

Cl. novyi の毒素原性に関する研究

Ⅲ. Cl. novyi type B No. 1789株における型の変異について

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17日受付)

Cl. novyi は Type A, B, C, D とに分けられている¹⁾。このうちA型(有毒株)とC型(無毒株)は土壤から容易に分離されることを前述したが²⁾、その後の研究でC型はA型の孢子形成能の強いものに過ぎないことが明らかとなった³⁾。著者の経験では土壤から Cl. novyi の分離を試みて他のB型及びD型が発見されることは殆んどないように見えるが、L. Ds. Smith⁴⁾は動物体内の実際の感染から Cl. novyi Type Bが発見されることはしばしばであると述べている。著者は Type B と Type A が如何なる関係にあるか関心をもっているうちに偶然手元に保管中の Type B が Type A と Type B の中間とも思われるレチチナーゼ反応及びコロニー形態を示すことに気づいた。そのうち更に継代を繰り返して行くうちにこの株の中から Type A 特有の pearly layer を伴うレチチナーゼ反応を示すものと先述の Type B と Type A の中間様のコロニー (pearly layer を伴わぬレチチナーゼ反応を示す) がまじつて現われるに至った。

これらの不可解な現象を検討するにあたって当然、Type B の中に Type A が誤つて混入されたのではないかということが最も問題となつたが、実験を進めて行くうちに、混入したことが推定され、この現象は或いはBとA型との関係を明らかにする手がかりともなるかと考えた。

一方著者の同僚⁵⁾⁶⁾⁷⁾は Clostridia の毒素の生成に関して孢子形成能が支配的に重要な位置をしめていることについてこれまでたびたび述べて来たし、著者も Cl. novyi でそのC型がA型の孢子形成能に過ぎぬことについて述べた³⁾。これらの研究は「孢子形成能が毒素原性の強弱に支配的に関係する」ことを示したが、著者は上述の不可解な現象に遭遇して、この現象は孢子形成能が毒素原性に量的のみならず質的に影響することによつて起されるのではなからうかと推定す

るに至つた。このような推定は未だかつて考えられたことのないものであるけれども、孢子形成能の毒素原性の上にもつ重要な意義から考えて、本報では如上の新視野から、問題の現象を含んでA型、B型の関係について検討した成績について述べる。

実験方法

使用株: 問題の株は Cl. novyi No. 1789 で Wellcome Res. Lab. より Type B として1963年始め送付された株で、受理直後 Wellcome Res. Lab. 作製の Type A, B の抗血清で同定して Type B であることを確かめたものである。この株を肝・肝ブイオンを含む数本の中試験管内に保存したが、その殆んどが Type A と Type B の全く中間の様相を呈する mutant となつた。その性状の詳細については後述するが、著者はこの株を以下の論文で Cl. novyi No. 1789-M₁ と呼ぶこととした。

その他に使用した株は Wellcome Res. Lab. より送付された No. 1789 原株 (Type B), No. 1787 (Type B), No. 3631 (Type D), No. 3630 (Type D)。

L. Ds. Smith (米国) より送付されたB型菌(仮に Sm-B と名づけた)、D型菌(仮に Sm-D と名づけた)。

伝研から分与をうけた Cl. novyi No. 140 (Type A)。著者が土壤から分離した No. 37101 (Type A), No. 37103 (Type A が室温保存で Type C となつた), No. 4-1103 (Type C), No. 4-1104 (Type C)。

菌の毒素原性測定及び毒素用培地の製法: 前報²⁾と同様であるが、菌移植直前に加える糖はグルコース(1%になるように)を加えた。(マルトースでは Type B の安定した発育を得がたかつた。)

孢子形成能の測定: 毒素用培地に48時間培養の 1ml の総菌数及びその中の 80°C 30分加熱または 100°C

Studies of the Toxigenicities of Cl. novyi—Ⅲ. On the Type Variation of Cl. novyi Type B No. 1789. Gizo Nakagawara, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

10分加熱耐性菌のものを測ることによつて行なわれたが、その意味及び詳細な方法は著者自身を含めて研究の同僚によつてたびたび述べられている³⁾⁵⁾⁶⁾。

型分類: Oakley 法⁷⁾に従つた。

実験結果

実験1: No. 1789 (Type B) における変異

No. 1789 (Type B) を数株に分けて保存したが、一部の保存株を除いてその殆んどは Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar⁸⁾ の上で、そのすべてのコロニーがA型とB型の中間ともいふべき様相を呈することを発見した。即ちそのコロニーは Type B の示すピンポイント・コロニーではなく Type A の如き大きさであるが、コロニーの暈は Type A より遙かに大きく、pearly layer を欠いていた。上述の如くこの株を Cl. novyi 1789-M₁ と名づけた。これはA型の γ -抗血清によつて殆んど抑えられたが(幾分抑えられない)、B型の抗血清によつても少し抑えられた。(抑えられる度はA型抗血清より弱い)その顕微鏡像はB型(B. Gigas)特有の chain と大きさをもたず、むしろ Type A に近いように見えた。この株は更に保存するうちに、この中間様コロニー (No. 1789-M₁) の中に Type A のコロニーに近いものを生じて来た。

このような現象はB型の中にA型が混じたことによるものでなからうかと先ず考えられたから、このようなことのないことを証明するために次の如き実験を行なつた。即ち保存培地(肝・肝ブイオン)に保存した No.1789-M₁ を Nagler の改良した Weinberg's V. F. blood agar 平板培地にひらき、A型に近いコロニーをひろい、再び平板培地にひろげた。この際すべてのコロニーは Type A のコロニーとなつたが、その1コロニーをとり、これを平板培地上で抗血清により完全にA型であることを確かめた。(この株を No. 1789-M₂ と名づけた)この株を更に平板培地にひろげて20個の typical な Type A のコロニーをとり、これらを Pope-Smith 培地に5代継代したのち再びそれを平板培地にひらくと、それらのプロジェニーのすべては再び元のコロニー性状にもどつた。顕微鏡像は Type B に近い菌体の大きさを示した。このコロニーを更に3回継代してそのすべてのコロニーをA型抗血清及びB型抗血清で中和して見ると意外に両者のいずれにも中和しきれぬどころか、全く中和されないことが判つた。そこで著者は γ -、 β -両混合血清を使用した。その結果このレチチナーゼ反応は完全に抑えられた。従つてこれらの mutants はいずれも γ -、 β -両レチチナ

ーゼをもつことが判つた。(この株を No. 1789-M₃ と名づけた)この中間的なコロニーを示す菌は毒素の上でもA型とB型の中間的な位置をしめることが明らかとなつた。

次にこのような現象が Type A の標準株である No. 140 において起るかどうかについて実験を試みた。この株を Pope-Smith 培地で11代(96時間培養3回, 48時間培養8回)継代すると、この株は先述の No. 1789-M₁ の示すコロニー形態及びコロニー暈と殆んど等しい様相を呈するに至り、最早 γ -抗血清で抑えきれぬものとなつた。但しこの際は β -抗血清がなかつたため試みなかつた。

以上の実験から No. 1789 (Type B) における不可解な現象は Type B の中に Type A が混入することによつて起るものでないことが推定されるに至つた。

上述の No. 1789 (Type B) を保存しているうちに Type A と Type B との中間に近いコロニーになり、更に保存しているうちにこの株から Type A のコロニーが現われたりすることは菌株保存と共に孢子形成能の強い株がえらばれて来て、この孢子形成能の強化が毒素に影響を与えているのではなからうかと考えた。

実験2: No. 1789 (Type B) の変異と孢子形成能

No. 1789 (Type B) の変異株である No. 1789-M₁ の熱耐性を調べると、原株で 10¹ m.l.d./ml の毒性を示したものが、70°C 10分耐性株では 10² m.l.d./ml, 80°C 10分 或いは 100°C 10分耐性株では 10³ m.l.d./ml となり、加熱に従つて毒性が高くなつた。この時 80°C 10分 或いは 100°C 10分耐性株はいずれも Type A のもつ完全な pearly layer を形成するに至り、そのレチチナーゼ反応はA型の抗血清によつて完全に抑えられた。この Type A となつた株の顕微鏡像はA型と全く同じ大きさを示し、完全なA型としてさしつかえないものとなつた。そこでこの No. 1789-M₁ のクローン内で孢子形成能が毒素原性にどのような関係にあるかを検討した。即ち表1で示されるように原株に比べて 70°C 10分耐性株以上はすべて孢子形成能が増大しているが、それ以上に 70°C 10分~100°C 20分耐性株の間では格段の変化が示されなかつた。このことは孢子形成能は培地環境によつて支配されるので、恐らくは総菌数 10⁸ 中 10³ の加熱耐性菌数がこの菌の培地の最高値を示すものと思われる。毒素原性は原株の 10² m.l.d./ml に比べて、70°C 10分耐性株は 10³ m.l.d./ml と高くなり、80°C 10分 或いは 100°C 10分耐性株も 10³ m.l.d./ml であつた。また 100°C 10分耐性株から更に 100°C 10分, 100°C 20分耐性株をえ

表1 Cl. novyi No. 1789-M₁ の heat-resistant progenies の孢子形成能及び毒素原性

	孢子形成能		毒素 (m.l.d./ml)	レチチナーゼの種類	型
	加熱前の菌数	加熱後の菌数 (100°C 10分)			
対 照	1.7×10 ⁷	7.2×10 ¹	10 ²		
70°C 10' 耐性株	9.1×10 ⁶	2.2×10 ³	10 ³		
80°C 10' 耐性株	1.1×10 ⁷	1.9×10 ³	10 ³	r	A
100°C 10' 耐性株	1.5×10 ⁷	2.8×10 ³	10 ³	γ	A
100°C 10' 耐性株 の中に更に 110°C 10' 耐性株	7.3×10 ⁶	2.2×10 ³	10 ²	γ	A
100°C 10' 耐性株 の中に更に 100°C 20' 耐性株	1.5×10 ⁷	1.1×10 ³	10 ¹	γ	A

らぶとその毒性は 10² m.l.d./ml, 10¹ m.l.d./ml と下り、Type C に近づいたが、100°C 20分以上では耐性株をうる事が出来なかつた。この実験から No. 1789-M₁ の孢子形成能の強い株は Type A であることが証明された。(但し 70°C 10分耐性株については型判定をしなかつた)。

一方 Type A の孢子形成能を弱めることによつて Type B に近い株をうる事が出来るかどうかが問題であつた。実験1の項でコロニー選択により No. 1789-M₁ より完全にA型コロニーをえらび、ここから出発してA型となつた No. 1789-M₂ を Pope-Smith 培地に5代~8代継代によつて Type A と Type B の中間様株 (No. 1789-M₃) にすることが出来ると述べたが、この際の孢子形成能の変動について調べた。これまで著者の研究室でいろいろな培地に菌を継代する際、培地によつて孢子形成能を強くする培地 (例えばクックドミートブロス)、あまりかえぬもの (肝・肝ブイオン)、弱くするもの (Pope-Smith 培地) があることが判つているので、上述のように Pope-Smith 培地を用いて20のプロジェニーについて実験を行なつた。表2にはそのうちの任意の4株の孢子形成能を示した。48時間培養8回継代でその孢子形成能が弱化すると同時に毒素も弱くなつた。これらの mutants は前述したように r-, β-両レチチナーゼをもつていた。(No.1789-M₃)

以上の実験過程から Type B が Type A の孢子形成能の弱くなつた株ではなからうかと推定し、送付された Type B 及び Type D について熱耐性試験を行なつた。

実験3: Cl. novyi 各 Type (A, B, C, D) の孢子形成能の比較

表3で見ると Type B 及び Type D の6株を

表2 Cl. novyi No. 1789-M₂ の20コロニーを Pope smith 培地で継代実験。その孢子形成能と毒素との関係

	孢子形成能		毒素 (m.l.d./ml)	レチチナーゼの種類
	加熱前の菌数	加熱後の菌数(80°C 30分)		
継代前				
No. 1789-M ₂	1.8×10 ⁷	6.9×10 ⁴	10 ²	γ
8回継代				
No. 3	3.2×10 ⁶	3.6×10 ¹	10 ¹	γ+β
No. 11	8.1×10 ⁶	0	10 ¹	γ+β
No. 13	3.6×10 ⁵	5.2×10 ²	10 ¹	γ+β
No. 20	2.4×10 ⁶	3.6×10 ¹	10 ⁰	γ+β

表3 各 Type における熱耐性試験

No. (Type)	加熱温度			
	70°C 10分	80°C 10分	90°C 10分	100°C 10分
3631 (D)	*	+	-	-
3630 (D)	+	+	-	-
Sm-D (D)	+	+	-	-
1787 (B)	+	+	-	-
1789 (B)	+	+	+	-
Sm-B (B)	+	+	+	-
1789-M ₁	+	+	+	+
Type A (A)**	+	+	+	+
Type C (C)**	+	+	+	+

* +は熱耐性, -は非熱耐性

** 試供の Type A 5株はすべて 100°C 10分耐性であつた (II報参照)
試供の Type C 5株はすべて 100°C 10分耐性であつた (II報参照)

48時間培養し、この培養液 1 ml ずつを小試験管にとり、それぞれの株について 70°C 10分、80°C 10分、90°C 10分、100°C 10分加熱してその 0.5 ml ずつ肝・肝ブイオンに投じて48時間培養後その培養液の中からそれぞれの耐性株を得ることが出来るかどうかを調べた。即ち 70°C 10分加熱、80°C 10分加熱耐性株では各株について耐性株をうる事が出来た。90°C 10分加熱ではD型のすべては耐熱性でなくB型の3株のうち No. 1789 (Type B) と Sm-B の2株の耐性株をうる事が出来たが、100°C 10分加熱ではすべて耐性株をうる事が出来なかつた。一方 No. 1789-M₁ が 100°C 10分に耐えたことについては前述したし、Type A, Type C である限り使用に供した株のすべてが 100°C 10分に耐熱性であることをたびたび証明した³⁾。

即ちこれらの実験で Type B, Type D が極端に熱耐性の弱い菌であることが判つた。このことから Cl. novyi 各 Type が定量的に孢子形成能の上からどのような関係にあるかを検討して見た (No. 1789-M₁ を含めて)。Type B, Type D が極端に熱耐性が弱いのので、孢子形成能の熱耐性試験をこれまでの 100°C 10分をあらためて 80°C 30分とし、これに耐性の菌数を測定した。この結果を表4で示したがこれを要約すると、

表4 各 Type における孢子形成能と毒素原性との比較

Strain No. (Type)	孢子形成能		毒素 (m.i.d./ml)
	加熱前の菌数	加熱後の菌数 (80°C 30分)	
4-1104 (C)	6.0 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁴	0
4-1103 (C)	3.6 × 10 ⁷	7.2 × 10 ³	0
37103 (C)	1.0 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁴	0
37101 (A)	1.1 × 10 ⁸	5.5 × 10 ²	10 ²
140 (A)	3.6 × 10 ⁷	1.8 × 10 ¹	10 ¹
1789-M ₁	5.5 × 10 ⁷	1.8 × 10 ¹	10 ¹
1789 (B)	1.1 × 10 ⁵	0	0
1787 (B)	9.4 × 10 ⁴	0	10 ⁰
3631 (D)	3.5 × 10 ⁵	0	0
D (D)	7.2 × 10 ⁵	0	10 ⁰

1) 予想された如く Type C は孢子形成能が最も強く、Type A がこれにつき、前述の中間的位置の株と思われた No. 1789-M₁ が更にこれに続いた。

2) B型及びD型は極端に孢子形成能が弱いばかりでなく加熱前の総菌数も極めて少なかつた。しかしこれは菌増殖を示す試験管の濁濁度が特に悪かつたことによるとは思われなかつた。

3) 孢子形成能が Type C → A → B, D の順に弱くなり、毒素は Type A を中心にして孢子形成能がこれより強くなる際も弱くなる際も弱化する現象を得た。

考 案

或る程度孢子形成能の強い株が最も毒性が強く、孢子形成能がそれよりも弱くなることについて既に真田⁹⁾が Cl. tetani で述べているが、この際は孢子形成能を強くすることにより Species の異なつた無毒の Cl. tetanomorphum となり、孢子形成能を弱めると Cl. cocholearium になるものであつて、3 Species が1つの Species に統一されるべきであると述べた。Cl. Novyi についてはかつて Type A は Cl. oedematiens, Type B は B. Gigas, Type C は Cl. bubalorum, Type D は Cl. haemolyticum として分けてあつたが、Oakley¹¹⁾らにより同一 Species として型とすべきであることが提唱されて以来同一 Species とされて来た。Type C が Type A の孢子形成能の強い株であることに問題はないと思われるが、Type B 及び Type D を著者の研究から、その関係は孢子形成能から再考察されるべきであることが判つた。

さて従来毒素型によつて型として分けるのは最も正常な方法とされているが¹⁰⁾、この流儀に従えば、本報での実験の結果 β + r をもつものは Cl. novyi の1つの新しい型とされるべき意義をもつように見える。このことはまさしく Cl. welchii¹²⁾ の動物型が B型、C型、D型と分けられるとき、B型はC型の β, D型の ε をも共有することにより1つの新型として認定されていることと等しい意義をもつといわねばならない。しかしながら孢子形成能を中心としてこれらの毒素の相互の変動が予想されるに至つた現在、新しく1つの型としてこの毒素型を提唱することに著者は積極的ではない。

結 論

Cl. novyi の孢子形成能の如何は毒素の強さに影響するのみでなく、質的に異なつた毒素の生成にもあづかることが判つた。得られた結果は次の如くである。

1) Cl. novyi の Type B の1株 (No. 1789) を保管中 Type A と Type B の中間様コロニーを生じ、更に Type A のプロジェニーの解離するのを認めた。この Type A の典型的なコロニーを20個とり、Pope-Smith 培地に継代するとそのすべては元の間様株となつた。この中間様株は β + r レチチナーゼをもち、従来の Cl. novyi の型としては無いものであつた。

2) 如上の現象を孢子形成能との関係から検討したが、Type B, D は極端に孢子形成能が弱く、Type C が強く Type A はこの中間に属し問題の株は Type A と Type B の中間に位した。

3) 問題の中間株から加熱耐性株をえらぶと典型的な Type A となった (この際孢子形成能は増大している)。

4) 上述の A 型菌を継代により中間株にもどすときには孢子形成能は減少していた。

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は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っ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、Wellcome Res. Lab. I. Battey 博士、モンタナ大学 L. Ds. Smith 教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Clarke, P. H. : J. Gen. Microbiol., 1, 91 (1947).
- 2) 中川原儀三 : 第 I 報, 十全医会誌 (印刷中).
- 3) 中川原儀三 : 第 II 報, 十全医会誌 (印刷中).
- 4) Smith, L. Ds. : Introduction to the pathogenic anaerobes, 1st ed., P. 39, The Univ. Chicago Press, Chicago (1955).
- 5) 石田勝一・山岸高由・西田尚紀 : 医学と生物学, 62, 151 (1962).
- 6) 玉井健三・西田尚紀 : 医学と生物学, 64, 115 (1962).
- 7) 真田一郎 : 医学と生物学, 65, 96 (1962).
- 8) Nagler, F. P. O. : Nature, 115, 496 (1944).
- 9) 真田一郎 : 第 16 回日本細菌学会 関西支部総会 (1963).
- 10) Oakley, C. L. : Microbial Classification, P. 242, The University Press, Cambridge (1962).
- 11) Brooks, M. E., Sterne, M., & Warrack, G. H. : J. Path. Bact., 74, 185 (1957).

Abstract

1. In the course of stocking a strain of Cl. novyi type B 1789, a progeny (1789-M₁) with an intermediary phase between type A and type B was obtained and on further subculture, typical type A progeny (1789-M₂) appeared among the above-mentioned progenies.

A hazard of contamination by Cl. novyi type A into Cl. novyi type B strain was cancelled.

2. This type A progeny of Cl. novyi 1789-M₁ could be replaced by a strain with the intermediary phase by repeating subculture in Pope's digest broth.

3. Typical type A progenies were easily obtained by heatselection among the clone of Cl. novyi 1789-M₁.

4. A comparative examination of the sporulating potency was performed among type A, B, C and D of Cl. novyi and, as for the sporulating potency, type C was the strongest, type A was next to type C, while type B and type D were extraordinarily weak.

The sporulating potency of Cl. novyi 1789-M₁ was disclosed to be between those of type A and B.

5. Cl. novyi 1789-M₁ possessed both lecithinases of type A and type B. (gamma and beta lecithinase).

This new toxin type of Cl. novyi was discussed.