

## Cl. novyi の毒素原性に関する研究

## I. Cl. novyi の toxigenic strains の分離について

金沢大学大学院医学研究科細菌学講座(主任: 西田尚紀教授)

中川原儀三

(昭和39年1月8日受付)

わが国において土壤の Clostridia の分布を見る際、Zeissler & Rassfeld<sup>1-6)</sup>の方法に従う場合が多い。その方法は被検材料を肝臓ブイオンの中に投じ、時日の経過と共に加熱温度を次第にあげて分離するとき、自然界から2週目から3週目に最も多く分離されるが<sup>2)</sup>、無毒の Cl. novyi もかなり多く存在することが知られている。

最近この無毒株は Type C と呼ばれているが、Cl. novyi の無毒株の存在については佐々木の他にも従来沢山の人によつて指摘されて来た所である<sup>2)7)8)</sup>。一方 Clostridia の同定には毒素が重要な位置をしめる所から考えて、無毒株と有毒株との関係を明らかにすることが大事であるが、しかしこの無毒株と有毒株との関係は今日に至るも全く判っていない。このような過程の中で、著者の研究室の石田<sup>9)</sup>は Cl. welchii で、真田<sup>10)</sup>は Cl. tetani で被検材料の加熱を強くすることが毒性株を除去する結果となる事実を述べ、このことから更に孢子形成能の強いことが無毒株の重要な因子であること、換言すれば有毒株はこの孢子形成能を失うことによつて生成されると述べ、有毒株と無毒株との関係を細菌生理の上から明らかにした。

毒素の生成が孢子形成能によつて制約されることはその後玉井<sup>11)</sup>らによつて Cl. sordellii についても証明されるに至つたが、この事実が毒素の生成に関して相当にひろい基礎的な立場を示すことから考えて、Cl. novyi を研究するにあつて先ずこの立場より出発することが望ましいと考えられた。

著者は本論文で Zeissler & Rassfeld の方法に従つて Cl. novyi を分離したが、この方法は時日の経過と共に孢子形成能の強い菌をえらぶ原則に一致ものである。この際被分離株の毒性を定量すれば孢子形成能と毒素との関係を明らかにしうるように見えた。このことに関して既に佐々木<sup>2)</sup>の仕事があるが、この中では

両者の関係は必ずしも明らかではない。しかしながら従来分離に携つた多くの研究者たちは、欧米の Zeissler & Rassfeld 法に従わない人<sup>12)13)</sup>(被検材料をある特定の培地に入れて1回だけ分離するという方法をとる研究者)をも含めて、分離に忙しく毒性の分離をなおざりにしがちであるように見える。

著者は先ず Cl. novyi の分離を Zeissler & Rassfeld 法で行ない。その菌の毒性を検討したいと考えたが意外にも従来知られる Cl. novyi の培地は、自然界から沢山分離されてくるものの毒素の産生には必ずしも適さぬ場合が多く、多くの成書に記載される Walbum & Reymann の培地<sup>14)</sup>といえどもこの非難をまねがれ難いものであつた。そこで先ずこの培地を検討して毒素産生の最適条件を決め、ついで被検材料に対しての加熱がそこから分離される菌の毒素産生にいかん影響するかを決めたいと考えた。

## 実験方法

実験材料: 被検材料である土壤は金沢市内及び大学近辺(市内道路、下水、運道場、畑、水田等)からのもので、これら土壤より Cl. novyi 62株を分離した。

菌分離法: 土壤約1gずつ各々2個の50ml容量スクルーキャップつき投薬瓶に30mlの肝・肝ブイオンを入れたものに入れた。一方の肝・肝ブイオンを70°C 10分、他の1つを100°C 10分加熱し、直ちに冷却したのち、37°C 孵卵器で培養した。3日目、7日目、14日目、21日目に各々の肝・肝ブイオンから0.5mlずつとり、中試験管内の肝・肝ブイオンに移植し、更に次の如く加熱した。即ち70°C 10分加熱投薬瓶からとつたものは更に70°C 10分加熱、100°C 10分加熱投薬瓶からとつたものは更に100°C 10分加熱した後、この加熱された培地を更に37°C 孵卵器で48時間培養し、その1白金耳を Nagler の改良した Wein-

Studies on the Toxigenicities of Cl. novyi—I. Isolation of the Toxigenic Strains of Cl. novyi. Gizo Nakagawara, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

berg's V. F. blood agar 平板培地<sup>15)</sup>で分離した。嫌気度を厳重にすることが *Cl. novyi* では必須であったが、このためにはピロガール、無水炭酸ソーダ法<sup>4)</sup>によつた。培養は 37°C 孵卵器で36時間であつた。

*Cl. novyi* のコロニーはレチチナーゼ反応、pearly layer を参考にして分離した。早期培養から分離されたコロニーは他の *Clostridia* と混合していることがあるため、如上の平板培地で再分離を行なつて純粋にした。なお1つの土壌件数から1個の株を分離することを原則とした。

同定：分離した個々の菌について先ず Max Sterne & van Heyningen<sup>16)</sup> の記載に従つて生物学的性状検査を行なつた。検査に用いた培地のペプトンはポリペプトンを使用した。生物学的性状検査の判定は 37°C 7日間培養の後判定した。判定の基準はグルコース分解 (+)、マルトース分解 (+) または (-)、ラクトース分解 (-)、シュクロース分解 (-)、インドール形成 (-)、凝固血清消化 (-)、ゲラチン液化 (+) としたが、インドール形成弱陽性も存在することが報告されている所からして<sup>2)</sup>、著者もこの弱陽性のものを含めた。更に生物学的性状検査で *Cl. novyi* と一致したものについては Oakley<sup>17)</sup> 法より Weinberg's V. F. blood agar 平板培地に A型抗血清 ( $\alpha$ -レチチナーゼ抗血清 (280 units/ml)), B型抗血清 ( $\beta$ -レチチナーゼ抗血清 (27 units/ml)) (英国 Wellcome Res. Lab. 製) の 0.1 ml を半面に塗布してそのレチチナーゼ反応の抑制作用を調べて同定、型判定した。

毒素用培地：毒素用培地としては Walbum & Reymann<sup>14)</sup>、楊<sup>18)</sup>、Wildführ<sup>19)</sup> らのものがあるが、毒素産生の強さが充分でなかつたり、またあるものは沢山の菌の毒素原性を定量的に調べるに適しなかつたりしたので、著者は毒素原性を調べる前に、この菌の毒素産生の至適条件を吟味する要のあることを知つた。その結果最上のものとして著者が考案した方法では標準株 *Cl. novyi* No. 140 は最高  $10^5$  m.l.d./ml の毒素を示した。この培地の詳細は本文で述べることにして次のような成分を含んでいた。即ち肉水にクックミート 5%、ポリペプトン 3%、NaCl 0.5%、最終 pH 7.2 として菌移植直前にマルトース 1%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.5%、チオグリコール酸ナトリウム 0.1% になるように加えた。

毒素の測定：毒素用培地に 37°C 孵卵器で48時間培養した後、培養液を遠心し、上清液にトルエンを加えて1昼夜室温に放置した後トルエンを除去して毒素液を作り、これを10倍稀釈法で1%ペプトン水にて稀釈

し、各稀釈の毒素を2匹のハツカネズミ (体重16~20 mg) の尾静脈内に 0.5 ml ずつ注射し、3日間観察した後、2匹のハツカネズミを死に至らしめた M.L.D. を測定した。時として詳細にする必要のあるときは各段階稀釈間を更に細かく2倍段階稀釈法を行なつて LD<sub>100</sub> を求めた。また毒性のあるものにはそれぞれ抗血清によつて中和されるか否かを確かめた。

## 実験結果

### 実験 I：毒素用培地の検討

Walbum & Reymann<sup>14)</sup>、Wildführ<sup>19)</sup> らの培地で標準株 *Cl. novyi* No. 140 を使用してその追試を行なつたが強毒素をうる事が出来なかつた。Walbum & Reymann の実験は「培地の始発 pH を 8.0 とし、糖を出来る限り除去する (Coli-fermentation で除去する)」ことに特徴があるが、この条件で Pope の digest broth を用いて1日、2日、3日、4日の濾液を検したがいずれも原液で漸くハツカネズミをたおすことが出来るに過ぎなかつた。ついでプロテオゼ・ペプトン (大五栄養 K.K.) の濃度 (2, 4, 6, 10%)、培養温度 (36°C, 34~35°C, 31~32°C, 25~28°C) について試みた。更にまた、Wildführ<sup>19)</sup> にならつて Pope の digest broth に3%にペプトン (ポリペプトン) を加えたのち肝片を加え5日間にわたつて観察したが、その極めて著しい発育にもかかわらず、毒性は依然として  $0 \sim 10^1$  m.l.d./ml にとどまつた。

実験の途次、著者の研究室で使用している継代用のクックミートブロス (5~10%肉量) に糖を加えると  $10^2 \sim 10^3$  m.l.d./ml の毒素を出すことを知つた。そこでグルコースを 0.5% に加えて緩衝液として磷酸ソーダを用い、pH 7.4 とした。培養時間は上述の実験からほぼ24~48時間の間に最高があると思つたので一応以下の実験をすべて48時間培養の後収穫した。

a) 磷酸緩衝液濃度：グルコースを 0.5% に加えた1%ポリペプトン・ブロスに5%にクックドミートを加えて増殖を確保し、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  を 0, 0.1, 0.4, 0.8% に増した。その毒性は上述の順でそれぞれ 400, 800, 1,600, 4,000, 2,000 m.l.d./ml となり磷酸ソーダの効果の大きいことを知つた。従つて以後磷酸ソーダを 0.5% に加えることとした。

b) 肉量：グルコース 0.5%、磷酸ソーダ 0.5%、ポリペプトン 1% に加えたブロスの肉量を 5, 10, 20% に加えたが、5%の肉量の存在は0%に比べて常に優れているが、5%以上に肉を増しても別にそれ以上に好影響を与えなかつた。恐らく *Cl. novyi* の際に

は肉の存在はその増殖の安定性を確保する程度であればよいと思われた。

c) ペプトン濃度: 上述の条件で、ただペプトン濃度だけを 1, 2, 3, 4, 5% と変えるとその毒性は飛躍的に増し、上述の順でそれぞれ 1,600, 4,000, 20,000, 20,000, 8,000 m.l.d./ml となった。従つて以下の実験からすべてに 3% ペプトンを用いることとした。

d) 糖の濃度, 種類: マルトース, グルコース, フラクトースについて 0.5% で上述の条件 (ペプトン 3%, 肉量 5%, 燐酸ソーダ 0.5%) では 20,000, 8,000, 160 m.l.d./ml で マルトースが最もよく、1% の糖では 40,000, 16,000, 200 m.l.d./ml で 1% マルトースが最もよかつた。

e) 温度: 36°C と 30°C の温度について上述の最適条件 (肉量 5%, ポリペプトン (大五) 3%, NaCl 0.5%, マルトース 1% を肉水にとかし、始発 pH 7.4 としたもので 4 日間観察したが、36°C の際は 24, 48, 72, 96 時間では 2 万, 20 万, 20 万, 2 万 m.l.d./ml であつたが、30°C では 20 万, 20 万, 20 万, 20 万 m.l.d./ml であつた。10 倍段階希釈から更にこまかく毒素の分析を行なわなかつたが、温度は 36°C よりやや低い方が望ましいように思えた。

f) 肉から浸出される Lipid の影響: 山岸<sup>20)</sup>らはアルカリ下で肉が加熱されると Cl. welchii の r-毒素の産生が著しく抑えられると述べた。しかしながら Cl. novyi の r-毒素がこのアルカリ環境下で煮沸されることによつて殆んど影響をうけないことが判つた。

従つて爾後上述の成分を含んだ培地を Cl. novyi の毒素産生用培地として使用した。

実験 II: 被検材料の加熱温度並びに日を追つて分離することの分離株の毒素原性に及ぼす影響

即ち上述の条件で 42 土壤件数について 70°C 10 分加熱土壌からの分離と、100°C 10 分加熱土壌からの分離の 2 系列について日を追つて分離した。(実験方法の項参照)

#### a) 70°C 10 分加熱土壌からの分離

表 1 で示される如く 3 日目に土壤件数 42 中 11 の土壤から 11 株を分離した。分離された 11 株のすべてが有毒株 (Type A) で、その毒性は  $10^8$  m.l.d./ml 以上  $10^4$  m.l.d./ml 以下であつた。

7 日目では残りの土壤 31 中 11 の土壤から 11 株分離出来たが、そのすべてが Type A であつた。毒性は  $10^2$  m.l.d./ml 程度で  $10^3$  m.l.d./ml を示すものはひとつもなかつた。

14 日目ではその発見は容易となり、検出率が高く、

表 1 土壤材料 70°C 10 分加熱したものから分離した Cl. novyi の毒素と型との関係

培養日数	分離株数	分離株の毒性 (m.l.d./ml)	備 考
3	11	$10^3$ (11株)	11株: Type A
7	11	$10^2$ (11株)	11株: Type A
14	17	$10^1$ (13株) $10^0$ (1株) 0 (3株)	14株: Type A 3株: Type C
21	3	$10^0$ (1株) 0 (2株)	1株: Type A 2株: Type C

まだ分離されない 20 例の土壤から 17 例の Cl. novyi が発見された。しかし無毒株 (Type C) は 21% にのほり、有毒株 (Type A) の毒性も  $10^2$  m.l.d./ml のものではなく、すべて  $10^1$  m.l.d./ml かまたはそれ以下となつた。

21 日目には 3 例の土壤からすべて発見されたが、このうち 2 株が無毒株 (Type C) であつた。

即ち日を追つて分離すると次第に毒性株が少なくなり、逆に無毒株 (Type C) が分離されることが明白となつた。

#### b) 100°C 10 分加熱土壌からの分離

表 2 (a) で示される如く 3 日目では 42 土壤件数中 5

表 2 (a) 土壤材料 100°C 10 分加熱したものから分離した Cl. novyi の毒素と型との関係

培養日数	分離株数	分離株の毒性 (m.l.d./ml)	備 考
3	5	$10^2$ (4株) $10^1$ (1株)	5株: Type A
7	5	$10^2$ (1株) $10^1$ (3株) $10^0$ (1株)	5株: Type A

の土壤から 5 株を分離することが出来た。そのすべてが有毒株 (Type A) であつたが毒性は  $10^1$  m.l.d./ml から  $10^2$  m.l.d./ml であつた。70°C 10 分加熱土壌からの同日分離に比べてその毒性は低く、 $10^8$  m.l.d./ml のものはなかつた。

7 日目では残りの 37 土壤件数中 5 の土壤から 5 株分離することが出来たが、そのすべては Type A で、毒性は  $10^0$  m.l.d./ml から  $10^2$  m.l.d./ml であつた。これは 70°C 10 分加熱土壌からの同日分離に比べて低い値を示した。即ち  $10^2$  m.l.d./ml が 1 株、 $10^1$  m.l.d./ml が 3 株、 $10^0$  m.l.d./ml が 1 株であつた。

この実験では 100°C 10 分加熱した材料については

表2 (b) 土壤材料 100°C 10分加熱したものから分離した *Cl. Novyi* の毒素と型との関係

培養 日数	分離 株数	分離株の毒性 (m.l.d./ml)	備 考
14	20	10 <sup>2</sup> (6株) 10 <sup>1</sup> (7株) 10 <sup>0</sup> (4株) 0 (3株)	17株 : Type A 3株 : Type C
21	20	10 <sup>1</sup> (9株) 0 (11株)	9株 : Type A 11株 : Type C

14日目、21日目の分離は行なわなかつた。しかし比較検討のため別の材料について14日目、21日目について行なつた実験成績を示すと表2 (b) の如くであつた。即ち20土壤件数について行なつたが、材料を培地に投入してこれを100°C 10分加熱し、更に14日間培養した20土壤件数中、20の土壤から20株分離し、100%の検出率を見たが、そのうち有毒株 (Type A) は17株存在し、10<sup>1</sup>~10<sup>2</sup> m.l.d./ml の毒性を有した。無毒株 (Type C) は3株あつた。

21日目では同じ20土壤件数から20株分離されたが、無毒な株の分離が目立つた。即ち20株中11株が無毒株 (Type C) であり、有毒株 (Type A) は9株で、その毒性はすべて 10<sup>0</sup> m.l.d./ml であつた。

以上のように日を追つて分離すると、その毒素原性の減弱は70°C 10分加熱と100°C 10分加熱のシリーズとも同一の傾向であるが、無毒株の比率はいずれも100°C 10分加熱のものが遙かに多いことを示した。

*Cl. novyi* の検出率は3週目まで行なつた62例について100%であつた。これは従来土壤から25~64%と報告<sup>2)</sup>されているものと大きく異なる所であつた。

### 考 案

*Clostridia* では、その同定の基準となるべき生物学的性状が種々異なつて判定に困る場合が少なくない。この中で *Cl. novyi* は諸研究者<sup>1)2)16)22)23)24)25)</sup>によつてほぼ一致した性状となつており、著者もこれに従つた。ただここで問題となるのは、*Cl. novyi* は一般に凝固血清消化能がないとされているが、L. Ds. Smith は Type B の中で消化陽性のものがいづらかあると報告<sup>22)</sup>していることである。しかしながら著者は *Cl. novyi* 同定の基準として凝固血清消化能陽性のものを除外したから、この際 Type B を除外してのではないかという疑いが残るが、教室保管の Type B 3株 (L. Ds. Smith より送られた1株を含めて) はいずれも著者の条件下では凝固血清消化能陰性であるし、またたとえ陽性であるとしても強い消化能をもつ

ものとは思われないのに対して著者が除外したものはいずれも強くこれを消化しているのに対して著者がこの方法で Type B を除外しているとは思へなかつた。加えてこれらの株は Type B 特有のピンポイント・コロニー及び「pearly layer を伴わぬレチチナーゼ反応」などを欠いているから Type B 或いは Type D でないことは明白である。

従来土壤から分離された *Cl. novyi* の型判定を試みた報告はないが、著者が土壤から分離したすべての株はA型か或いはC型で、B型或いはD型は発見することは出来なかつた。(著者の平板培地条件ではB型及びD型はよく発育し、特にB型、D型の発育に関しては agar をかぶせるなどして嫌気度を嚴重にする必要はなかつた。)

ついで著者がインドール微弱陽性のものもつたのは著者の教室の佐々木<sup>2)</sup>が土壤からの *Cl. novyi* 分離株の中で18.6%にわたつて陽性のものがあると述べているからである。

以上の分離の中で著者は Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar 平板培地を使用したのが、この培地では *Cl. novyi* の発育が従来の Zeissler 平板培地に比べてよいばかりでなく、その作る pearly layer を伴うレチチナーゼ反応は著しくこの菌の検出を補けるのであつて、このことが従来の Zeissler & Rassfeld 法を使用したものに比べて格段の検出率を示す原因と思われる。(Zeissler & Rassfeld 法に従わぬ英・米・仏の学者は材料について1回だけの分離しか試みていないから分離率が低いのは当然である。)

これらの分離株の毒素原性に関しては従来研究者の data はこれを欠いているが、若しあつたとしても有無について記載する程度で定量した成績は全くなかつた。しかしながら、先ずこの定量を試みるに當つて意外にもこの毒素用培地として最も引用される Walbum & Reymann の培地は自然界から分離されるこれらの株 (Type A) の毒素産生用の培地としては毒素価があまりに低いことが判つた。(著者の培地ではA型の No. 140, 分離株のA型 37101, 37105, 37110 はそれぞれ 10<sup>5</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>0</sup> m.l.d./ml を示したが、Walbum & Reymann の培地では 10<sup>0</sup>, 10<sup>0</sup>, 10<sup>0</sup>, 10<sup>0</sup> を示すに過ぎない。)

この際 Walbum & Reymann が最高の毒素をうるために糖を加えないばかりでなく、醗酵によつて含まれる糖を除いているのに対して著者が1%に糖を加えているという著しい相違がどこに由来するかは興味ふかい。Oakley ら<sup>17)</sup>も型判定には fermented broth を用いているが、しかし著者の培地を用いることが、土

壤から最も多く分離されるA型の毒素原性を検索するには遙かに能率がよいことが判つた。

このように培地によつて毒性の検出度が異なりC型の判定は著しく変動するばかりでなく著者の成績から型としての独立性は再検討を要することが判つた。

土壤から分離されたこれらの型のうちC型がA型の孢子形成株であるに過ぎないのではないかと考えられるに至つたが、上述の実験で日を追つて分離すると毒性株が次第に除去されて行く *mechanisim* は毒性菌の生成を考える上に興味がある。これらの毒性菌は日を追つて分離して行くうちに除去されて行くものと思われ、生き残るものが孢子形成能の強いものであることが想像される。

孢子形成能の強いものが毒性が弱いのではないかとこの想定は同一条件で温度だけを異ならしめた2つの場合即ち、一方を70°C 10分加熱、他方を100°C 10分加熱で分離したとき100°C 10分加熱に耐えるものが毒性が弱いということからも推定される。これと等しい現象は *Cl. welchii*<sup>26)</sup> や *Cl. tetani*<sup>27)</sup> でもいろいろの毒素原性の菌をうるために段階的な加熱を加えた際に見る所であつた。これらについては後報で更に述べられるであろう。

## 結 論

1) *Cl. novyi* Type A の毒素産生の条件を吟味し、*Routine Work* に用いうる安定した条件を規定すると共に、強毒素産生の条件を確定した。

2) 従来わが国で用いられた *Zeissler & Rassfeld* 法による分離法を *Cl. novyi* の分離に応用すると、日を追つて分離される *Cl. novyi* の毒素産生が弱くなることが判つた。即ち3日目分離では  $10^3$  m.l.d./ml 程度、1週目では  $10^1 \sim 10^2$  m.l.d./ml、2週目  $0 \sim 10^2$  m.l.d./ml、3週目  $0 \sim 10^1$  m.l.d./ml であつた。

3) 土壤の加熱を増せば、毒素の弱い株が分離された。従つて逐次的に分離する方法に加えて加熱を上げて行くことは、強い毒素原性株を消去する結果となることが判つた。

4) *Nagler* の改良した *Weinberg's V. F. bloodagar* 平板培地を使用して土壤件数62例の土壤約1g中には100%に *Cl. novyi* を証明することが出来た。

稿を終るにあたり、絶えず御熱心に御指導と御鞭撻下さいました西田尚紀教授に心から御礼申し上げます。また本研究の機会を与えて下さつた金大医学部第二外科本庄一夫教授に深く感謝の意を表します。並びに本実験に際し、貴重な菌株を分与下さいました伝染病研究所宮崎正之助教授に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) *Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.* : *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*. 10, 35, Gustav Fischer, Jena (1930).
- 2) 佐々木茂雄 : 十全会誌, 37 (12), 3016 (昭7), 38 (1), 191 (昭8).
- 3) 納富 亨 : 長崎医学会誌, 32(1), 315 (1957).
- 4) 谷 友次 : 医学微生物学, P. 352, 南山堂, 東京, (1954).
- 5) 今川知和 : 医学研究, 14(16), 1571 (昭15).
- 6) 井上広吉 : 満州医誌, 26(3), 519 (昭12).
- 7) *Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.* : *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*. 4, 1114, Gustav Fischer, Jena (1930).
- 8) *McCoy, E. & McClung, L. S.* : *Bacteriol. Reviews*, 2(1), 47 (1938).
- 9) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 62(6), 151 (1962).
- 10) 真田一郎 : 医学と生物学, 64(6), 174 (1962).
- 11) 玉井健三・西田尚紀 : 医学と生物学, 63(3), 77 (1962).
- 12) *MacLennan J. D.* : *Lancet* II, 63, 94, 123 (1943).
- 13) *Reed, G. B.* : *Bacterial and Mycotic Infections of Man* (Dubos) 2nd Ed, P. 389, J. B. Lippincott Co., Philade (1952).
- 14) *Walburn, L. E. & Reymann, G. C.* : *J. Path & Bact.*, 44, 379 (1937).
- 15) *Nagler, F. P. O.* : *Nature*, 115, 496 (1944).
- 16) *Max sterne & van Heyningen, W. E.* : *Bacterial and Mycotic Infections of Man* (Dubos) 3rd Ed, P. 343, J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1958).
- 17) *Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Clarke, P. H.* : *J. Gen. Microbiol.*, 1, 91 (1947).
- 18) 楊 明元 : 日細菌誌, 13, 149 (1937).
- 19) *Wildführ, G.* : *Z. Hyg.*, 130, 521 (1950).
- 20) 山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 65(4), 83 (1962).
- 21) *MacLennan, J. D.* : *Bacteriol. Reviews*, 26(2), 214 (1962).
- 22) *Smith, L. Ds.* : *Introduction to the Pathogenic Anaerobes*, 1st ed, P. 22, The Univ, Chicago Press, Chicago (1955).
- 23) *Willis, A. T.* : *Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine*, P. 58. Butterworth & Co. LTD., London (1960).
- 24) *Winkel, S.* : *Mikrobiologische und Serologische Diagnostik*, P. 102, Gustav Fischer, Stuttgart (1955).
- 25) *Murray, & N. R. Smith, [ed].* : *Bergey's*

Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed, P. 652, R. S. Breed, E. G. D. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1957). 26) 石田勝一・

山岸高由・河合康守・西田尚紀 : 医学と生物学, 62(2), 41 (1962). 27) 真田一郎 : 医学と生物学, 65(5), 96 (1962).

#### Abstract

1. Strains of *Cl. novyi* were isolated from the soil specimens cultivated in liver broth for various lengths of time and their toxigenicities were examined. It was revealed that the longer the incubation time, the less toxigenic strains were isolated.

2. Strains of *Cl. novyi* were isolated from the soil specimens heated at 70°C or 100°C for 10 min. and their toxigenicities were examined. The findings obtained suggested that toxigenic strains were sensitive to the higher temperature of heating than the less toxigenic strains.

3. These findings implied that the toxigenicities of *Cl. novyi* were closely related to their sporulating potencies.

---