

Cl. welchii の毒素原性に関する研究

II. 毒素原性と孢子形成能について

金沢大学医学部細菌学教室(主任: 西田尚紀教授)

石 田 勝 一

(昭和38年2月13日受付)

前報¹⁾で Cl. welchii 分離の際、材料加熱の温度が高ければ高いほど less toxinogenic strains が分離されること、換言すれば toxinogenic strains は熱耐性でなく、したがって加熱温度を高めることによつて、除去されてゆくことを述べた。この事實は、菌分離に際して極めて重要な事實であるばかりでなく toxinogenicity が熱耐性、すなわち、この菌の sporulation という重要な生理機構に相当密接な関係があることを予想せしめた。従来、細菌毒素蛋白の生成の際、この現象がその菌細胞の生理機構と、どのような関係にあるかについては、現在殆んど暗中摸索の状態であるので、前述の事實はこの問題を解明する手がかりとなるかも知れないと考えた。したがつて、本報では、分離した諸種多様の toxinogenicities をもつ Cl. welchii について、孢子形成能との関係を一定の条件の下で、定量的分析をこころみた。

実験方法

使用菌株: 前報で述べた種々の分離加熱条件によつて得た84株を使用した。菌株記号は前報で記載したもの外に、W. F. series のものも本報で用いたが、これは人糞便から分離されたものである。

熱耐性の定性的試験: cooked meat broth に前培養した菌を、10% (v/v) cooked meat broth に24時間培養(途中から、48時間培養した方が、僅かながら sporulation に好都合であることが判つて、48時間に変更した)した後、滅菌小試験管に 1ml ずつとり、70°C, 80°C, 90°C, 100°C 各10分加熱した後、冷却し、ただちに1% ラクトース加 cooked meat broth に 0.5ml ずつくわえ、各々を24時間培養して、その耐性の存否を判定した。

熱耐性の定量的分析: 熱耐性菌を most provable number (M.P.N.) 法²⁾で測定した。すなわち、10%

(v/v) cooked meat broth にて本培養48時間ののち、この 1 ml を滅菌小試験管に分注し、100°C 10分加熱したものを、ただちに冷却したのち、型の如く、10¹ から 10⁹ まで滅菌生理食塩水で稀釈し、適当とおもわれる連続した5つの稀釈段階をえらび、これから各々 0.1ml ずつを5本の小試験管の中の1% ラクトース加 cooked meat broth の中にくわえた。cooked meat broth は前もつて、100°C 15~20分煮沸しておかなければならない。分注の 0.1ml はなるべく管底の chopped meat にとどくように入れることが望ましいが、沢山の小試験管を要するこの種の実験に際しては、徒らに時間を費し、そのために却つて不正確となることを恐れて、この実験では、cooked meat broth を 37°C 前後に保温し、できるだけ温い培地に、0.1 ずつくわえれば、比重の差で、十分下の方に沈澱してゆくのを認めて、専らこの方法にたよつた。実際には、管底部にいちいちくわえた場合、チオグリコール酸をくわえた場合、嫌気びんの中に入れて減圧培養した場合を、比較検討してみたが、何ら有意の差をみることはなかつた。したがつて、その後は前述の方法により分注したものを、そのまま嫌気びんの中に入れることなく培養した。対照としては、熱をくわえないものを前述と同じ方法で培養した。培養は24時間値で十分で、熱耐性の菌で、時として、増殖の悪いものがあつて、判定にやや困難を感じる時(cooked meat broth が時として混濁する場合があるので、これと区別する際に)もあつたが、泡の発生、或いは僅かの習熟によつて、ほとんど困難なく判定し得た。

実験結果

I. 種々の加熱温度下で分離された Cl. welchii の熱耐性について
 土壤材料を加熱すればするほど toxinogenic strains

Studies on the Toxinogenicity of Cl. Welchii. II. Toxinogenicity and Sporulating Ability of Cl. Welchii. Shoichi Ishida, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, University of Kanazawa.

が除去されて分離されなくなることを前報で述べたが、このことは *toxigenic strains* が、より熱耐性の弱いのではなからうかということを示した。したがって各種温度の加熱下で分離された菌の熱耐性試験をこころみた。

実験 1. そこで 90°C, 100°C 各10分の加熱条件で分離した株、各 8 株、100°C 30分、60分で分離した株、各 7 株ずつ、合計30株を *cooked meat broth* に前培養し、型の如く、10% (v/v) *cooked meat broth* にくわえて、24時間培養後、熱耐性試験をおこなった。その結果は表 1 の如くで、100°C 60分で分離した菌 (すべて無毒) は、この培地ではいずれも 100°C 10分に耐えたのに対し、90°C 10分、100°C 10分加熱後、分離した16株のうち、13株は 80°C 10分の加熱にさえ耐えない菌株であることが判った。僅かに残り 3 株が、それぞれ 100°C 10分か 90°C 10分に耐えたにすぎなかつた。しかもこの 3 株のうち、2 株は無毒で 1 株は無毒に近いものであつた。この事實は、*toxigenic strains* が熱耐性をもたず、*non-toxigenic strains* が熱耐性をもつことを暗示した。しかし 100°C

30分で菌を分離すると、この両群の中間を示し、毒性をもちながら (弱い) なお、且つ、100°C 10分に耐えるものもみることができた。

実験 2. 前の実験で材料を 90°C 10分、100°C 10分加熱で分離した際、もつと耐性の菌が含まれてよいようにおもえるが、これが極めて少ないことが不思議に思えたし、且つ、また、毒素原性と熱耐性 (恐らくは孢子形成能) とが截然たる一致を示したことを、更に確かめたいと考えたので、同様な実験を加熱温度をかえてくりかえした。すなわち、非加熱、70°C 10分、100°C 60分の材料加熱後、生存発育してきた株、それぞれ19株、21株、14株について熱耐性試験をおこなった。今回から、その後の用いられる熱耐性試験ではすべて 10% (v/v) *cooked meat broth* での48時間培養が用いられた。成績は表 2 から表 4 に示す如く、実験 1 とその傾向は変らなかつた。

ここで興味あるのは *Lysogeny* との関係である。土壤材料を 100°C 60分加熱して分離した 14 株のうち、3 株 (うち 2 株は 80°C 10分にさえ耐えない) は、*cooked meat broth* の中では 100°C 10分の加熱に耐えなかつた。しかし後で *Lysogeny* をもつ株をしらべた際、この 14 株のうち、4 株は *Lysogenic* であり、1 株は疑わしい菌株 (*defective lysogeny*?) と考えられる成績を示したが、この 5 株のうち 3 株は前述の

表 1 (実験 1) 種々の加熱条件で分離した *Cl. welchii* の熱耐性試験

分離の加熱条件	菌 株	α -toxin 値	70°C	80°C	90°C	100°C 各10分
90°C 10分	W.S. 9105	3.0	+	-	-	-
	W.S. 9102	2.0	+	-	-	-
	W.S. 9103	2.0	-	-	-	-
	W.S. 9104	2.0	+	-	-	-
	W.S. 9106	1.0	-	-	-	-
	W.S. 9101	0.8	+	-	-	-
	W.S. 9108	0.4	-	-	-	-
	W.S. 9107	0.05	+	+	+	+
100°C 10分	W.S. 1103	3.0	-	-	-	-
	W.S. 1104	1.0	-	-	-	-
	W.S. 1106	1.0	-	-	-	-
	W.S. 1108	0.8	+	-	-	-
	W.S. 1102	0.8	+	-	-	-
	W.S. 1109	0.6	-	-	-	-
	W.S. 1107	0.4	+	+	+	-
	W.S. 1105	0.1	+	+	+	+
100°C 30分	W.S. 1303	1.0	+	+	+	-
	W.S. 1305	0.4	+	+	+	+
	W.S. 1306	0.4	+	+	+	+
	W.S. 1307	0.2	+	-	+	-
	W.S. 1301	0.1	+	+	+	-
	W.S. 1302	0.1	+	+	+	+
	W.S. 1304	0.1	+	+	+	+
100°C 60分	W.S. 1601	0.1	+	+	+	+
	W.S. 1602	0.1	+	+	+	+
	W.F. 45	0.1	+	+	+	+
	W.F. 46	0.1	+	+	+	+
	W.F. 47	0.1	+	+	+	+
	W.F. 48	0.1	+	+	+	+
	W.F. 48	0.1	+	+	+	+
	W.F. 49	0.1	+	+	+	+

表 2 (実験 2) 土壤より非加熱で分離した *Cl. welchii* の熱耐性試験

菌 株	α -toxin 値	70°C	80°C	90°C	100°C 各10分
W.S. 041	0.6	+	+	-	-
W.S. 042	2.0	+	+	-	-
W.S. 043	0.2	+	+	-	-
W.S. 044	0.8	+	+	-	-
W.S. 045	0.4	+	-	-	-
W.S. 046	2.0	+	+	-	-
W.S. 047	0.8	+	+	-	-
W.S. 048	0.6	+	+	+	-
W.S. 049	0.6	+	+	-	-
W.S. 050	0.8	+	-	-	-
W.S. 051	0.2	+	+	+	-
W.S. 052	0.6	+	+	-	-
W.S. 053	0.4	+	+	+	-
W.S. 054	1.0	+	+	+	-
W.S. 055	1.0	+	+	+	-
W.S. 056	1.0	+	+	-	-
W.S. 057	0.6	+	+	+	-
W.S. 058	0.6	+	+	+	-
W.S. 059	1.0	+	+	+	-

3株に相当した³⁾。しかし、もとより Lysogeny の状態が、この現象と関係があるかどうかは、現在のところあきらかでない。

以上の熱耐性試験の結果を前報であきらかにした多

表3 (実験2) 土壤より 70°C 10分で加熱分離した Cl. welchii の熱耐性試験

菌株	α -toxin 値	70°C	80°C	90°C	100°C 各10分
W.S. 7101	0.2	+	+	+	-
W.S. 7102	0.05	+	+	-	-
W.S. 7103	0.6	+	+	+	-
W.S. 7104	0.6	+	+	-	-
W.S. 7105	0.2	+	+	-	-
W.S. 7106	0.8	+	+	-	-
W.S. 7107	0.4	+	+	+	-
W.S. 7108	0.05	+	+	+	-
W.S. 7109	0.4	+	-	-	-
W.S. 7110	0.2	+	+	+	-
W.S. 7111	0.6	+	-	-	-
W.S. 7112	0.2	-	-	-	-
W.S. 7113	0.4	+	+	+	-
W.S. 7114	0.8	+	+	+	-
W.S. 7115	1.0	+	+	-	-
W.S. 7116	0.6	+	+	+	-
W.S. 7117	0.6	+	+	+	-
W.S. 7118	0.4	+	+	-	-
W.S. 7119	0.8	+	+	+	-
W.S. 7120	0.4	+	+	-	-
W.S. 7121	0.05	+	-	-	-

表4 (実験2) 土壤より 100°C 60分で加熱分離した Cl. welchii の熱耐性試験

菌株	α -toxin 値	70°C	80°C	90°C	100°C 各10分
W.S. 1641	0.05	+	-	-	-
W.S. 1643	0.1	+	-	-	-
W.S. 1644	<0.05	+	+	+	+
W.S. 1645	0.05	+	+	+	+
W.S. 1646	<0.05	+	+	+	+
W.S. 1647	0.05	+	+	+	+
W.S. 1648	0.1	+	+	+	+
W.S. 1649	0.05	+	+	+	-
W.S. 1650	0.05	+	+	+	+
W.S. 1651	<0.05	+	+	+	+
W.S. 1652	0.05	+	+	+	+
W.S. 1653	0.2	+	+	+	+
W.S. 1654	0.05	+	+	+	+
W.S. 1655	0.05	+	+	+	+

表5 α -toxinogenicity と耐熱性との関係

実験	α -toxin 値	使用菌株数	熱耐性株数 (%)			
			70°C	80°C	90°C	100°C
1	6.0	2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	3.0~2.0	5	3(60)	0(0)	0(0)	0(0)
	1.0~0.4	12	7(58)	4(33)	4(33)	2(16)
	0.1~0.05	11	11(100)	10(91)	11(100)	10(91)
2	2.0	2	2(100)	2(100)	0(0)	0(0)
	1.0~0.4	29	29(100)	25(86)	14(48)	0(0)
	0.1~0.05	16	16(100)	13(81)	12(75)	10(62)

実験1の熱耐性試験は10% (v/v) Cooked meat broth 24時間培養後、実験2は同培地で48時間培養後におこなわれた。

実験1の6.0 α -toxin 値を示す2株は毒素産生株である PB6K, S107 の保存株である。

様の毒性と対比して、表5に総括して考えるとき、その toxinogenicity と熱耐性の関係が、一層、明確に示される。表5から次のように要約することができる。

1) toxinogenic であればあるほど、熱耐性は失われてゆくように見える。熱耐性試験の基準を 100°C 10分とすれば (この根拠については後述する)、toxinogenic strains (0.2 α -toxin 値を限界として、0.4以上を toxinogenic strains とする¹⁾) 50株中48株、すなわち96%は熱耐性を失っている。熱耐性をもつ2株は 0.4 α -toxin 値 (実は、この実験の値は前報で述べた修正されねばならぬ値に相当し、実際は 0.4 以下と考えられる) にすぎない。2) 2.0, 3.0, 6.0 の α -toxin 値を有する強毒株はいずれも熱耐性が極端に弱い。3) 100°C 10分耐性の菌の個々の α -toxin 値を検査すると、総数22株中20株は non-toxinogenic であり、残り2株も、せいぜい 0.2~0.3 α -toxin 値を有するにすぎない。このように熱耐性と毒素原性との関係があきらかになるにつれて、熱耐性の概念を今一層正確にしておくことが望ましいと考えられた。

II. 熱耐性の定量 (孢子形成能) と毒素原性との関係

従来 Clostridia では vegetative cell でも、なお、70°C 程度の加熱に耐えるともいわれているから、孢子との関係をあきらかにするためには 80°C 以上望ましいと考えた。表5からみて、80°C が toxinogenic と non-toxinogenic を分つ Criteria とするには不適とみえ、90°C か 100°C をえらぶべきことを示した。このうち 100°C 10分耐性はただちに sporulation を考えてよい点ですぐれているから、100°C 10分をとつて toxinogenic strains と non-toxinogenic strains

について熱耐性の意義について分析をこころみた。すなわち、上記の試験の熱耐性は、若し、かりに 10^8 中1個の熱耐性菌がいても、 10^7 いても同じ結果となり、到底その菌株の胞子形成能を示すとはいえないからである。そこで熱耐性を、更に、正確に胞子形成能で表記するために、規定の熱耐性試験のあとで残存する熱耐性菌の数を計算した。

かくて、**toxigenic strains** と **non-toxigenic strains** の両群より6株ずつえらんで、定量的にどの位の差があるかを検索してみた。その結果は表6の如くで、定量的に差はあるにはあるが、両群の菌の対照の実測値 $10^7 \sim 10^8$ /ml 培養液の中で、僅かに耐性菌は $10^1 \sim 10^2$ の差にすぎず、両群の胞子形成能の差は意味をもたないようにみえた。しかしながら、その後

表6 **toxigenic strains** と **non-toxigenic strains** の熱耐性菌の定量

使用菌株		α -toxin 値	原培養液中の総菌数/ml	加熱後の生存菌数/ml
毒性株	W.S. 6106	3.0	1.1×10^8	0
	W.S. 9105	2.0	7.9×10^7	0
	W.S. 1103	2.0	7.0×10^7	0
	W.S. 6110	1.0	3.3×10^7	0
	W.S. 9103	1.0	3.3×10^7	0
	W.S. 9104	1.0	2.3×10^7	0
非毒性株	W.S. 1105	0.1	3.3×10^7	2.0×10^1
	W.S. 1302	0.1	4.0×10^6	4.0×10^1
	W.S. 1601	0.1	7.0×10^7	3.3×10^2
	W.S. 1304	0.1	2.7×10^7	1~10
	W.S. 1602	0.1	3.3×10^7	1~10
	W.S. 1301	0.1	1.7×10^7	1~10

の実験からただちに、この差は一見意味をもたないようにみえても決してそうでないことがあきらかとなった。

すなわち、今 W. S. 1601 株は 7.0×10^7 中 3.3×10^2 の熱耐性菌数をもつ菌株であるが、これを Zeissler 平板の上にひろげて、10個のコロニーを拾うと、若し、熱耐性菌と、非熱耐性菌との割合が、前述の如くであれば、10個のコロニーよりの progeny である10株は、ほとんど非熱耐性でならなければならないのに、この各10株における熱耐性菌の割合は同一のロットの培地を使用する限り、ふたたび10株ともに、表7に示す如く、原株の割合とほとんど同一となつた。これは原株の熱耐性の 3.3×10^2 とその他の 7.0×10^7 との間に、熱耐性という点で genetic に何らの差のないことを示している。すなわち、ほぼ 10^7 の中に、ほ

表7 **non-toxigenic strains** W.S. 1601 の10プロジェニーの熱耐性菌の定量

プロジェニー番号	原培養液中の総菌数/ml	加熱後の生存菌数/ml
W.S. 1601-1	3.3×10^7	7.0×10^2
W.S. 1601-2	1.1×10^7	7.0×10^2
W.S. 1601-3	1.7×10^7	1.1×10^3
W.S. 1601-4	1.3×10^7	3.3×10^2
W.S. 1601-5	1.8×10^6	1.1×10^3
W.S. 1601-6	7.8×10^6	4.9×10^2
W.S. 1601-7	2.3×10^7	4.9×10^2
W.S. 1601-8	7.8×10^6	1.3×10^3
W.S. 1601-9	1.1×10^7	4.9×10^3
W.S. 1601-10	7.9×10^7	3.3×10^2

ぼ 10^2 位の胞子をつくらせるのは菌側の genetic な因子によるものではなくて、環境の能力 (phenotypic expression) に従うものである。かくて前述の実験から、W.S. 1601 が 7.0×10^7 中 3.3×10^2 の熱耐性菌数を示すということは、その原株の 7.0×10^7 の個々の細胞が、この環境下で、前述の比率だけの耐性菌を生ずる能力をもつということに他ならない。したがって、以下の論文で上述の「原株の数値と耐性菌の数値の定量的比率」を「胞子形成能」という言葉で表現することとした。

以上のことは次の実験から一層明白である。すなわち、2株ずつの **toxigenic strains** と **non-toxigenic strains** をとり、これを Zeissler 平板になすり、50個ずつのコロニーから50株ずつの progenies をつくり、これを型の如く、48時間培養して、 100°C 10分の熱耐性試験に供すると、表8の如き截然たる結果を示す。すなわち、**non-toxigenic strains** は主として熱耐性の菌からなり、**toxigenic strains** は熱耐性のない菌細胞群からなることが判つた。

表8 **toxigenic strains** と **non-toxigenic strains** の熱耐性プロジェニーの割合 (1)

使用菌株		α -toxin 値	熱耐性細胞数
毒性株	W.S. 064	3.0	0/50*
	W.S. 9105	2.0	0/50
非毒性株	W.S. 1601	0.05	30/50
	W.S. 1645	0.05	50/50

*分母は Zeissler 上の50個のコロニーより分離したプロジェニーでテストに供された株数

分子はテストの結果生存した株数

これを更に、沢山の菌株について、すなわす、両群とも、更に6株ずつ使用し、Zeissler 上の10個のコロニーの progenies をつかつて、熱耐性をしらべてみたが、ほとんど同じ結果を得ることができた。この最後の実験から、90°C で試験するより、100°C で試験した方がよいことが裏付けられた。

表9 toxinogenic strains と non-toxinogenic strains の各株の耐熱性プロジェニの割合*(2)

使用菌株		α-toxin 値	耐熱性菌株数		
			80°C	90°C	100°C
毒性株	W.S. 6106	3.0	7	1	0
	W.S. 6110	1.0	1	0	0
	W.S. 9103	1.0	3	0	0
	W.S. 9104	1.0	0	0	0
	W.S. 9105	2.0	3	2	0
	W.S. 1103	2.0	10	7	0
非毒性株	W.S. 1105	0.1	10	10	10
	W.S. 1301	0.05	8	5	7
	W.S. 1302	0.1	10	8	8
	W.S. 1304	0.1	10	10	9
	W.S. 1601	0.1	10	10	10
	W.S. 1602	0.1	4	5	2

*各菌株の被検プロジェニは10株である。

考 按

孢子形成能の強い菌は必ず無毒であつたが non-toxinogenic strains のすべては必ずしも孢子形成能ではなかつた。また、toxinogenic strains のすべては孢子形成能に欠陥(熱耐性の喪失)をもつが、この逆は必ずしもあてはまらない。土壌から Cl. welchii を分離した際、この逆のケースは少数ケース(7~38%)であつたが、このことから次の2つの事項が推定される。

1) 毒素因子の獲得は確実に孢子形成能を失わせる。

2) しかし他の因子によつても孢子形成能は失われるであろう。

孢子存在の証明には、熱耐性という規定は必ずしも十分ではないが(私がとつた条件である100°C 10分の熱に耐性でない孢子もある)、少なくとも100°C 10分に耐性の菌細胞があれば、間違いなく孢子であり、この意味で、私はもつとも確実な熱耐性と M.P.N' 法によつて孢子形成能を計算したのである。

最近、この熱耐性の因子については、優れた研究が相ついで現われ、生化学的⁴⁾にも、形態学的⁶⁾⁷⁾⁸⁾に

も、Dipicolinic acid の Ca-salt 蓄積層の形成がこれにあずかることを示した。或いは、また、米田⁹⁾らは、B. cereus の spore-coat について分析をこころみ、それが β-Hydroxy-butyrlic acid の polymer であると述べた。これらの因子が熱耐性の因子として考えられるのであるが、その合成不全(したがつて、熱耐性の喪失)と毒素蛋白の生成とは化学構造的にも、生化学的性質の上でもあまりにも相違した因子であつて、同一物とは考え難い。恐らくは、この2因子は先述の第2項に属して、毒素と孢子との関係を乱す minority % を形成するものと思われる。

これに対して「毒性を帯びる」と、ほとんど100%に孢子形成能がないのは vegetative cell の蛋白体制から孢子蛋白体制へかわるときの失敗それ自身に毒素蛋白の生成の原因があるからだと考えられる。

この再編成の際に、菌細胞蛋白の解体合成があるという、魅力ある Foster¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾らの研究があるが、私ならびに私の同僚は現在細菌毒素をこの面から検討しつつある。

結 論

1) 毒素原性のある Cl. welchii のほとんどすべては熱耐性を失つている。

2) 孢子形成能の強い Cl. welchii のほとんどすべては non-toxinogenic である。

3) 1) と 2) の逆は必ずしも真ではない。しかし、このあてはまらぬケースは minority % で7~38%であつた。

この minority % の意味するものについて考察をおこなつた。

(稿を終るに臨み、終御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜つた西田尚紀教授に衷心より感謝の意を表します)

文 献

- 1) 石田勝一：十全医会誌，96，印刷中。(1963)。
- 2) 伝染病研究所：細菌学実習提要，第6版，P. 495，東京，丸善，(1955)。
- 3) 河合康守・山岸高由・石田勝一：医学と生物学，64，170 (1962)。
- 4) Murrell, W. G. : Microbial Reaction to Environment, Symp. Soc. gen. Microbiol. 11, 116, Cambridge, Univ. Press. (1961)。
- 5) Powell, J. E. : Biochem. J., 54, 210 (1953)。
- 6) Takagi, A., Kawata, T., Yamamoto, S., Kubo, T. & Okita, S. : Japan. J. Microb., 4, 137 (1960)。
- 7) Fitz-James, P. C. : J. Bact., 84, 104 (1962)。
- 8) 橋本忠世・吉田

長之：第15回日本細菌学会関西支部総会，シンポジウムⅡ，微生物の孢子演説要旨，(1962)。

9) Yoneda, M. & Kondo, M. : Biken's J., 2, 247 (1959). 10) Foster, J. W. & Perry,

J. J. : J. Bact., 67, 295 (1954). 11)

Hardwick, W. A. & Foster, J. W. : J. Gen. Physiol., 35, 907 (1952). 12) Hardwick,

W. A. & Foster, J. W. : J. Bact., 65, 355 (1953).

Abstract

The abortive sporulation of *Cl. welchii* was assumed to be the causative agent for the toxinogenicities of *Cl. welchii* and experiments for this postulate were undertaken with 84 strains which were of a variety of toxinogenicities. The results obtained were as follows;

1. Almost all of the toxinogenic strains of *Cl. welchii* were demonstrated to be the ones which had lost the heat resistance to 100°C for 10 min.
2. Almost all strains which could resist 100°C for 10 min. were non-toxinogenic.
3. The more toxinogenic the strains were, the less their heat resistance.
4. The opposite of the case 1. and 2. could not always be true. These cases, however, were minority %, such as 7 to 38%. The causative agents for the minority % of discordance were discussed.