

嫌気性諸菌芽胞接種による 感染試験について

金沢大学医学部日置内科教室 (主任 日置教授)

與 儀 實 治

Smoharu Yogi

(昭和29年7月8日受附)

緒 言

由来病原性嫌気性菌の多くは劇烈な毒素形成を営み、これによつて生体が障害を受けること甚大なるものがあるので、これに対する静菌乃至殺菌剤の効用を検せんとするが如き場合、その芽胞接種により感染を企図し、未だ毒素形成の十分ならざるに先立つて、薬剤の菌に対する直接作用を窺うことが宜く行われる。然るに一般にそれら嫌気性諸菌の芽胞のみを接種しても感染せしめることは難いので、これがために或いは化学薬品、異物等を同時に接種して組織を挫滅損傷し、或いは接種局所の酸素欠乏を招来すべき各種の方法を講ずること等によつてその目的を達している。即ち従来文献を渉獵するに、先ず最初は自然の状態を真似て芽胞と共に土壌を切開創を通じ皮下に挿入することが試みられたが、その意味の一つは兎に角に適当な異物の介入があれば宜いということ、二は主として好気性菌による混合感染が行われるということにあるので、その後の感染試験はこの両方面に向つて開始せられ、夫々に感染に成功することが出来た。而うして異物として用いられた固形物質には前記土壌の外に木片、櫛の齒、浮石片等各種の物質が存したが、その感染を誘起すべき機序に至つては各様の解釈が行われた。例えばその一つは組織の損傷により無酸素状態が惹起せられ、これによつて嫌気性菌の増殖が容易ならしめられるとするものである。又志村の如きは無水珪酸系の Silica, Kaolin, Bentonite,

Talc, Acid-Clay, Kieselgur 等を使用して同じく感染を誘起せしめ、土壌による感染促進をそれらの主成分たる珪酸の補体吸着作用に帰せしめんとした。まこと組織の挫滅が一つの原因であるとすれば、敢て異物を外部より挿入するにも及ばぬ訳で、骨、軟部組織を骨折その他により故意に挫傷せしめてもこれ又優に感染惹起の誘因たり得るのである。更に異物としては独り固形物質に限るべきでない。特定化合物の溶液、細菌毒素を以てしても同様の目的を達し得ることが知られている。就中 Bullock & Cramer は、Clostridium welchii, Clostridium tetani, その他の洗滌芽胞接種と同時に局所に塩化カルシウム液の注射を行う時は極めて典型的に致命的感染を起すことを確認したのであるが、これは極めて簡便でもあるので、その後屢々人の能く用うる所となつている。その感染促進機序については当時不明のままこれに Kataphylaxis なる名称を氏等は与えていた。しかしそれは要するに固形異物でなくても組織損傷を与えさえすれば宜いという好適例に外ならないのであつて、その他化合物の溶液としてキーネ、乳酸等が用いられたのも亦恐らく同一原理に基づくものと思われる。而も組織の損傷はその根柢において無酸素性状態を招致せしめるという意義が多分に含まれるので、これは好気性菌の混合感染を行わしめるという方法にも通じている。これがために或いは還元性の強い物質を用いれ

ば、たとえ組織に損傷を与えることが少なくともこれ亦感染を成功せしむるに十分である訳であるが、このことについては更に後に少しく触れることとする。なおその外白血球を接種部位より遠ざけることにより、菌芽胞をして白血球の食作用より免れしめて発芽を赴かせるといつた方法も採られている。Berzelius 紙、Feilot 紙の袋中に芽胞を収めて接種し発病せしめたるが如き、それである。しかし P. Fildes はモルモットの血管結紮後の睪丸内における破傷風菌芽胞の運命について観察した結果、白血球の喰菌作用開始以前に芽胞が発芽して動物をして速かな致命的毒血症に陥らしめることを確認したということである。

かのようにして諸家の実験に示されるように、芽胞接種により感染せしめる方法は多々あるが、同一方法を以てしてすべての嫌気性菌感染に成功するとは限らない。例えば異物として木片を用いた場合、多くの爾余の嫌気性菌発育

には成功しても、*Clostridium novyi* においては発病せしめることの困難に逢着するのである。塩化カルシウム液による組織挫滅の方法の如きは比較的一般に通ずる所であるが、これでは組織の器械的損傷が余りにも甚だしい。そこで著者は初め *Clostridium novyi* において、芽胞と共に接種すべき適当な異物を木片以外に求めた所、肝小片を以てして甚だ容易に感染せしめ得ることを見出し得たので、果して同方法が他の嫌気性菌感染にも通ずるや否や、且つ又爾他の臓器小片接種がこの場合如何なる結果を示すか、それらの成績を比較検討すべく本実験を試みた。蓋し当初肝組織を用いた所以は、それが異物であると同時に比較的少量に還元能を有する物質を含有する点を利用して嫌気性培養の一法を正に接種部位において再現せんと欲したもので、文献を渉獵しても斯る方法を用いたものがあることを見出すことが出来なかつた。

実験材料並びに実験方法

1. 実験動物

体重18乃至20瓦の健康マウスを使用した。

2. 菌 種

Clostridium novyi 140 株 (北里研究所保存)

Clostridium histolyticum H₂₂ 株 (北里研究所保存)

Clostridium welchii P. B₂₆ 株 (本学医学部細菌学教室保存)

Clostridium tetani U. S. A. 株 (本学医学部細菌学教室保存)

Vibrio septique 防研株 (本学医学部細菌学教室保存)

3. 芽胞液作成方法

諸家の記載する処によれば、諸嫌気性菌は菌種によりその芽胞並びに菌毒素の耐熱力において差異を認めしめるということであるので、夫々各菌種別に次の如き操作に従つて芽胞液の作製に当つた。

a) *Clostridium welchii*

他の嫌気性諸菌に比して本菌の芽胞並びに毒素は加熱に対して甚だ抵抗力が弱く、即ち芽胞においては、90°C では30分間にて、100°C では僅か5分間にて死

滅し、毒素に在りては 60°C 15分間の加熱によつて完全に破壊せられる。従つて1週間培養の一白金耳を探り、ギームザ氏液にて加温染色を行い明らかに芽胞の存在することを確かめた後、菌液を重湯煎中にて 60°C 15分間加熱してここに芽胞液を得た。

b) *Clostridium novyi*

本菌の芽胞は培養後24時間にて発現し、4乃至6日で最高に達する。而して本菌の芽胞を死滅せしめるには 100°C 分間乃至40分間の加熱を要し、又毒素は 50°C 30分間の加熱により完全に壊れる。従つて肝片加ブイオンにて培養第5日目の菌液をメチレン青にて染色を行い明らかに芽胞の存在することを確かめた後、菌液を重湯煎中にて 50°C 30分間加熱したものを芽胞液として使用した。

c) *Clostridium histolyticum*

本菌の芽胞は培養2日乃至3日目に多数現われる。本菌の芽胞は 100°C 60分間の加熱により死滅し、而して培養液内の毒素の消長を見るに、或いは培養後已に20時間にして全く消失することあり、或いは又培養24時間前後において最高に達したる後減弱することあ

り、従つて培養第3日目の菌液中には毒素の存在は皆無であるか、しからずばその含量は極めて僅少であると看做して支障はないのであるが、更に毒素の破壊を完全ならしめんがために該菌液を重湯煎中にて 50°C 30分間加熱して、しかる後にこれを芽胞液として用いた。

d) *Vibrio septique*

本菌芽胞の耐熱力は培養の条件によつて様々であり、100°C 前後にて30分の加熱に耐え得る場合もある。しかし本菌の毒素は 70°C にて30分乃至60分の加熱により完全に破壊されるといわれる。従つて本菌の48時間培養液を重湯煎中にて 70°C 60分間加熱して、これを芽胞液として用いた。

e) *Clostridium tetani*

本教室西川の文献に従い、培養1カ月を経過せる本菌液を重湯煎中 75°C 乃至 80°C にて60分間加熱し菌毒素を破壊したる後、これを芽胞液として使用した。

なお上記各菌芽胞液はその使用に当り、念のためその一白金耳を採つて肝片加ブイヨンにて培養を行い、毒素を破壊するための加熱操作によつて芽胞そのものの死滅していないことを確かめた。

4. 接種用木片、肝片、脾片、並びに腎片の調製

木片の材料としては少しく硬目の「割箸」を、又臓器片の材料としては 100°C 30分間煮沸して硬くなつた牛の肝臓、脾臓、腎臓を使用して、何れも一辺3mm の立方形にこれを取揃えた。

5. 芽胞附着木片、肝片、脾片、腎片作製法

上記木片は予めこれをシャーレに入れ、乾熱滅菌器中 (150°C) にて 120 分間滅菌し、木片が軽度に褐色を帯ぶる程度に至らしめた。又肝片、脾片、腎臓は夫々浄水を注入せる小試験管中にこれを収めて、コッホ氏蒸気釜中にて 100°C 30分間3回 (毎日1回宛3日間) 滅菌したる後それらを試験管より取り出して臓器片の種類別に夫々異つた滅菌シャーレ中に移した。次いで上記シャーレ中に各菌の芽胞液を無菌的に注ぎ込み木片並びに臓器片を充分に芽胞液に浸し、しかる後これら木片並びに諸臓器片を夫々別の滅菌シャーレ中に取り出し、硫酸乾燥器中に入れ低圧の下に冷暗所に置き乾燥せしめた。

6. 芽胞接種

接種に際して先ずマウスの右腰背部を中心とし右臀部、右肩胛部迄小鋏を以て皮膚を傷つげざるように注意を払いつつできる限り短かく毛を剪除する。次いで型の如く皮膚をアルコールにて清拭し、マウスの尾根

部に近き臀部に小切開を加え、この創口より耳鼻科用ピンセットを皮下に挿入しこれを囊状に拡げ、前記芽胞附着木片、肝片、脾片並びに腎片を創口より右腰背部皮下に挿入、而して創はコロデウムを以てこれを閉鎖した。

7. 感染促進を目的として試用に供せられたる薬物の種類とそのマウス1頭当り注射容量

葡萄糖液 0.1cc (10mg 含有)

ビタミンC液 0.1cc (10mg 含有)

グルタチオン液 0.1cc (10mg 含有)

なお比較試験として塩化カルシウム溶液の注射を試みたる場合には毎頭につきその2%液 0.1cc を使用した。

8. 観察方法

a) 結果の判定

病原性嫌気性菌による実験的感染に成功せる場合には、各菌種に特有なる症状の下に遂に実験動物をして斃死せしめるといふ結果を招くのであるが、各菌種により感染より死に至る迄の期間における局所並びに全身症状において若干の相違が認められるのみならず、同一菌株においてもその培養状況の些細なる変動によつて、例えば感染発現に成功することはあつても致命的感染に至らず局所的症状のみに留まることあり、時に又局所症状の甚だ軽微なるにも拘わらず、動物をして迅速に致命的毒血症に迄赴かせることもあり、感染発現時における症状は軽重様々なるを以て、以下諸家の記載を下として著者の採用せる大凡の感染判定基準を各菌種別に略記する。

1. *Clostridium welchii*

接種せる局所にガス蜂窩織炎を生じ、皮膚は緊張して湿潤し、褐綠色又は赤紫色を呈してこれに触れば捻髪音を証明し、通常接種後12時間乃至24時間内に動物は斃死する。而して局所を切開して壊疽組織より *Cl. welchii* に一致する菌を明らかに認めた時、これを感染成績陽性と看做した。

2. *Clostridium novyi*

まず接種せる皮下に局所性の浮腫が現われる。浮腫は大きくてゲラチン様で、時に軽い発赤を認めしめる。次いで動物の動作は漸次緩慢となり、終に動かなくなり、間代性の痙攣を起し、呼吸は遅くなり、体温が急に下つて死亡する。芽胞接種後10日迄に上記症状の下に斃死して局所の壊疽組織より培養により *Cl. novyi* に一致する菌を明らかに認めた時にこれを感染成績陽性と看做した。

3. *Clostridium histolyticum*

接種局所の皮膚は赤紫色となり、軽度の柔軟なる浮腫を生じて24時間乃至48時間前後に自然に体外に破れ、消化された組織を含む血性の液を出し、動物は呼吸困難を起して横に倒れ、頭及び四肢を痙攣的に震わせて倒れる。但し菌の毒力弱き場合には動物をして致死的毒血症を惹起せしめ得ない場合も存する。即ち斯かる場合には局所性浮腫に続発せる組織融解に基づく潰瘍形成を目標として、これを認めたる場合に感染成績陽性と看做した。

4. *Vibrio septique*

芽胞を接種せる局所に初め湿つた痂皮を生ずる。次いで捻髪音を伴い、浮腫が急速に拡大すると共に動物は漸次麻痺を来たして動かなくなり、終に昏睡に陥入り、呼吸の停止によつて斃れる。局所を切開するに痂皮の下には出血性の浮腫と水泡とを認め毎常本菌の存在を明らかに証明する。以上の場合を感染成績陽性と看做した。

5. *Clostridium tetani*

接種後数日間の潜伏期を経過せる後、接種側の下肢に先ず強直性痙攣を発現してそれが漸次強度となり、終に臍部を上方に向けて強直性伸展を来たし、更に両下肢共伸展を来たすようになり、少しの刺戟によつても全身の強直性痙攣並びに後弓反張を致して終に動物は斃死するに至る。以上の経過、症状の発現を見た場合にこれを感染成績陽性と看做した。

b) 観察期間

観察期間を通常1カ月間と定めた。しかし今上記嫌気性諸菌の芽胞による実験的感染に成功せる場合においては感染せる動物は何れの菌種にありても芽胞を接種してより1週迄に相前後して斃れ、若しくは局所症状を発現する。而してそれ迄に感染に成功しなかつた動物群においては観察期間を更に延長して1カ月間とするも新たに感染症状の発現することを全く認めることがなかつた。従つて以下感染成績を表示するに當つて芽胞接種後10日以後の成績はすべてこれを省略することとした。

実 験 成 績

1. *Clostridium novyi* 感染成績

予め前述せる如き操作によつて得られた本菌の芽胞液0.1ccを夫々5頭のマウスに皮下注射して10日間観察するに、全部悉く無症状に留まつたので、更に芽胞液の注射量を増加して0.3ccとしたがこれ又前回同様悉く無症状にて生存した。これに反して上記操作を施さざる菌毒素を含む芽胞液(全培養液)の0.1cc宛の注射を行つた対照群にあつては注射後24時間迄に全群悉く斃れた。かくして毒素を含まざる芽胞浮游液のみの注射を以てしては動物をして感染せしめるのに甚だ困難なることを確認した。

次いで菌芽胞と共に動物体内に挿入せられた異物が果して感染促進の作用を有するや否や、更に又異物として使用せられる材料の質的相異により、感染を促進する作用に優劣が認められるか否か、これらの点を解明せんがために、異物として木片、肝片、脾片、腎片を選び、前述せる方法に従つて本菌の芽胞を附着せしめ、各群夫々5頭のマウスを使用して接種を行い、結

果を観察した。

その成績は第1表において示されたる如く、異物として木片を使用せる群にあつては全群悉く無症状にて生存した。これに反して異物として臓器小片を使用せる群においては、先ず肝小片を使用せる場合、接種後第3日目に5頭中の1頭が本菌個有の症状を現わして斃れ、接種後第4日目には3頭が、而して第5日目に残存せる最後の1頭が斃れ、ここに全頭をして悉く感染せしめるに成功した。次いで脾小片を使用せる群においては、接種後第3日目に5頭中の1頭が斃死し、第4日目には他の4頭が悉く斃れた。又腎小片を使用せる場合には接種後第3日目に5頭中1頭が斃れ、第4日目には3頭が、第6日目に残る1頭が斃れた。而して今異物として臓器小片を使用せる各群につきこれを比較検討するに、何れの臓器片を使用したとを問わず接種後早きは第3日目に、遅くとも第6日目迄には動物をして悉く感染斃死せしめて、その間に多くの遅速を認め得ない。即ち肝片、脾

第1表 Cl. novyi 芽胞の附着せる木片, 肝片, 脾片並びに腎片を皮下に挿入せる場合の感染成績の比較

接種後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	死	0	0	1	3	1						$\frac{5}{5}$
	生	5	5	4	1	0						
脾片群	死	0	0	1	4							$\frac{5}{5}$
	生	5	5	4	0							
腎片群	死	0	0	1	3	0	1					$\frac{5}{5}$
	生	5	5	4	1	1	0					

片, 腎片の各臓器片は何れも本菌芽胞による実験的感染を促進する作用を有することが明らかであり, 且つこれら臓器片の感染促進作用には何れも優劣を見出し難い。

次いで上記方法に従つて滅菌し置きたる芽胞

の附着せざる木片, 肝片, 脾片, 腎片を夫々5頭宛のマウスに予め皮下に挿入せる後これら異物の周囲に本菌芽胞液 0.1cc 宛の注射を行い, 前記方法による感染成績との比較を試みた。その成績は第2表において示されたるが如く, 異

第2表 皮下に挿入せる木片, 肝片, 脾片並びに腎片の周囲に Cl. novyi 芽胞液 0.1cc を注射せる場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	死	0	4	1								$\frac{5}{5}$
	生	5	1	0								
脾片群	死	0	1	3	1							$\frac{5}{5}$
	生	5	4	1	0							
腎片群	死	0	0	4	1							$\frac{5}{5}$
	生	5	5	1	0							

第3表 皮下に挿入せる木片の周囲に Cl. novyi 芽胞液夫々 0.2cc 並びに 3.0cc を注射せる場合の感染成績

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
芽胞液 0.2cc 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
芽胞液 0.3cc 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

物として木片を使用せる群においては前回同様全く無症状に留まりたるも、肝片使用群にありては、注射後第2日目に5頭中4頭迄が斃れ、第3日目には他の1頭が斃れた。脾片使用群においては第2日目に5頭中1頭が斃れ、第3日目には3頭が、而して第4日目には残る1頭が斃れた。腎片使用群にありては第3日目に5頭中4頭が、第4日目に残る1頭が斃れ、かくして臓器片使用群にあつては芽胞液の後注射によつても確実に感染の発現に成功することが判明した。而して芽胞液の後注射による方法を以てすれば、前回の芽胞附着臓器片による接種方法に比較して、肝片使用群においては接種してより動物の斃死し始める迄に要する時間を24時間だけ短縮することが出来るのみならず、更に全群が悉く斃れる迄に要する時間を48時間だけ短縮することが出来た。又脾片接種群においても芽胞液後注射法を以てすれば、接種してより動物の感染斃死し始める迄に要する時間を矢張り24時間だけ短縮した。但しこの場合全群が悉く斃れ終る迄の時間には前回の実験成績との間に差異を認めなかつた。更に又腎片接種時においては芽胞液後注射法を以てせる場合、接種してより試獣の感染斃死し始める迄に要する時間については前回と差異を認めなかつたが、全群の悉く斃れ終る迄の時間を48時間だけ短縮した。

異物に芽胞を附普させて接種する方法に比較して、斯くの如く芽胞液の後注射により感染死の速められる所以は恐らく動物体内へ接種せられる芽胞の數量の相違に基づくものと思われる。そこで更めて木片接種の際における芽胞液の注射量を増加しマウス1頭につき夫々0.2cc並びに0.3ccとなして、これを各群5頭のマウス皮下に注射を行いその成績を10日間に涉つて観察したがこの場合は矢張り各群共悉く無症状のまま生存し、木片では如何に芽胞量を増量しても動物をして感染せしめ得ず、異物としての諸臓器片は木片に比して甚だ勝れていることが確認せられた。

次いで葡萄糖, Ascorbic Acid, Glutathion 等

の還元性物質を選んでこれら物質が本菌芽胞による感染の発現に何らかの促進的作用を有するや否やを検討し、併せて従来諸家において試みられて来た塩化カルシウム液による芽胞液の注射を以てする感染試験を試みた。即ち実施に當つては本菌芽胞附着木片を各群夫々5頭のマウス皮下に挿入し置き、その後直ちに木片の周囲に夫々葡萄糖液 0.1cc (10mg), Ascorbic Acid 0.1cc (10mg), Glutathion 0.1cc (10mg) の注射を行い、対照群にあつては芽胞附着木片のみを皮下に挿入した。又一方同数の試獣群に予め2%塩化カルシウム液を以て1倍並びに10倍に稀釈せる芽胞液を調製して置き、異物としての木片を挿入することなく直ちにこれら2種類の芽胞液 0.1cc 宛を皮下に注射、対照群には生理的食塩水による夫々1倍並びに10倍稀釈芽胞液の0.1cc 宛のみの注射を行つた。その結果は第4表について見るように、先ず葡萄糖液注射群にあつては注射後第4日目に5頭中の1頭が本菌に固有なる症状の下に斃れ、更に第6日目に他の1頭が斃れ、他の3頭は全く無症状に生存した。然るに Ascorbic Acid 注射群にあつては注射後4日目に5頭中僅かに1頭が斃れたのみで、他の4頭は悉く無症状に留まり、Glutathion 注射群にあつては感染の発現は全く見られなかつた。

一方塩化カルシウム芽胞液注射群においては第5表に示される如く、1倍稀釈芽胞液並びに10倍稀釈芽胞液注射群共に注射後24時間迄に全群悉く斃死した。

以上の成績より、少なくとも上記濃度において使用せられる限り、上記還元物質中本菌芽胞による感染の発現を多少共促進する作用を有するものとして僅かに葡萄糖並びに Ascorbic Acid を挙げ得るも、而も未だ臓器片の確實強力なるには何ら及び得ざることが知られた。但し塩化カルシウム液については従来諸家の試み来つた如く極めて確實なる方法の一つであることが確認せられた。

2. Clostridium welchii 感染試験

第4表 皮下に挿入せる Cl. novyi 芽胞附着木片の周圍に葡萄糖, ビタミン C 並びにグルタチオン溶液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
葡萄糖液 10mg 注射群	死	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	$\frac{2}{5}$
	生	5	5	5	4	4	3	3	3	3	3	
ビタミンC液 10mg 注射群	死	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	$\frac{1}{5}$
	生	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	
グルタチオン液 10mg 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
対照群 (芽胞附着木片のみを皮下に挿入す)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

第5表 2% CaCl₂ 液にて種々に稀釈せる Cl. novyi 芽胞液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
1倍稀釈芽胞液注射群	死	5										$\frac{5}{5}$
	生	0										
10倍稀釈芽胞液注射群	死	5										$\frac{5}{5}$
	生	0										
対照群 (生理的食塩水による1倍稀釈芽胞液注射)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

同じく前記方法に従つて調製せられた本菌芽胞液を 0.1cc 宛夫々マウス 5頭の皮下に注射し、その結果を10日間に涉つて観察し全頭全く無症状に留まることを予め確めた。次いで本菌の芽胞附着木片、肝片、脾片、腎片を各群夫々5頭のマウス皮下に接種してその結果を観察せるに、第6表において示されたる如く、これ又何れの異物接種を行うも感染の発現せるものを全然認め得なかつた。

而うして芽胞を附着せしめざる木片並びに臓器諸片を予めマウスの皮下に挿入して置き、それら異物の周圍に本菌芽胞液 0.1cc 宛を注射して感染試験を試みたる成績も亦第7表において示されるように同様発病陰性の結果に終つた。又更に二、三還元性物質が本菌芽胞による感染の発現に何らかの促進的作用を有するや否やを

検すべく前回と同様、葡萄糖, Ascorbic Acid, Glutathion の夫々 10mg を滅菌蒸溜水 0.1cc に溶解し、これを各群夫々5頭のマウス皮下に予め挿入して置いた芽胞附着木片の周圍に注射を行うと共に、一方2%塩化カルシウム液に浮遊せしめたる芽胞液 0.1cc の注射による感染試験をも併せ行えるに、その結果は第8表並びに第9表において示された如く、これ又全然陰性の成績を呈した。

以上の成績を見るに、木片は無論のこと臓器性の異物、還元性物質、塩化カルシウム液注射も亦本菌芽胞による感染を誘発するに極めて無力なることが知られた。

因みに本菌使用に當つては再三「マウス」を通過させることによつてその毒力の向上が計られた。

第6表 Cl. welchii 芽胞の附着せる木片、肝片、脾片並びに腎片
を皮下に挿入せる場合の感染成績の比較

接種後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
脾片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
腎片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

第7表 皮下に挿入せる木片、肝片、脾片並びに腎片の周囲に Cl. welchii
芽胞液 0.1cc を注射せる場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
脾片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
腎片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

第8表 皮下に挿入せる Cl. welchii 芽胞附着木片の周囲に葡萄糖、ビタミン
C 並びにグルタチオン溶液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
葡萄糖液 10mg 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
ビタミンC液 10mg 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
グルタチオン液 10mg 注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
対照群 (芽胞附着木片のみを皮下に挿入す)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

第9表 2% CaCl₂液にて種々に稀釈せる Cl. welchii 芽胞液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
1倍稀釈芽胞液注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
10倍稀釈芽胞液注射群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
対照群 (生理的食塩水による 1倍稀釈芽胞液注射)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

3. Clostridium histolyticum 感染試験

先ず前記試験方法の項に記載せる所に従つて調製せられた本菌芽胞液の0.1ccを5頭のマウスに型の如く皮下注射し、その結果を10日間に涉つて観察せるも全頭悉く無症状に留まつた。

次いで本菌の芽胞附着木片、肝片、脾片、腎片を各群夫々5頭のマウス皮下に接種してその結果を観察せるに、第10表に示されたる如く、木片接種群にあつては全観察期間を通じて全頭悉く無症状に留まつたが、臓器片接種群では肝片

第10表 Cl. histolyticum 芽胞の附着せる木片、肝片、脾片並びに腎片を皮下に挿入せる場合の感染成績の比較

接種後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	組織融解	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	無症状	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	組織融解	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{5}{5}$
	無症状	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
脾片群	組織融解	0	0	0	3	5	5	5	5	5	5	$\frac{5}{5}$
	無症状	5	5	5	2	0	0	0	0	0	0	
腎片群	組織融解	0	0	1	3	5	5	5	5	5	5	$\frac{5}{5}$
	無症状	5	5	4	2	0	0	0	0	0	0	

による場合、接種後第4日目に5頭悉くにおいて接種せる局所の皮膚が破れ、直径4耗乃至6耗に達する潰瘍の形成を見るに至つた。但し何れも致命的感染を惹起することなく、試獣は全観察期間を通じてすべて生存することが出来た。脾片接種群にあつては、接種後第4日目に5頭中3頭、第5日目に他の2頭が夫々接種せる局所に前述せるが如き性質の潰瘍形成を認めしめたが、これ又致命的感染より免れて全頭生

存した。而うして腎片接種群にあつては、接種後第3日目に5頭中1頭、第4日目、第5日目に夫々2頭が接種局所に前同様の潰瘍形成を認めしめたが、動物はすべて致命的感染を受けるには到らなかつた。

次いで本菌芽胞の附着せざる木片、肝片、脾片、腎片を予めマウスの皮下に挿入して置きそれら異物の周囲に本菌芽胞液の0.1cc宛を注射し、前記方法による感染成績との比較を試み

た。その成績は第11表において示す如くであつた。即ち木片挿入群においては、注射後第3日目に5頭中4頭、第4日目に他の1頭が夫々注射局所に組織融解による潰瘍の形成を認めしめ、肝片挿入群においては本菌芽胞液注射後第

2日目に全頭悉くが注射局所に潰瘍形成を呈した。又脾片挿入群にあつては芽胞液注射後第2日目に5頭中1頭、第3日目に他の4頭悉くにおいて注射局所に組織融解性潰瘍の形成を見、腎片挿入群にあつては注射後第2日目に

第11表 皮下に挿入せる木片、肝片、脾片並びに腎片の周圍に *Cl. histolyticum* 芽胞液 0.1cc を注射せる場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	組織融解	0	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	5	1	0	0	0	0	0	0	0	
肝片群	組織融解	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
脾片群	組織融解	0	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
腎片群	組織融解	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

において全頭が同様の潰瘍形成を認めしめた。但し上記臓器性異物挿入群の何れにおいても感染は局所的病変を惹起するのみに止まり、動物は各群共全期間を通じて良く生存することが出来た。なお本菌に関して2%塩化カルシウム液に

よる1倍及び10倍稀釈芽胞液注射による感染試験を行える結果は第12表にその成績を示す如くで、1倍稀釈芽胞液注射群においては、注射後2日目に5頭中既に4頭が、第3日目に残り1頭が夫々注射局所に組織融解性潰瘍を形成し、

第12表 2% CaCl₂ 液にて種々に稀釈せる *Cl. histolyticum* 芽胞液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
1倍稀釈芽胞液注射群	組織融解	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
10倍稀釈芽胞液注射群	組織融解	0	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5/5
	無生症状	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
対照群 (生理的食塩水による1倍稀釈芽胞液注射)	組織融解	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	無生症状	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

10倍稀釈芽胞液注射群においては、注射後第2日目に5頭中2頭、第3日目に残余の3頭が夫

々注射局所に組織融解性潰瘍の形成を認めしめたが、この場合も亦全試獣において致命的感染

を見るには到らなかつた。

以上の成績を按ずるに、本菌の芽胞を以てする感染に當つて、異物としての諸臓器片は木片に比較して感染発現力において明らかに勝れており、塩化カルシウム液による芽胞液注射方法に比して遜色のないことが判明した。但し木片にあつても条件に恵まれた場合、即ちその一つの例として芽胞の接種量が比較的豊富なる場合においては、感染の発現に寄与し得ることが十分に窺われる。

4. *Vibrio septique* 感染試験

予め前記方法に従つて作られた本菌の芽胞液 0.1cc 宛を 5 頭のマウス皮下に注射せるも、10 日間の観察期間を通じて全頭悉く無症状にて生存することを確めた。

次いで本菌の芽胞附着木片、肝片、脾片、並びに腎片を各群夫々 5 頭のマウス皮下に接種して第13表において示されたる如き成績を得た。即ち木片接種群にありては全観察期間を通じて全頭悉く無症状に留まりたるも、臓器片による

第13表 *Vibrio septique* 芽胞の附着せる木片、肝片、脾片並びに腎片を皮下に挿入せる場合の感染成績の比較

接種後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
肝片群	死	0	0	2	3							5/5
	生	5	5	3	0							
脾片群	死	0	0	3	1	1						5/5
	生	5	5	2	1	0						
腎片群	死	0	0	0	1	2	2					5/5
	生	5	5	5	4	2	0					

接種群にありては各群共に良く感染発現に成功して悉く動物を斃すを得た。即ち肝片接種群においては、接種後第3日目にして5頭中2頭が、第4日目に他の3頭が斃れた。又脾片接種群にあつては、接種後第3日目に5頭中3頭が斃れ、第4日目と第5日目とに夫々1頭が斃れた。而うして腎片接種群においては、接種後第4日目に5頭中1頭が斃れ、第5日目と第6日目とに夫々2頭が斃死した。芽胞を附着させない木片、肝片、脾片、並びに腎片を予めマウスの皮下に挿入して置きそれら異物の周囲に本菌芽胞液 0.1cc 宛の注射を行える感染成績はこれを第14表に示した。即ち異物として木片を挿入せる群においては芽胞液注射後第3日目に5頭中3頭が斃れ、第4日目に1頭、第6日目に残る1頭が斃れた。一方肝片挿入群にては芽胞液

注射後既に第2日目に5頭中3頭が斃れ、第3日目に他の2頭が斃死した。又脾片挿入群にあつては芽胞液注射後第2日目に5頭中1頭が、第3日目に他の4頭悉くが斃れ、腎片挿入群にあつては、芽胞液注射後第2日目に5頭中1頭、第3日目と第4日目とに夫々2頭宛が斃死した。

斯くて異物として木片を使用し、本菌の芽胞をこれに附着せしめて接種を行つて見ても感染を発現せしめ得なかつたには拘わらず、予め挿入し置きたる木片の周囲に芽胞液の注射を行つた場合には確実に感染を発現せしめ得ること、従つて特定の条件、恐らくは芽胞量を増したる場合には木片と雖も本菌の感染発現に対して促進的作用を有することが知られる。而も異物として臓器片を使用せる場合その何れを以てする

第14表 皮下に挿入せる木片、肝片、脾片並びに腎片の周圍に *Vibrion septique* 芽胞液 0.1cc を注射せる場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	3	1	0	1					$\frac{5}{5}$
	生	5	5	2	1	1	0					
肝片群	死	0	3	2								$\frac{5}{5}$
	生	5	2	0								
脾片群	死	0	1	4								$\frac{5}{5}$
	生	5	4	0								
腎片群	死	0	1	2	2							$\frac{5}{5}$
	生	5	4	2	0							

も芽胞液後注射を行うことによつて致命的感染発現迄の潜伏期を24時間乃至48時間短縮し得ることが判明した。

なお而して2%塩化カルシウム液による本菌

の1倍並びに10倍稀釈芽胞液夫々0.1ccを5頭宛2群の Maus 皮下に注射を試みたるに、第15表において示されたる如く、各群共注射後24時間前後動物の悉くが感染により斃れることを確

第15表 2% Ca Cl₂ 液にて種々に稀釈せる *Vibrion septique* 芽胞液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
1倍稀釈芽胞液注射群	死	5										$\frac{5}{5}$
	生	0										
10倍稀釈芽胞液注射群	死	5										$\frac{5}{5}$
	生	0										
対照群 (生理的食塩水による 1倍稀釈芽胞液注射)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{5}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

認し得た。

5. *Clostridium tetani* 感染試験

この場合も実験に比立つて予め調製せられた本菌芽胞液 0.1cc を夫々5頭の Maus 皮下に注射し、10日間に渉る観察を行つて、全頭悉く無症状にて生存することが確められた。

然る後異物として木片並びに臓器片を前記方法に従つて本菌の芽胞を附着せしめてこれを各群夫々5頭の Maus 皮下に接種せるに、その成績は第16表において示されたる如く、木片接種群においては、接種後第4日目に5頭中2頭が、第5日目に他は他の3頭が定型的破傷

風症状を発現して斃れた。肝片による接種群においては、接種後第4日目に他は他の3頭が、第5日目に他は他の2頭が症状を發して斃れた。脾片による接種群では、接種後第3日目に5頭中2頭が斃れ、第4日目に1頭が、更に第5日目に他は他の2頭が斃れた。腎片による接種群にありては、接種後第3日目に5頭中8頭が、第4日目に他は他の2頭が斃死した。

次いで2%塩化カルシウム液にて調製せられた1倍及び10倍稀釈の本菌芽胞を夫々5頭宛2群の Maus 皮下に0.1cc 宛注射を行えるに、第17表において示される如く、1倍稀釈芽胞液注

第16表 Cl. tetani 芽胞の附着せる木片、肝片、脾片並びに腎片を皮下に挿入せる場合の感染成績の比較

接種後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
木片群	死	0	0	0	2	3						$\frac{5}{5}$
	生	5	5	5	3	0						
肝片群	死	0	0	0	3	2						$\frac{5}{5}$
	生	5	5	5	2	0						
脾片群	死	0	0	2	1	2						$\frac{5}{5}$
	生	5	5	3	2	0						
腎片群	死	0	0	3	2							$\frac{5}{5}$
	生	5	5	2	0							

第17表 2% Ca IC₂ 液にて種々に稀釈せる Cl. tetani 芽胞液の注射を行つた場合の感染成績の比較

注射後の経過日数		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	感染率
1倍稀釈芽胞液注射群	死	0	0	5								$\frac{5}{5}$
	生	5	5	0								
10倍稀釈芽胞液注射群	死	0	0	4	1							$\frac{5}{5}$
	生	5	5	1	0							
対照群 (生理的食塩水による 1倍稀釈芽胞液)	死	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$\frac{0}{5}$
	生	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

射群では、注射後第3日目に5頭悉く破傷風症状を發して斃れ、10倍稀釈芽胞液注射群では注射後第3日目に5頭中4頭が、第4日目に残る1頭が罹患斃死した。

以上の成績を以て見るに、本菌における場合、感染の發現を促進する点で、異物としての木片と諸臓器片との間に著しい差異を認めず、

何れにあつても能く本菌芽胞による感染を促進する作用を有するが、唯木片に比し臓器片にあつては多少共感染發現の時期を早める傾向のあることが認められる。而うして従来試みられ來つた塩化カルシウム液による感染發現方法も亦本菌の芽胞感染には確實なる方法の一つであることが追認せられた。

総 括

以上5種類の嫌気性菌について行われた感染成績を綜合要約すれば、第18表に示される如く Clostridium welchii の感染に當つては、上記何れの方法を以てしても感染を發現せしめることが困難であつたが、一方爾他の諸菌に対して塩化カルシウム液注射が極めて確實に感染を

惹起せしは従来諸家のこれを示す如くであつた。而うして異物として木片を使用した場合、Clostridium tetani において最も容易に感染を發現せしめることが可能であり、Clostridium histolyticum 並びに Vibrio septique においても或る条件の下においては同様これにより感染

第18表 各種嫌気性菌芽胞による感染試験の綜合成績

		Cl. welchii	Cl. novyi	Cl. histolyticum	Vibron septique	Cl. tetani
葡 萄 糖 液		(-)	(±)			
ビ タ ミ ン C 液		(-)	(±)			
グ ル タ チ オ ン 液		(-)	(-)			
塩 化 カ ル シ ウ ム 液		(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
木 片	芽胞附着木片	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	芽胞液注射	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
肝 片	芽胞附着肝片	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	芽胞液注射	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
脾 片	芽胞附着脾片	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	芽胞液注射	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
腎 片	芽胞附着腎片	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	芽胞液注射	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

の発現に成功することが出来た。然るに *Clostridium novyi* では木片を以てして感染の発現が極めて困難であつたにも拘わらず、異物として諸臓器片、即ち肝片、脾片、腎片を用いたる場合能くこれに成功し、同様に *Clostridium welchii* を除く爾他の諸菌に対しても本法が容易且つ確実に感染を惹起せしめ得ることが知られた。而うして用いられたそれらの臓器間には何らの優劣を認めることが出来なかつた。

因みに同僚藤井は破傷風感染に際し、木片を接種せる場合と、本文献に従つて肝小片を同時接種せる場合と、抗菌性物質のこれに及ぼす影響の甚だ越きを異にすることを見出し、別にこれを報じた。即ち木片を接種せる場合には抗菌性物質、例えばオーレオマイシンの注入によつ

て動物をして感染死から免れしめるが、芽胞は比較的長く体内に残存すること、但し肝小片接種の場合には比較的速かに菌の消失を結果し得ると共に無論試獣をして完全に死から免れしめ得ることを知つた。同氏は肝片接種の場合芽胞より発育型が容易に形成せられ、斯くして発育型に対して薬剤が速かに影響を及ぼすものであるとこれを解した。然りとすれば感染の方法を異にするに従つて発病の状況も自ら相違するものがあり、即ち著者の見出した上述臓器小片同時接種方法の如き、目的によりこの外にも応用の機会を得しめることがあるとしたならば、その意義も決して少なくはないであろうと考えられる。

結 論

1. 諸種嫌気性菌の芽胞による実験的感染を試みるに当り、固形異物として木片を使用する場合、*Clostridium tetani* では極めて容易に成功するが、*Clostridium histolyticum* 並びに *Vibron septique* では特定の条件の下においてのみ感染に成功する。而して *Clostridium welchii* 並びに *Clostridium novyi* にあつては同法は困

難であつた。

2. 然るに木片に代うるに肝小片を以てすれば、*Clostridium novyi* を始め、*Clostridium histolyticum* 並びに *Vibron septique* においても容易に感染に成功するを得た。而うして同法は *Clostridium tetani* においても木片同様の効果を有した。なお肝小片に代うるに脾小片並び

に腎小片を以てするも同様の成績を収めることが出来た。

3. なお前記芽胞接種に際し併せてグルタチオン溶液, アスコルビン酸, 葡萄糖液を芽胞と共に注射せる試験が行われたが, 概ね感染を惹

起せしめ得ず, 唯アスコルビン酸乃至葡萄糖注入により時に *Clostridium novyi* の感染を招来し得たが, それも甚だ不確実であつた。

擧筆するに当り, 御懇篤なる御指導と御校閲とを賜わつた恩師日置教授に深謝する。

支

- 1) **W. Kolle, R. Kraus, P. Uhlenhuth** : Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Band IV, 2, 1026, 1099, 1112, 1118, 1128, 1928. 2) **Louis De Spain Smith** : Clostridia in gas gangrene, Bacteriological Reviews, 13, 233, 1949. 3) **Welton I.**

献

- Taylor, Milan v. Novak** : Prophylaxis of experimental gas gangrene in mice, Journal of Bacteriology, 61, 571, 1951. 4) **相沢憲** : 実験的感染に関する二,三の知見. 公衆衛生, 5, 3, 1952.