号	継代法	継代数							
		1	3	7	10	12	15	20	
1	単一コロニー法	0.1> [†]	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>
	普通法	0.1>	0.1>	0.1>	0.6	0.6	0.8	1.2	
2	単一コロニー法	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>
	普通法	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1	0.2	0.8	
3	単一コロニー法	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>
	普通法	0.1>	0.1>	0.1>	0.1>	0.2	0.2	0.1	

* Cooked meat broth 48時間培養液を 100°C 10分加熱して得た無毒株

** Zeissler 平板を使用

† 数値は α -toxin 値/ml

表5 Cl. welchii 9101 の有毒 substrains* と加熱選択された無毒 substrains** の cooked meat broth における増殖速度

菌 株		有毒 substrains		無毒 substrains	
α -toxin 値/ml		2.0	1.2	0.1	0.1
培養時間 (hr)	0	1.3×10^8 [†]	1.7×10^8	1.7×10^8	1.3×10^8
	3	1.1×10^8	7.0×10^8	5.4×10^8	2.4×10^8
	5	7.9×10^8	5.4×10^8	7.9×10^4	7.9×10^4
	7	1.7×10^8	1.7×10^8	2.4×10^7	2.2×10^7
	12	7.9×10^8	7.9×10^8	8.4×10^8	5.4×10^8
	24	7.0×10^8	7.0×10^8	6.4×10^8	1.7×10^8

* 有毒株を Zeissler 平板に展開, そのコロニーより得たもの.

** cooked meat broth 48時間培養を 100°C 10分加熱後 Zeissler 平板に展開, そのコロニーより得たもの.

† 数字は菌数/ml (M.P.N. 法による—Hoskins, J. K.: Pub. Health Rep., 49, 393 (1943). 参照)

すとき, これらのコロニーはすべて有毒化することが判つた(表4).

このことは無毒のコロニーは主として無毒の菌から成り立ち, 混在して培養すれば有毒菌によつて out-growth をうけることを暗示した(前報に PB6K でこのことについてふれた). またこのことは次の実験によつて一層明らかとなつた. 即ち WF 9101 の有毒株と無毒株を 10% cooked meat broth に培養すると有毒株は5-7時間目に常に 10^4 だけ無毒株より早く増殖した(表5).

コロニー選択による無毒株の分離

前報で強毒株(2-9 α -toxin 値)の PB6K の諸種の毒性をもつ substrains について分析して, これらの間では結局, 耐熱性と毒性との関係を分析出来ないと述べた. 本報では先ず, 元来 2.0 前後の α -toxin 値の毒性をもつ WF 7101 株の古い保存培養を直接

Zeissler 平板にひらき, その substrains の毒素原性をしらべると 0.2-2.5 α -toxin 値の様々な毒性を示した. またこれを 2.0-2.5 α -toxin 値(8株), 1.0

表6a Cl. welchii 7101 の 50 substrains* α -toxinogenicity のばらつきとその耐熱性

α -toxin 値/ml	左記の毒性を示す株数	左記の毒性を示すものの加熱に耐える頻度(100°C 10分)
2.0-2.5	8	3/8
1.5	6	
1.0	9	2/9
0.4-0.8	11	
0.2	16	4/16

* 50 substrains は cooked meat broth に保存陳旧なる原株を直接 Zeissler 平板に塗抹し, そのコロニーより得たもの.

α -toxin 値 (9株) 及び 0.2 α -toxin 値 (16株) の毒素レベルに分ち、各グループの耐熱性をしらべた。即ち、所定の培養条件での48時間培養液を100°C10分加熱し、それに耐える株をしらべたが毒素原性との間には何ら関係のみることは出来なかつた (表 6a)。ま

表 6b Cl. welchii 7101 株の substrains の α -toxinogenicity

* substrains 分離時の α -toxin 値/ml	左記の株を cookcd meat broth に1代継代後の α -toxin 値/ml
2.0	1.0
2.0	2.0
1.5	2.5
1.5	2.5
1.0	2.0
1.0	2.0
0.8	3.0
0.8	1.5
0.5	2.5
0.5	2.5
0.5	1.5
0.2	2.5
0.2	1.5
0.2	2.0

* 表 6a の substrains

表 7a Cl.welchii 7101 の保存株を直接 Zeissler 平板にひらいたコロニーの性状と各型の substrains の毒原性

コロニー型	R	R-S	S	T
	2.0	4.0	3.5	3.5
	3.5	3.5	4.0	2.5
各型の Substrain	1.5	3.5	3.5	4.0
の毒原性	1.5	4.0	4.0	4.0
α -toxin 値/ml	2.5	2.0	3.5	1.0
	1.0	1.5	3.0	5.0
	1.5	2.0	3.5	
	3.0	2.5	3.5	
	1.0	2.5	4.0	
	1.0	3.5	4.0	

R: typical な R型

R-S: R と S の中間型

S: smooth 型

T: dew colony で殆んど Cl. welchii の外観をもたないもの。

(但し、更に serial subculture を行なうと R-S, S, T は smooth となつた。これに対し R は R, S は S であつた。)

た、これらの株は 1 代の継代によつて、2.0 α -toxin 値前後の菌にもどり、本質的には差のないものであつた (表 6b)。

コロニーの中から安定した毒素原性の株をえらび出す試みは、その他 S, R 型を目標とし、或いは大小コロニーを目標として行くと、表 7a の如く、第 1 回目にはたしかに有意の認を認めたが更に継代し、再測定すると表 7b の如く、すべて毒性には差をみないようになり、安定したものではなかつた。また表 7a の場合とは逆に表 7c では S 型に比べて R 型コロニーの方がやや毒性が強かつた。

同様な関係は PB6K-NO 3 でも経験した。表 8 の如く、第 1 回の実験では S 型コロニーの方が R 型コロ

表 7b 表 7a に示された Cl. welchii 7101 Substrains の α -toxinogenicity の安定性

Colony type	Colony 分離時の α -toxin 値/ml	左記の株を Cooked meat broth に 1 代継代後の α -toxin 値/ml
T	5.0	3.0
	4.0	4.5
	4.0	2.5
R	2.0	3.5
S	4.0	3.5
	4.0	3.0
	4.0	3.0
	1.0	2.5
	1.0	2.5
r	2.0	3.0
	2.0	2.5

表 7c C. welchii 7101* の R 型及び S 型コロニー各 10 個より得られた菌株の毒原性

S 型コロニーより得られた株	R 型コロニーより得られた株
1.0**	1.0
2.0	2.0
0.6	3.0
2.0	—
1.0	2.0
0.6	3.0
2.0	2.0
—	3.0
1.0	3.0
1.0	3.0

* cooked meat broth に保存陳旧なる原株を直接 Zeissler 平板に塗抹し、そのコロニーより得たもの。

** 数値は α -toxin 値/ml

表8 Cl. welchii NO 3* のR型
及びS型の毒素原性

colony type 実験番号	S	R
I	0.2** 0.2 0.4	0.1 0.1 0.1
II	0.1 0.1 0.1 0.1	0.4 0.4 0.4 0.2 0.2 0.2 0.2

* Cl. welchii PB6K NO 3 (Cl. welchii PB6K を 100°C 10分加熱して得た株——前報参照) の保存株を直接 Zeissler 平板にひらいて得たコロニー。

** 数値は α -toxin 値/ml

ニーに比べて毒素原性が強かつたが、第2回実験では全く逆でR型の方がS型より強かつた。即ちR型とS型の毒素原性の強さを左右するものは培地条件如何であると考えられた。

考 案

先に石田¹⁾は自然界の土壤から Cl. welchii を分離するにあつて、加熱により、えらばれてくる菌の毒素原性が著しい影響をうけることをのべ、結局、毒素原性菌が耐熱性が弱いであろうと述べた。その後、中川原²⁾は Cl. novyi を自然界から分離する際に土壤を培養し、ふらん器の中に放置する日数が長ければ長いほど、毒性の弱い菌が分離されること、及び分離材料の土壤を高温で加熱すれば、低温加熱で分離されるよりも毒性の低いものが得られることを述べ、更にまたこれらが菌の孢子形成能と密接に関係すると述べた。私は本報告で多数の株について加熱の影響を述べ、これが環境によつて、かなりの影響をうけるものであることを述べたが、これらのことから一つの菌の子孫の中でも毒性株が熱に対して弱いことが予想された。ふらん器中に放置すると残存するものが無毒であるのも同様な理由によるものであらうと思われる。

しかしながら、Wildführ⁶⁾も述べている如く attenuated strains の毒性はかえりやすく、安定した無毒株をこれらの子孫の中からうることは困難にみえた。この原因は毒性株が常に無毒株より out-growth しやすいことにあると思われる。有毒株2株と無毒株2株を使用して、その増殖速度を検討した成績(表5)では、有毒株が無毒株に比べて growth rate は早か

つた。

これらの加熱弱毒株は加熱により損傷をうけた mutants であるのか、現在の孢子学者⁷⁾⁸⁾⁹⁾のいうようにむしろ孢子形成能のよい原株であるのかは判らない。

Cl. welchii のコロニー型と毒性との関係について Mc Gaughey¹⁰⁾は毒性の点で original strains と異なつたコロニーを、Henriksen¹¹⁾は血清学的に異なつた variants を報告しているが、S型R型の如きコロニー外観と毒性との間には一定の関係は見出されていない。著者もこの点、検討したが、ある条件では常に毒性はR型の方がS型より強かつたが、他の条件では常にS型の方がR型より強かつたという逆の成績を得た。即ち、コロニー型により毒性の異なつた substrains を分離し追究することは不可能と考えられた。

結 論

1) Cl. welchii の有毒 wild strains から加熱耐性の substrains をえらぶと、無毒株が得られた。heat-selection は cooked meat broth で起つたが、用いられた他の培地では起らなかつた。

2) これらの無毒 substrains は継代によつて容易に元の毒性にもどつたが、これは毒性株が無毒株に out-growth する結果と考えられる。

3) S型とR型と毒素原性との間に一定の関係はないものと思われる。

稿を終えるにのぞみ、終始御懇切なる御指導を賜つた恩師西田尚紀教授並びに御協力下さつた山岸高由氏及びその他の教室の方に、心より謝意を表します。

文 献

- 1) 石田勝一： 十全医会誌, 69, 67 (1963).
- 2) 石丸幹夫： 十全医会誌, 70, 印刷中 (1964).
- 3) 村上政夫・山岸高由・西田尚紀： 医学と生物学, 64, 166 (1962).
- 4) Ellner, P. D. : J. Bact., 71, 495 (1946).
- 5) 中川原儀三： 十全医会誌, 70, 1 (1964).
- 6) Wildführ, G. : Z. Immun.forsch., 106, 24 (1949).
- 7) Grelet, N. : J. appl. Bact., 20, 315 (1957).
- 8) Lamanna, C. : Bact. Rev., 16, 90 (1952).
- 9) Murrel, W. G. : Microbial Reaction to Environment, symp. Soc. gen. Microbiol., 11, 100 Cambridge Univ. Press. (1961).
- 10) McGaughey, C. A. : J. Path. Bact., 36, 273 (1933).
- 11) Henriksen, S. D. : Acta pathol. et microbiol. Scandinav., 14, 570 (1937).

Abstract

Toxigenicity of *Clostridium Perfringens* strains, when their substrains were recovered from heat selection, were attenuated in most of the strains examined. The successful heat-selection was found only in chopped meat broth and not in the other media examined. The attenuated toxigenicity was brought back to the original levels in the course of subcultures. This was explained by the outgrowth of toxic cells over the growth of heat-resistant and nontoxic cells of *C. Perfringens*. As another factor influencing toxigenicity, colonial characteristics was discussed, but no certain correlation could be found between them.