

Cl. novyi の毒素原性に関する研究

II. Cl. novyi の毒素原性と孢子形成能について

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13日受付)

前報¹⁾で著者は強毒のCl. novyi 株を土壤材料から分離する方法について述べ、従来用いられて来た Zeissler & Rassfeld 法²⁾が強毒株の分離には不適であると述べた。培養日数が長ければ長いほど、及びここから分離する際に用いる前処置の加熱が高ければ高いほど (Zeissler & Rassfeld 法では日を追って高くする) 強毒株が消去されて分離されなくなると述べた。この方法は日を追って孢子形成能の菌を選んでいるのではないかと考えられたが、Clostridia の孢子形成能が毒素原性に及ぼす重大な影響力³⁾⁴⁾⁵⁾から考えて Cl. novyi の毒性の強弱或いは欠如をこの面から考察することが必要ではないかと考え、実験した成績について報告する。

実験方法

使用株: 伝研から分与をうけた Cl. novyi No. 140, 著者が土壤から分離した No. 37101, 37102, 37103, 37104, 37105, 37106, 37107, 37109, 37110 の9株 (3日目に分離し, 材料を70°C 10分加熱して分離したことを意味する), No. 77101, 77102, 77103, 77104, 77105 の5株 (7日目に分離し, 材料を70°C 10分加熱して分離した株) 及び No. 3-1101, 3-1102, 3-1103, 3-1104, 3-1105 の5株 (3週目に分離し, 材料を100°C 10分加熱して分離した株)。合計20株を用いて行なつた。(前報参照)

毒素用培地の製法及び菌の毒素原性測定: 前報¹⁾に従つた。

熱耐性の定性的試験: 諸種温度における熱耐性菌をうるために、1%マルトース加肉カスブイオンに48時間培養した後、これから数本の小試験管内に肉カスをまじえないように1mlずつとり、80°C, 90°C, 100°C に各10分加熱し、更にまた100°C 20分, 100°C 30分, 100°C 50分, 100°C 100分加熱した後、冷却し、

直ちにその0.5mlを1%マルトース加肉カスブイオンに加え、各々を48時間培養してその熱耐性菌の存否を判定した。

孢子形成能の定量的分析: 諸種温度における熱耐性菌及び原株を毒素用培地に96時間培養した後グラム染色法によつて染色し、20視野の菌総数に対する孢子 (孢子と同形ながらなおグラム陽性に染まるものを含めた。) の比率を計算した。菌総数は20視野で1,000~3,000までの菌数を含むように1視野の菌を調節した。孢子形成能の意義については本文中に更に詳述する。

型分類: Oakley 法⁶⁾に従つて、Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar 平板培地の半面に抗血清を塗布して、レチチナーゼ反応で判定した。使用に供した判定用血清 (抗A型, 抗B型レチチナーゼ血清) は三光純薬を経て Burroughs Wellcome Res. Lab. (英国) より購入した。

実験結果

実験1: 日を追って分離した株の孢子形成能

3日目 (材料70°C 10分加熱) に分離した No. 37101~5 の5株, 7日目 (材料を70°C 10分加熱) に分離した No. 77101~5 の5株, 3週目 (材料を100°C 10分加熱) に分離した No. 3-1101~5 の5株についてそれぞれの孢子形成能を調べた成績を表1に示した。孢子形成能の測定と共に毒性をも再度測定して孢子形成能との関係を調べた。即ち No. 37101~5 の3日目分離の5株はすべて 10^3 レベルの m.l.d./ml を示したが、その孢子形成能は0~0.1%であつた。No. 77101~5 の7日目分離の5株のすべては 10^3 m.l.d./ml で 10^3 m.l.d./ml のものはなかつたが、その孢子形成能は5.2~14.4%であつた。これはいずれもA型と判定された。一方 No. 3-1101~5 の3週目分離の5株は

Studies on the Toxigenicities of Cl. novyi—II. On the Relationship between the Toxigenicities and Sporulating Potencies of Cl. novyi. Gizo Nakagawara, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

表1 分離条件(前培養期間, 加熱温度)の被分離株の孢子形成能及び毒素原性に及ぼす影響

分離株記号	分離条件 (前報参照)	孢子形成能		毒素 (m.l.d./ml)
		孢子数/菌総数	率 (%)	
37101	前培養 3 日 70°C 10分加熱	1/1650	0.06	10 ³
37102		2/3202	0.08	10 ³
37103		0/2406	0	10 ³
37104		0/1232	0	10 ³
37105		2/1562	0.1	10 ³
77101	前培養 7 日 70°C 10分加熱	231/1622	14.2	10 ²
77102		199/2146	9.2	10 ²
77103		245/2232	10.9	10 ²
77104		102/1245	8.1	10 ²
77105		92/1741	5.2	10 ²
3-1101	前培養 21 日 100°C 10分加熱	642/1622	39.5	0
3-1102		321/932	34.4	0
3-1103		462/1432	32.2	0
3-1104		388/1262	31.2	0
3-1105		762/1633	46.6	0

すべて毒素原性を欠き, その孢子形成能は31.2~46.6%であつた. 毒素による型分類上, 表1のようにType Cに属した. このことから日を追つて分離することにより孢子形成能の強い株を選択していることが判つた. 以上の事実は毒素原性に孢子形成能が関与していることを暗示したから, 著者はこの事実を一層明らかにするために単一クローン内で種々な孢子形成能をもつ株を得て毒素原性との関係を分析した.

実験2: Cl. novyi No. 140の種々の耐熱性プロジェニーの毒素原性及び孢子形成能

Cl. novyi No. 140の種々の孢子形成能をもつプロジェニーをうるため次の如き操作を行なつた. 即ち該菌を1%マルトース加肉カスブイオンに48時間培養した後, これを数本の小試験管に1mlずつ分注し, 80°C 10分加熱, 100°C 10分加熱, 100°C 20分加熱, 100°C 100分加熱してそれぞれの熱耐性菌をえらぶと表2に示す如き孢子形成能をもつ菌をえらぶことが出来た. このような孢子形成能をもつ菌の毒素原性は表2の如く加熱温度及び時間を増して行くに従つてその耐性株の毒素原性が減弱し, 100°C 100分加熱耐性菌は毒素原性を消失し, 表2のように型分類によりType Cとなつた. しかしながらこの現象はType Aの中に万一Type Cが混入していることによるものかも知れぬと考え, 次のような実験を試みた. 10⁴~10⁵ m.l.d./mlをもつCl. novyi No. 140をNaglerの改良したWeinberg's V. F. blood agar平板培地に

表2 Cl. novyi No. 140のheat-resistant progeniesの毒素原性及び孢子形成能

	孢子形成能		毒素 (m.l.d./ml)	型分類
	孢子数 /菌総数	率 (%)		
対 照	2/6406	0.03	10 ⁵	A
80°C 10分耐性株	1038/4921	21.09	10 ⁴	A
100°C 10分耐性株	770/1994	38.61	10 ²	A
100°C 20分耐性株	545/1326	41.1	10 ¹	A
100°C 100分耐性株	735/1650	44.5	0	C

にひらき, 37°C 36時間培養した後, 10個のコロニーから10株のプロジェニーを得てこれをそれぞれの肝・肝ブイオンに1代継代したのち, 毒素用培地に移植した. その個々の毒素原性は表3の如く10⁴~10⁵ m.l.d./mlを示した. この10株を1%マルトース加肉カスブイオンに48時間培養した後, 所定の如く100°C 100分加熱して, そこから耐えた菌を上記述べたと同様に, 毒素用培地にうえ, この毒性を調べた. その結果表3に見る如く10株のうち8株は毒素原性を全く失い, 他の2株は僅かに10⁰ m.l.d./mlを示すに過ぎぬことが判つた. 即ち10株の個々の菌を100°C 100分加熱して, 耐性の菌を各々のプロジェニーからえらば, 表3のように, そのすべては毒素原性を欠くか, もしくは欠如に近い状態になつていたことが判つた. この事実は, Type CがNo. 140というType Aの株の中に混入しているのではないかという考えを否定するも

表3 平板培地から10個のコロニーの毒素原性と各株の100°C 100分熱耐性のプロジェニ-の毒素原性(使用株, Cl. novyi No. 140)

No.	原株 (m.l.d./ml)	その耐熱性株 (m.l.d./ml)
1	10 ⁵	0
2	10 ⁵	10 ⁰
3	10 ⁴	0
4	10 ⁵	0
5	10 ⁵	10 ⁰
6	10 ⁴	0
7	10 ⁴	0
8	10 ⁵	0
9	10 ⁵	0
10	10 ⁵	0

のである。従つて Zeissler & Rassfeld 法に従つて分離して行くことは、実験1で示したようにまさしく孢子形成菌をえらぶことによつて無毒株もしくは無毒に近い株をえらんでいることにほかならない。

以上は No. 140 を用いて行なつたが、他の株で加熱選択によつてこのようにA型からC型菌を得られるかどうかを知るために次の実験を行なつた。

実験3: Cl. novyi Type A の wild strains からC型菌の選択について

5株を用いて行つたが、逐次的に以下述べることにする。先ず No. 37101 を毒素用培地に48時間培養し、この培養液を1ml ずつ数本の小試験管にとり、対照及

び100°C 10分、30分か或いは50分、及び100分と加熱してここから耐えて残つたそれぞれの耐性株の毒素原性をしらべると、表4に示す如く、10⁸m.l.d./ml の毒性を示す原株から完全に毒素原性を失つた株をうることが出来た。この時の孢子形成能はそれぞれ0, 8.2, 22.1, 37.4%であつた。同じことは表4に併記したようにNo. 37102, 37103, 37104, 37105 の4株についても見る事が出来た。これら5株の無毒化株はすべて Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar 平板培地では Pearly layer (E-toxin による) を欠き、Type C であることが確認された。この事実は実験2で Cl. novyi No. 140 を用いて証明したが、ここでは更に試みた5株のすべてにこのことを証明することが出来た。かくてこの現象は Cl. novyi に恐らくは普遍的な現象であろうことが判つた。

実験4: 保存中における弱毒化と孢子形成能との関係

上述の実験では加熱によつて孢子形成菌を選択したのであるが、実験室の中では保存培地の中に長く保存した際にも孢子形成菌が選択をうけて残ることが当然予想される。長く保存した際に弱毒株が現われることについては日常よく経験する所であるが、著者は上述のメカニズムによつて孢子形成能の強い株がえらばれて、その結果弱毒株が現われるのではないかと考え実験を試みた。そこで分離時に毒性及び孢子形成能を測定し、1%マルトース加クックトミートブローにはほぼ6カ月間放置したのち孢子形成能及びその毒性を調

表4 分離株の heat-resistant progenies の毒素原性及び孢子形成能

使用株 No.	加熱温度時間	孢子形成能		毒素 (m.l.d./ml)	型分類
		孢子能/菌総数	率(%)		
37101	対 照	0	0	10 ⁸	A
	100°C 10分耐性株	168/2036	8.2	10 ¹	A
	" 50分 "	555/2401	23.1	10 ⁰	A
	" 100分 "	542/1443	37.4	0	C
37102	対 照	0	0	10 ⁸	A
	100°C 10分耐性株	252/2120	11.8	10 ²	A
	" 30分 "	421/2234	14.3	10 ⁰	A
	" 100分 "	442/1231	35.8	0	C
37103	対 照	0	0	10 ⁸	A
	100°C 10分耐性株	220/3074	7.1	10 ²	A
	" 30分 "	240/1114	21.5	10 ⁰	A
	" 100分 "	432/7720	55.9	0	C
37104	対 照	0	0	10 ⁸	A
	100°C 10分耐性株	341/3612	9.4	10 ⁰	A
	" 50分 "	721/2224	32.4	0	C
37105	対 照	0	0	10 ⁸	A
	100°C 10分耐性株	120/1280	9.3	10 ²	A
	" 100分 "	682/2132	31.9	0	C

表5 胞子形成能と毒性原性 (分離時と約6カ月間放置との比較)

strain No.	分 離 時			6 カ月間保存放置後		
	毒 素 (m.l.d./ml)	胞子形成能		毒 素 (m.l.d./ml)	胞子形成能	
		胞子/総菌数	率 (%)		胞子/総菌数	率 (%)
37101	10 ³	1/1650	0.06	10 ²	75/1505	4.98
37102	10 ³	2/2302	0.08	10 ¹	533/2221	23.99
37103	10 ³	0/2406	0	10 ²	116/2697	4.3
37104	10 ³	0/1232	0	10 ²	264/1922	13.8
37105	10 ³	2/1562	0.1	10 ²	46/1108	4.15
37106	10 ³	—	—	10 ²	184/931	19.76
37107	10 ³	—	—	10 ²	144/1326	10.84
37109	10 ³	—	—	10 ²	224/2442	9.17
37110	10 ³	—	—	10 ²	105/2151	4.88

べた。厳格にいつて胞子形成能を調べる培地は同一種類の培地でなるべく同一時期に作った同一ロットのものが望ましいが、6カ月間同一培地を保存しているわけにはいかないためにこの際は異なつたロットのものを使用した。表5に示す如く、菌としては10³ m.l.d./ml レベルのもの9株を用いたが、6カ月間保存によつてその毒性は1株を除いて10² m.l.d./ml レベルに下つた。1株のみは10¹ m.l.d./ml であつた。10² m.l.d./ml レベルに下つたもののうち4株をえらびその胞子形成能を調べて見ると、前には殆んど胞子形成能を見ることになかつたこれらの株(0~0.1%)は4.15~13.8%の胞子形成能を示すことが判つた。10¹ m.l.d./ml レベルのものは23.99%の胞子形成能を示した。

以上の事実は保存中にも胞子形成株への選択による毒性菌の淘汰が行なわれていることを示すものと思われる。

実験5: 胞子形成能の意義についての吟味

既に石田⁸⁾、玉井⁹⁾、真田¹⁰⁾らが胞子形成能について報告しているのでここに繰り返す必要はないように思えるが、以上の実験にとつては重要な意義をもつもので、彼らの結論をここに引用し、且つまた念のために著者の追試した成績を付記したい。彼らによれば胞子形成能を90°C 熱耐性菌数/総菌数として **Most Probable Number** で示し、例えば「10⁸の総菌数中10² 或いは10³などの熱耐性菌をもつ株とはその個々の菌細胞が主として10⁸中10² 或いは10³の胞子を作る能力をもつものからなること」を意味し、決して「10² 或いは10³の胞子形成菌と爾他の非胞子形成菌というように genitic に明確な区別をもつものからなること」を意味しない。著者はこのような耐熱性菌を **Most Probable Number** によつて測定するかわりに直接

Spore の数をかぞえて検討したが、その意味する胞子形成能に関しては上述と異なるものでないことが判つ

表6 分離株 (No. 3-1101, 77101, 37101) を用いて平板培地から10個のコロニーの胞子形成能及び毒素原性

原 株	コロニー No.	胞子形成能 (%)	毒 素 (m.l.d./ml)
3-1101 胞子形成能 40.9% 毒素原性 0	1	50	0
	2	54	0
	3	61	0
	4	57	0
	5	56	0
	6	50	0
	7	51	0
	8	50	0
	9	46	0
	10	47	0
77101 胞子形成能 13.03% 毒素原性 10 ² m.l.d./ml.	1	21	10 ²
	2	25	10 ²
	3	17	10 ²
	4	21	10 ²
	5	21	10 ²
	6	21	10 ²
	7	20	10 ²
	8	24	10 ²
	9	20	10 ²
	10	20	10 ²
37101 胞子形成能 0 毒素原性 10 ³ m.l.d./ml.	1	0	10 ³
	2	0	10 ³
	3	3	10 ³
	4	0	10 ³
	5	2	10 ³
	6	0	10 ³
	7	0	10 ³
	8	0	10 ²
	9	0	10 ³
	10	0	10 ³

た。

即ち表6のように、孢子形成能の異なつた No. 3-1101, 77101 及び 37101 をそれぞれ Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar 平板培地にひらきそのプロジェニー10をひろい、その孢子形成能と毒素原性を調べた。その結果 No. 3-1101 (毒性なし、孢子形成能40.9%) のプロジェニー10株はすべて46~61%の間にあり、No. 77101 (10^8 m.l.d./ml の毒性をもち13.4%の孢子形成能) のプロジェニーのすべて17~25%の間にあり、No. 37101 (10^8 m.l.d./ml の毒性、孢子形成能0%) のプロジェニーのすべては0~3%の間にあることを知つた。孢子形成能の比較は同一ロットの培地が望ましいが、この際は違つたロットのものを用いたために原株よりどの群のプロジェニーもやや高い値を示したものと思われる。以上の実験成績で孢子形成能13.03%といつたときそれは13.03%の孢子形成菌と86.97%の非形成菌からなるのではなく、同一製作ロットで同一時に調べれば、個々の菌細胞が13.03%前後の孢子形成能を示す菌(実験では上述の理由から17~25%の菌)から主としてなることを意味する。No.3-1101 が40.9%の孢子形成能をもつというとき、それは40.9%前後の孢子形成能を示す個々の菌(上述の条件下では46~61%となつた)から主としてなることを意味し、0%のものは0%の孢子形成能を示す個々の菌(上述の条件下では0~3%)から主としてなることを意味した。

考 案

70°C 10分加熱した土壌から3日目で分離を行なえば、そのすべてが 10^8 m.l.d./ml レベルの毒性をもち、これより孢子形成能よい 10^2 m.l.d./ml の菌や 10^0 m.l.d./ml の菌などが分離されないことは奇異であり、このことは7日目で分離する際にも14日目に分離する際にも見られた所で非常に奇異に思えるが、これと似た現象は著者の研究室で、いままで Cl. welchii¹⁰⁾ や Cl. tetani⁴⁾ で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常に(多少、程度の差はあるが)見る所であつた。恐らく自然界では、毒素原性の強い菌ほど数多く存在し、且つこの菌ほど残存力や耐熱性(孢子形成力)が弱いということに原因すると思われる。この新しい発見事実は従来 Clostridia の変化しやすい毒素原性を考える上においてすこぶる有意義のように見える。例えば、Wildführ は Clostridia の毒素原性は前培養の時間、前培養の種類によつて著しく影響されると述べているが¹¹⁾、この事実は如上の毒素原性の強い菌が選択除去されやすいことによると

思われる。

孢子形成能が毒素の生成の上に重要な位置をしめることは既に Cl. welchii³⁾⁸⁾、Cl. tetani⁴⁾⁹⁾、Cl. sordelli⁵⁾¹²⁾ で証明されて来たことであつて、Clostridia においてその毒素の生成の上に相当ひろい基盤をもつていて、Cl. novyi もこの基盤の上にたつていてと考えられる。

以上述べたように孢子形成能と毒素原性とは極めて関係が深く、その毒性を支配する最も重要な因子であることは疑いを入れないが、別の因子の存在も想定されないわけではない。即ち表2で Cl. novyi No. 140 の孢子形成能と毒性との関係を見ると、孢子形成能21.09%を示しながら毒素原性が 10^4 m.l.d./ml であり、41.1%の孢子形成能を示すものは 10^1 m.l.d./ml の毒素原性を示した。一方表4で wild strains の孢子形成能と毒素原性を見ると、No. 37101 では23.1%の孢子形成能を有しながら 10^0 m.l.d./ml の毒素原性を示した。このように1つの株のクローンについては孢子形成能と毒素原性との間に一定の関係が成立するが、個々の菌株相互の間では毒性と孢子形成能には全くには一致するものでないことが暗示された。

結 論

1) 早期培養(3日間培養)の試料より低温加熱(70°C 10分)で分離した Cl. novyi 株は強い毒素原性(10^8 m.l.d./ml)を示し、その孢子形成能が弱かつた。一方陣旧培養(21日間)高温加熱(100°C 10分)で分離した株はすべて毒性を欠き、Type C に属し、その孢子形成能が強かつた。

2) Cl. novyi の代表株 No. 140 のクローン内でも耐熱性の強いプロジェニーをえらぶことによつて容易にA型よりC型に変えることが判つた。このことは分離5株でも証明することが出来た。

3) 実験室内で保存培地に保存すると毒性が減弱したが、この際孢子形成能の強い株が選択されることが判つた。

稿を終るにあたり、絶えず御熱心に御指指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感謝致します。

文 献

- 1) 中川原儀三：第I報，十全医会誌。印刷中，(1964)。 2) Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 10, 35, Gustav Fischer, Jena (1930).

- 3) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 62(4), 89 (1962). 4) 真田一郎 : 医学と生物学, 65(5), 96 (1962). 5) 玉井健三・西田尚紀 : 医学と生物学, 63(3), 77 (1962). 6) Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Clarke, P. H. : J. Gen. Microbiol. 1, 91 (1947). 7) Nagler, F. P. O. : Nature. 115, 496 (1944). 8) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 62(6), 151 (1962). 9) 真田一郎 : 医学と生物学, 66(6), 297(1963). 10) 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). 11) G. Wildführ : Z. Hyg. 130, 529 (1950). 12) 玉井健三・西田尚紀 : 医学と生物学, 64(4), 115 (1962).

Abstract

The relationship between the toxigenicities and sporulating potencies of *Cl. novyi* was analyzed. The results obtained were as follows;

1. The toxigenic strains of *Cl. novyi* were of distinctively weaker sporulating potency than the non-toxigenic strains.

2. The selection of heat-resistant progenies among the clones of the six strains employed resulted in isolating non-toxigenic progenies.

3. The strains of *Cl. novyi*, when stocked in the laboratory for 6 months, were disclosed to be attenuated strains which possessed stronger sporulating potencies.