

Cl. welchii の毒素原性に関する研究

III. 人の糞便内の Cl. welchii の毒素原性と熱耐性との関係について

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4月1日受付)

先に著者¹⁾は、土壌より Cl. welchii 168株を分離し、その個々の α -toxin を測定し、熱耐性 (100°C 10分耐性、したがって孢子形成能を意味する) の喪失と毒素原性が極めて密接な関係をもつことから、毒素蛋白の生成には孢子形成の機構が、その主たる役目を果していると推定した。また、その際、土壌材料の分離加熱の温度が高ければ高い程、less toxinogenic strains が分離されてくることについて述べ、100°C 60分の分離加熱条件を用いて分離された菌のすべては無害であると述べた。

しかるに、人の糞便材料から 100°C 60分加熱して分離してゆくと、必ずしも無害でない場合が多々あつて、中には 1.0 α -toxin 値 (マウスに対して 57 LD₅₀ 前後) のかなり毒性の強いものさえ現われてくることを知った。元来、人の腸管に棲息する Cl. welchii がどの程度の毒素原性を有するかについては、全く報告がなく、また、例えあつたとしても、前報の報告の如く、非加熱、或いは低温加熱の条件で分離しない限り、強い毒素産生を示す菌は発見されないと考えられたので、以上の事実を考慮して人腸管内の Cl. welchii の毒素原性を検索し、併せて熱耐性との関係を検討した。

実験方法

実験材料: 分離 Cl. welchii は附属病院の入院および外来患者、職員および学生の糞便より前報¹⁾に従い 85株を分離した。菌株記号は前報の記載の如くである。

α -toxin の測定および熱耐性試験: この菌の Virulence を構成する主毒素である α -toxin 値の測定¹⁾ならびに熱耐性試験²⁾も前報に従いおこなつた。しかし、熱耐性試験は前報²⁾に述べた理由から 100°C 10分についてのみおこなつた。

分離 Cl. welchii のタイプの決定: 人糞便より分離した Cl. welchii についてタイプを決定するために次の方法でおこなつた。毒素液は α -toxin 産生用培地³⁾ 2本へ15時間前培養の菌を1%にそれぞれくわえ、37°C で1本は7時間、他の1本は24時間培養し、その培養液を 3000 r.p.m. 20分間遠心し、その上清液へトルエンを約10%量くわえ、よく振盪し、室温に24時間放置し、濾紙濾過したものである。

なお、 ϵ -toxin の証明のためには24時間培養のものの濾液を使用した。タイプの決定には Oakley らの方法⁴⁾に準じておこなつた。すなわち、

1) 毒素液

2) 毒素液 1ml に α 抗毒素血清 (10u/ml) 1ml をくわえ、37°C の水槽で20分間反応させたもの。

3) 毒素液 1ml に M/15 Na₂HPO₄ 溶液をくわえて終末 pH 6.5~7.0 とした。くわえられた量としては後でトリプシン液および α 抗毒素血清をくわえねばならぬ関係上、0.25ml 以内でとどめられることが望ましかつたが、往々にして培地のつよい酸産生のために M/15 Na₂HPO₄ 液 0.25ml で如上の pH に調節することは不可能であつたから 10% NaOH の 1~2 滴を 10ml の M/15 Na₂HPO₄ にくわえ、これを用いて希望の pH 域 6.5~7.0 の間に調節した。若し、0.25ml 以内ですめば生食水を補足して 0.25ml とし、更に 1% トリプシン 0.5ml を加えて 37°C の水槽で45分間反応させた後、 α 抗毒素血清 (10u/ml) を 0.25ml くわえ、更に 37°C の水槽で5分間おいたもの。

以上の3つの液をつくり、1) は 0.1ml, 2), 3) は各々 0.2ml を各マウスの尾静脈に注射し、24~48時間後その生死を判定した。

2) α -は毒素以外の致死毒、すなわち、 β , ϵ , i の存在をみるためであり、3) は特に蛋白酵素によつて活

Studies on Toxinogenicity of Cl. Welchii III. On the Relationship between Toxinogenicity and Heat Resistant Nature (Sporulating Potency) of Cl. Welchii. Shoichi Ishida, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, University of Kanazawa.

性化される ϵ -, i -毒素の存在を見のがさぬためにおこなうものである。2)と3)の両群のマウスが死ねばいふまでもないが、そのいずれかが死んでもA型以外の菌(動物型)と判定される。これに反してA型は α -毒素しかないから1)で死んで、2), 3)では α -毒素は中和されて、無いはずである。但し、 α -毒素がマウスで証明されないとしても *in vitro* の lecithinase 反応で証明されるから、1), 2), 3) 群のすべてのマウスが生残している、なお且つ、A型と判定されることは珍しくない。

実験結果

型の同定: 糞便より分離された85株の Cl. welchii は前述の如く、すべて Nagler 培地の上で lecithinase 反応を呈し、且つ、これが α 抗毒素血清によつて完全に中和されるものであつたから α -toxin を有することは明白である。且つまた、後述する如く α -toxin 値の測定に際してもこのことは証明された。

分離した85株について先述の方法で α -toxin 以外の毒素の存在をマウスを用いて検したが、いずれも陰性に終つた。したがつて如上の株はすべてA型と判定した。

人の糞便からの Cl. welchii A型の毒素原性: 人の糞便より 70°C 10分, 90°C 10分, 100°C 60分の加熱条件を用いて分離を試みた。非加熱でも分離を試みたが糞便では困難であつた。各温度での Cl. welchii の分離率および平均 α -toxin 値は表1に示したが、分離率は 70°C 10分92.7%, 90°C 10分87.5%, 100°C 60分39.3%と分離加熱の温度が低い程その分離率はよくなつておる。各温度で分離した菌群の平均 α -toxin 値は、土壌より各温度で加熱分離した際の平均 α -toxin 値より総体的に高い平均値を示したが、分離加熱の温度が高くなるにしたがい、土壌の場合と同様に平均 α -toxin 値の下つてゆくことがここでも再び示された。

表1 人糞便より Cl. welchii の分離率と α -毒素原性

分離加熱条件	被検数	分離菌数*	分離率(%)	α -toxin 平均値
70°C 10分	41	38	92.7	0.98
90°C 10分	16	14	87.5	0.70
100°C 60分	84	33	39.3	0.46

* 1つのサンプルより1株分離

各温度で分離した菌群を 4.0, 2.0, 1.0, 0.8~0.2, 0.1~0.05 の5つの毒素原性の群に分け、その毒素原性と熱耐性との関係を表2に示したが、この表から分

表2 人糞便より分離した Cl. welchii の毒素原性と熱耐性*

毒素原性	70°C 10分加熱分離株		90°C 10分加熱分離株		100°C 60分加熱分離株	
	菌株数	熱耐性株数	菌株数	熱耐性株数	菌株数	熱耐性株数
4.0	1	0	0	0	0	0
2.0	4	0	0	0	0	0
1.0	18	0	5	0	9	0
0.8~0.2	12	0	8	0	11	0
0.1~0.05	3	0	1	0	13	13

* 熱耐性は100°C 10分に対し

離菌株の毒素原性を検討すると、1) 人の腸管内に 2.0, 1.0 α -toxin 値を有する菌が数多く存在すること、2) 低温加熱分離程、より toxinogenic strains の分布度数が高いが、加熱をくわえてゆけばゆく程、より毒性のよわい菌の分布度数にかわる。換言すれば高温加熱が toxinogenic strains を消去してゆくこと、3) 前報で報告したように土壌を 100°C 60分加熱して、これに耐えて生存してくる Cl. welchii に toxinogenic strains がなかつたのに、糞便の際には 100°C 60分の分離加熱の条件を用いても分離された菌群においてかなり毒性の強い菌が分離されてくること、すなわち、土壌を 100°C 60分加熱すると、これに耐性の菌54株中、毒性をもつ菌は1例もなかつたのに対し、糞便から100°C 60分で加熱分離された33株の中、1.0 α -toxin 値(約 57LD₅₀)もの菌が27%も発見された。なお、toxinogenic strains (0.2 α -toxin 値以上)としてのものは60%もの多きを数えた。

次に 70°C 10分, 90°C 10分, 100°C 60分で加熱分離した各菌群の個々の毒素原性と熱耐性との関係であるが、ここで注目すべきことは 100°C 60分の加熱により分離された33株の個々の毒素原性と熱耐性との関係である。

表3に 100°C 60分で分離した菌群について詳細に示したが、この条件で分離された33株を更に10% (V/V) cooked meat broth で再培養48時間ののち、熱耐性試験をすると、僅かに13株(40%)が熱耐性であるにすぎなかつたが、この13株は符節を合した如く non-toxinogenic (0.1~0.05 α -toxin 値)で、他の非熱耐性の20株はすべて toxinogenic (0.2 α -toxin 値以上)のものであつた。換言すれば、糞便の中で 100°C 60分に耐えうる株については、規定した10% (V/V) cooked meat broth という同一条件下でしらべるとき、熱耐性菌は毒性がなく、非熱耐性菌は毒性があつて、この間に例外はなかつた。

表3 100°C 60分加熱分離株の毒素原性と熱耐性

分離菌株	α -toxin	熱耐性
W. F. 1601	0.05	+
W. F. 1602	0.4	-
W. F. 1603	1.0	-
W. F. 1604	0.4	-
W. F. 1605	0.4	-
W. F. 1606	0.1	+
W. F. 1607	0.1	+
W. F. 1608	0.8	-
W. F. 1609	0.8	-
W. F. 1610	1.0	-
W. F. 1611	0.05	+
W. F. 1612	0.1	+
W. F. 1613	0.05	+
W. F. 1614	1.0	-
W. F. 1615	1.0	-
W. F. 1616	0.1	+
W. F. 1617	0.05	+
W. F. 1618	0.4	-
W. F. 1619	1.0	-
W. F. 1620	0.8	-
W. F. 1621	0.05	+
W. F. 1622	1.0	-
W. F. 1623	1.0	-
W. F. 1624	0.05	+
W. F. 1625	1.0	-
W. F. 1626	0.6	-
W. F. 1627	0.05	+
W. F. 1628	1.0	-
W. F. 1629	0.05	+
W. F. 1630	0.2	-
W. F. 1631	0.4	-
W. F. 1632	0.05	+
W. F. 1633	0.4	-

したがって、前にマウスでの実験から0.1と0.2の α -toxin 値の間に毒性に関して境界があると述べたが、今回の100°C 60分加熱分離株33についての実験では、これがまた熱耐性菌(孢子)形成という重要な生物学的事実の規準と一致することが明らかとなった。この0.1と0.2の間に更に重要な生物学的意義があることは、次の実験によって一層明らかとなった。

すなわち、種々毒素原性の異なる菌株20株を用いて1%グルコース加 cooked meat broth で10代継代してその α -toxin 値の変化をしらべたが、0.1~0.05のものほとんど上昇しないのに対し、0.2以上のものは毒素原性の増大してくるのを見ることができた。こ

表4 土壌より分離した *Cl. welchii* の継代による α -toxin 上昇の可能性

使用菌株	α -toxin 値		
	原株	5代	10代
W.S. 043	0.1	0.1	0.1
W.S. 045	0.4	0.4	0.6
W.S. 046	1.5	1.5	1.5
W.S. 051	0.2	0.4	0.6
W.S. 053	0.3	0.5	0.8
W.S. 054	1.0	1.0	1.0
W.S. 060	<0.05	<0.05	0.05
W.S. 7101	0.2	0.5	0.8
W.S. 7102	0.05	0.05	0.05
W.S. 7105	0.1	0.2	0.2
W.S. 7110	0.2	0.3	0.3
W.S. 7112	0.2	0.4	0.6
W.S. 7114	1.0	1.0	1.0
W.S. 7115	0.6	0.8	1.0
W.S. 7121	0.05	0.05	0.05
W.S. 1644	<0.05	<0.05	0.05
W.S. 1645	0.05	0.05	0.05
W.S. 1650	0.05	0.05	0.05
W.S. 1654	<0.05	<0.05	0.05
W.S. 1655	0.05	0.05	0.05

継代使用培地

1%グルコース加 Cooked meat broth

のことからも0.1と0.2との間に毒性に関して生物学的にかなりの域があることが予想された。

考 按

人の糞便が何故土壌と違って100°C 60分の加熱処理によつて、なお、毒性を有する菌を含んでいるかについては今までの著者の経験から「孢子形成能のつよい培地程、加熱による毒性株除去現象がよくなる」ことによるものと推定している。ここではよわい毒性菌もが孢子をつくり得ると考えられる。したがって糞便を100°C 60分加熱した際には α -toxin 値1.0以上のものはみつけることはできなかった。糞便環境が土壌にくらべて孢子形成能のよい状態であると考えられる。

ここに附言しておきたいのは *Cl. welchii* 食中毒との関係である。Hobbs⁶⁾らは人糞便から100°C 60分の加熱に耐えて分離されてくる菌が食中毒に関係すると述べているが、著者が同様な条件で分離した33株の菌は普通の *Cl. welchii* Type A と何ら異なることのないものであり、これらの菌が食中毒菌として特に取

扱われねばならぬ理由は今のところ全く不明というより他はない。Dack⁷らも Hobbs の主張を否定しており、100°C 60分耐性菌が食中毒の指標となることは確かな根拠を欠くとおもわれる。

人の腸管内から α -toxin 値が 4.0 (マウスに対してほぼ 240 LD₅₀) におよぶ強毒株が分離されたとしても、必ずしもこの人がこの菌による臨牀症状を呈していない。4.0 α -toxin 値を有する菌を分離した際、この患者の病名は内臓下垂症であつた。また、正常の腸管糞便より α -toxin 値 1.0~2.0 (ほぼ 60~120LD₅₀) の菌が多く分離されるが、このことが直ちに α -toxin による中毒を否定できるかどうかは不明である。更に normal flora としての Cl. welchii の量 (加熱しない自然のままの Cl. welchii の量) およびその毒素原性が明瞭にされたのち、決定するべきであらう。

100°C 60分加熱分離の Cl. welchii が何故毒素原性と熱耐性 (胞子形成能) との間に成然たる結果を示すかは将来の興味ある問題となるとおもわれる。

結 論

- 1) 人の糞便から Cl. welchii 85株を分離したが、分離の条件として材料を加熱すればする程、毒素原性のよわい株が得られる率が大きくなる。
- 2) 但し、土壌の際と同一の加熱温度でも總体的に

強い毒素原性のものが得られ、100°C 60分の加熱でさえ、 α -toxin 値が 1.0 前後のものは珍らしくないことが判つた。

3) 糞便中 100°C 60分加熱耐性の分離菌株 33株について毒素原性と熱耐性との関係をしらべると、toxigenic strains は熱耐性がなく、non-toxigenic strains は熱耐性で、この間に例外なく截然たる成績を示した。

(稿を終るに臨み、終始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：第1報，十全医会誌，(1963)。
- 2) 石田勝一：第2報，十全医会誌，(1963)。
- 3) 村上政夫・山岸高由・西田尚紀：医学と生物学，64，166 (1962)。
- 4) Oakley, C. L. & Warrack, G. H. : J. Hygiene. 51, 102 (1953)。
- 5) 西田尚紀：メディアサークル，29号，11 (1962)。
- 6) Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H. & Cruickshank, J. C. : J. Hygiene. 51, 75 (1953)。
- 7) Dack, G. M., Sugiyama, H., Owens, F. J. & Kirsner, J. B. : J. Infect. Dis., 94, 34 (1954)。

Abstract

Toxinogenicities were examined of 85 strains of *Cl. welchii* isolated from human faeces heated under a variety of temperatures. The results obtained were as follows;

1. It was confirmed again that the higher the temperatures of heating added to the specimens of faeces, the less toxinogenic strains were isolated.
2. Weakly toxinogenic strains could still be frequently isolated from human faeces heated at 100°C for 60 min., though few toxinogenic strains could be isolated from the soil specimens treated under the same conditions.
3. A relationship between toxinogenicity and heat resistant nature of isolated strains was reinvestigated with 33 strains isolated from human faeces heated at 100°C for 60 min. and it was proved that all of 20 toxinogenic strains were non heat-resistant and that all of 13 non-toxinogenic strains were heat-resistant.
4. A biologically significant boundary was assumed to exist between the strains with 0.1 α -toxin unit and those with 0.2 unit.