

Cl. perfringens の溶血毒に関する研究

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷友次教授)

柴 田 道 也

Michiya Shibata

(昭和30年8月9日受附)

I. 溶血毒産生に及ぼす培地並びに各種物質の影響について

Cl. perfringens の毒素に関しては Bull & Pritchett¹⁾ が最初にこれを記載して以来、数多くの研究が報告されている。培地並びに各種物質の効果についても Tamura²⁾, 米沢³⁾, 高橋⁴⁾, 片柳⁵⁾ 等の報告があるが、著者は溶血毒を中心として、培地及びこれに添加せる糖類、金属イオン、各種発育素等の作用について実験を試みた。

実験方法

供試菌株は PB₆₄ 株。

培養は肝臓ブイオン以外は総て嫌気壺中にて嫌氣的に培養した。

溶血毒の力価測定は所要時間培養した培養液の遠心(3,000 r. p. m. 20分) 上清を生理食塩水にて希釈し、0.5ml 量系統で小試験管に階段的倍々希釈する。これ

に2%山羊血球液の1滴宛を加え、充分振盪後37°C、1時間ついで室温24時間放置後溶血を判定した。判定記号は卍完全溶血、卍殆んど完全溶血、十半分溶血、±微かに溶血、一全く溶血せず。溶血価は一般に完全溶血を示す最大希釈倍数を用いた。

実 験

1. 溶血毒力価測定時における pH の影響

37°C、18時間培養の培養液遠心上清の pH は普通5乃至それ以下に下つているので、これを苛性ソーダを用いて pH 5, 6, 7, 8 に修正し、夫々について溶血毒力価を測定した。培地は1% Glucose 加肉汁ブイオンを用いたものを第1表に示すが他の培地でも同様の傾向を得た。即ち pH 6 において最高の溶血価を得た。以後の実験はすべて pH 6 に修正して行つた。

第 1 表 溶 血 価 と PH

稀釈倍数 PH	原	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1028	2056
5.0	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	±	—	—
6.0	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	—
7.0	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	—	—	—
8.0	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	—	—	—	—

2. 各種培地における溶血価

使用した培地は pH 7.8 肝臓ブイオン, pH 7.4 肉汁ブイオン, ペプトン水, カゼイン水溶液培地(カゼイン酸加水分解液 0.28%N, Mg SO₄·7H₂O 0.002%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.576%, KH₂PO₄ 0.024%, tryptophane 0.01%, NaCl 0.2%) の4種である。37°C, 18時間培

養を行つた。第2表に示す如く肉汁ブイオンにおいて最高の溶血価を示した。肝臓ブイオンでは発育は極めて良好であるに拘わらず溶血毒産生は不良であつた。

3. 培養時間による溶血価の消長

肉汁ブイオンを用い、菌接種後所要時間毎に溶血価を測定した。第3表に示す如く、溶血毒

第 2 表 各種培地における溶血価

稀釈倍数 培地	原	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1028	2056
	肝臓ブイオン	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
肉汁ブイオン	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
ペプトン水	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
カゼイン培地	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

第 3 表 培養時間と溶血価

稀釈倍数 培養時間	原	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1028	2056
	4	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-

産生は菌の発育と同時に起り、発育の極期に至り溶血価も最高となる。以後24時間迄殆んど変動は見られなかつた。

肝臓ブイオンを用いての実験も同様の傾向を示した。

4. 糖類の影響

肉汁ブイオンに 0.1, 0.5, 1.0, 2.0% の割合に Glucose, Lactose, Dextrin の 3 種を添加し、

第 4 表

糖	濃度 (%)	128 倍	256	512	1024	2048
Glucose	0.1	+++	++	++	+	-
	0.5	+++	+++	+++	+	-
	1.0	+++	+++	+++	++	±
	2.0	+++	+++	+++	+	-
Lactose	0.1	+++	++	++	+	-
	0.5	+++	++	++	+	-
	1.0	+++	+++	+++	+	-
	2.0	+++	+++	++	+	-
Dextrin	0.1	+++	++	++	+	-
	0.5	+++	+++	++	+	-
	1.0	+++	+++	+++	+	-
	2.0	+++	+++	++	+	-

18時間培養のものについて溶血価を測定した。成績は第4表に示す如くである。Glucose 添加により溶血価は上昇するが、1%で最大となり、それ以上の濃度では著しい変化は見られなかつた。Lactose, Dextrin でも大体同様の成績であるが、溶血価は稍々低い。

5. 金属イオンの影響

C. diphtheriae⁶⁾, Cl. tetani⁷⁾ の毒素産生や、Cl. perfringens^{8) 9) 10)} のブドウ糖代謝に二価鉄イオンが重要な関係をもつことが知られている。著者は Cl. perfringens の溶血毒産生に関し、Fe⁺⁺ イオンを中心として他の金属イオンについても検討した。

培地は磷酸カルシウム沈澱法¹¹⁾による除鉄を6回繰返した1% Glucose 加肉汁ブイオンを用いた。最初 Fe⁺⁺ (FeSO₄·7H₂O 溶液を用いる) を 1ml につき 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0γ 添加したものにつき溶血価を測定した。Fe⁺⁺ 量が少ない時は発育も悪く溶血価も低いが、1.0γ/ml 添加で発育も良好となり、溶血価も除鉄を行わないものと同程度に認められ、それ以上の鉄量の添加はこれと殆んど差を認めなかつた。(第5表)

第5表 Fe⁺⁺ 量と溶血価 (Fe⁺⁺ 量は培地 1ml 中の量)

稀釈倍数 Fe ⁺⁺ 量	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
0.1γ	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
0.5γ	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
1.0γ	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±
5.0γ	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±
10.0γ	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±

Fe⁺⁺ を 1.0γ/ml 添加した培地に Fe⁺⁺⁺ (FeCl₃), Cu⁺⁺ (CuSO₄·5H₂O), Ni⁺⁺ (NiSO₄), Co⁺⁺ (CoCl₂), Mn⁺⁺ (MnCl₂) を夫々 1.0γ/ml, 及び 10.0γ/ml 宛添加した培地について検討したが, 対照以上の溶血価を示すものは認めなかつた. Fe⁺⁺⁺, Cu⁺⁺ を 10.0γ/ml 添加したものでは却つて阻害的に作用した.

6. 発育素その他の物質の影響

1% Glucose 加肉汁ブイオンに次の7種の物質を添加して溶血価を検討した (括弧内数字は培地 1ml 中の濃度).

Vitamin B₁ (0.5mg, 1.0mg), Vitamin B₂ (0.1mg), Vitamin B₁₂ (1.5γ), Nikotin 酸 (0.1mg, 0.5mg), 核酸 (10mg), ヘーフェエキス (0.1ml), 肝臓エキス (0.1ml) : 牛肝臓を温水

にて滲出したもの. 以上について試みたが特に溶血毒産生に効果ありと認められるものはなかつた.

実験 I に対する総括並びに考按

Cl. perfringens についてその溶血毒産生を, 種々の培地及びこれに種々の物質を添加して実験を試みた. 溶血毒は各種の培地で産生されるが pH 7.4 肉汁ブイオンが最も良好であり, 更に 1% の割に Glucose を加えたものが最高の溶血価を示した. 種々の発育促進物質等の添加によつては見るべき成績を得なかつた. 一般に肝臓ブイオンを除いて, 菌の発育の良好のもの程, 溶血毒産生も良好のように思われる. 肝臓ブイオンでは発育良好なるに拘わらず毒素の産生が弱いのは肝臓片によるものと思われる.

II. 溶血毒産生の機序についての検討

所謂菌体外毒素なるものは菌の増殖時において細胞外の生活環境へ遊離されるものであつて, 細胞内には毒素成分を有しないという概念が従来多くの学者によつて考えられてきたのであるが, 近時菌体内の Cytoplasm がメジウム内に流出したものであるという説が多くなつて来ている. このことは所謂菌体外毒素を産生する Cl. tetani¹²⁾ 13), Cl. botulinum¹⁴⁾ 15), C. diphtheriae¹⁶⁾ 17), Sh. dysenteriae¹⁸⁾ 19) 20) などにおいて, 菌体から毒素の抽出或いは証明に成功している. Cl. perfringens の溶血毒についても, 菌体を崩壊せしめることによつてこれを証明したという報告⁵⁾ 21) があるが, 著者はこの毒素産生が果して菌の崩壊によつて産生されるも

のか否かという問題を中心として, 増殖と溶血毒産生, 生菌数, 酵素活性の消長の関係及び菌体内より毒素抽出の実験を行つた.

実験方法

供試菌株 : Cl. perfringens PB₆₄

培養基及び培養方法 : 1% Glucose 加ブイオン (pH 7.2) を用い, これに肝ブイオン 18時間培養の菌を接種し, 嫌気壺内に嫌氣的に所要時間培養した.

溶血毒力価測定は前実験に同じ.

発育菌量の測定 : 所要時間培養のものより一定量の培養液をとり, 遠心集菌し, 蒸留水にて 2 回洗滌の後, 一定量の蒸留水浮游液を作り, 光電値により元の培地 100ml 当りの mgN を算出した.

生菌数の測定 : 10, 24時間培養の培養液 50ml をとり遠心集菌し, これを 50ml の生理食塩水に再浮游

し、光電値より両菌液の mgN/ml 量を測定し、生理食塩水を24時間培養の菌液に添加して、両者の同一量中の菌濃度を等しい mgN 量にする。この菌液の同量を生理食塩水にて 10², 10⁴, 10⁶ 希釈を行い、夫々より 0.01ml を Zeissler 平板に塗布し、48時間嫌氣的培養を行い、各々 3 枚の平板上の集落数の平均値を算

出した。

酵素活性の測定： 所要時間培養後、遠心集菌し、pH 7.2, M/15 磷酸緩衝液にて 3 回洗滌後 4mgN/ml の静止菌液を作製し、Warburg 検圧計を用い、窒素気中における Glucose よりりのガス発生量を測定した。

実験成績並びに考按

1% Glucose 加肉汁 ブイオンを用いての培養時間と培養液の溶血毒力価との関係、培地中の発育菌量及び培地の pH について測定した結果は第 6 表に示す如くである。培地 100ml 中の菌量は18時間に至る迄漸次増加し、以後48時間迄は変化はなかつた。溶血価は菌の増殖と平行する。培地 pH は 6 時間目に 5.2, 10 時間目に 4.8 と下つてからは変化はなかつた。

第 6 表 培養時間と培地 pH, 溶血価, 発育量の関係

培養時間	4	6	10	14	18	24	48
培地 PH	5.2	5.2	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
溶血価	2	8	128	256	512	512	512
菌量	2.2	4.5	7.3	14.1	17.5	17.5	17.5

(溶血価はHの最大希釈倍数, 菌量は mgN/100ml を示す. 1% Glucose 加肉汁ブイオン使用.)

対数増殖期の培養10時間及び極期静止期の24時間の同一菌量中の生菌数の値は第 7 表に示し

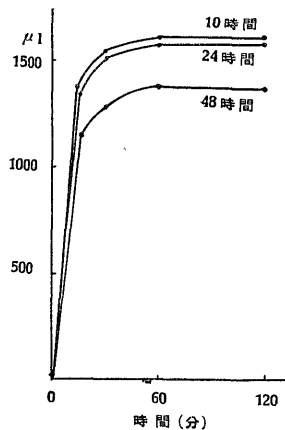
第 7 表 培養10, 24時間における同一菌量中の生菌数の比較

菌液希釈倍数	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
10 時間	536	26	5
	347	14	5
	528	13	4
平均値	470	18	5
24 時間	540	25	2
	570	30	11
	486	23	7
平均値	532	26	7

た如く、後者が稍々多いようであるが大差は認めなかつた。

培養10時間, 24時間, 48時間のものより作製した静止菌液について、Warburg 検圧計を用い窒素気中における 0.02M, 1.0ml Glucose より発生するガス (H₂ 及び CO₂) 量を測定することにより酵素能の消長を検討した。第 1 図に示す如く10時間, 24時間のものでは殆んど差を認めず、48時間のものにおいて稍々減少する傾向を認めた。

第 1 図



註 窒素気中における Glucose よりりのガス発生. Glucose 0.02M, 1ml 菌液 4mgN/ml, 0.5ml Phosphate Buffer pH 7.0, 0.2M, 0.5ml

以上の成績から見るに Cl. perfringens は培養 4 時間目頃より対数増殖期に入り、16時間頃で極期に達し以後菌の増殖は見られない。培養液上清の溶血毒力価は培養液の混濁と共に現われ、増殖と共に増加し極期に達してからは変化はなかつた。この間対数増殖期である10時間目及び極期を過ぎた24時間目のものの同一菌量中の生菌数においても殆んど差を認めない。又酵素活性の点について見ても培養10時間, 24時間

の菌において殆んど差を見なかつた。

C. diphtheriae¹⁷⁾ においては増殖に伴つて單位菌量中の生菌数が著しく減少し、又酵素活性も急激に降下してゆく現象、又 Cl. tetani¹⁸⁾ において毒素が培養液中に出現し始める頃に、培地中の菌量が著明に減少してゆくという事実と比較して見るに以上の Cl. perfringens の成績とは全く趣を異にするのである。

東山¹⁹⁾ は Cl. tetani の若い菌体を用い、菌体内より毒素の抽出に成功しているし、西田²⁰⁾ も又 C. diphtheriae の菌体内に毒素の存在を認めている。Cl. perfringens においても菌体を超音波による破壊²¹⁾、凍結融解による破壊²²⁾ によつて溶血毒を認めたとの報告がある。著者も菌体内毒素の証明の目的で次の実験を行った。培養10時間の菌体を遠心集菌し、生理食塩水にて3回洗滌し、菌体を湿菌菌体重量 (gr) : 生

理食塩水=1:5 の割合に生理食塩水に浮游した。この菌体浮游液にトルオールを加えて氷室及び孵卵器内にて自家融解を行わせ、1週間の間毎日 2ml 宛これを取り、遠心上清につき溶血価を測定したが、何れも0であつた。又該菌液を凍結融解20回繰返した後、乳鉢内にて手ずり40分待つた後の遠心上清についても同様測定したが、これにも溶血毒を認めることはできなかつた。

所謂菌体外毒素産生菌の毒素産生が菌体の崩壊によつて起るとする根拠となる実験の主なるものについて Cl. perfringens を用いての実験を試みたが、何れも菌体崩壊を裏づける成績を認めなかつた。Cl. perfringens の溶血毒は菌の増殖と共に培養液中に産生され、菌の崩壊又は Autolysé といつた現象によるものではないと推察される。

結 語

Cl. perfringens の溶血毒について次の結果を得た。

1. 溶血毒は pH 6.0 において最高の溶血価を示した。
2. 各種培地及びこれに添加せる糖類、金属イオン及び7種の発育促進物質の影響について

観察し、1% Glucose 加肉汁ブイヨンが溶血毒産生に最適の培地であることを認めた。

3. 溶血毒産生は菌体の崩壊又は融解によるものではないと推定される種々の結果を得た。

稿を終るに当り恩師谷友次教授の御指導と御校閲を深く感謝致します。

文 献

1) Bull, C. H. & Pritchett, I. W. : J. exper. Med., 26, 119 (1917). 2) Tamura, J. T., Tytell, A. A., Boyd, M. J. & Logan, M. A. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 47, 284 (1941). 3) 米沢和一 : 東京医事新誌, 66 (5), 20 (昭24). 4) 高橋喜代志 : 長崎医学会雑誌, 9 (3), 589 (昭6). 5) 片柳常作 : 慶応医学, 9, 651, 1077 (昭4). 6) Pappenheimer, A. M. : J. of Biol. Chem., 167, 251 (1947). 7) Mueller, J. H. & Miller, P. : J. of immunol., 47, 15 (1943). 8) Pappenheimer, A. M. & Shaskan, E. : J. of Biol. Chem., 155, 265 (1944). 9) Bard, B. C. & Gunsalus, I. C. : J. Bacter., 59, 387 (1950). 10) 柴田道也 : 十全医学会雑誌, 57 (4), 836, 840, (昭30). 11) 細谷省吾著 : ゼフテリアの子

防, p. 161, 南条書店, (昭22). 12) Raynaud, M. : Compt. Rend. Acad. Sci. 225, 543 (1947). 13) 東山晃 : 大阪医学会雑誌, 9, 307 (1950). 14) Nelson, C. I. : J. infect. Dis., 41, 9 (1927). 15) Boroff, D. A., Raynaud, M. & Prévot, A. R. : J. infect. Dis., 63, 503 (1952). 16) Eisler, M. : Schweiz. Z. All. Path. Bakt., 13, 708 (1950). 17) 西田尚紀 : 日本細菌学雑誌, 9, 843, 917, 1045 (昭29). 18) Dubos, R. J. & Geiger, J. M. : J. of exper. Med., 84, 143 (1946). 19) Okell, E. C. & Blake, A. V. : J. of Path. & Bacter. 33, 57 (1930). 20) Weil, A. J. : J. of immunol. 55, 363 (1947). 21) 唐司藏人 : 日本細菌学雑誌, 1, 230 (昭19).