

Clostridium welchii (Hobbs' type) の抗原分析の研究

長崎大学風土病研究所病理部(主任：登倉登教授 指導：林薫講師)

三 舟 求 真 人
み ふね く ま と

Studies on the Antigenic Structure of *Clostridium welchii* (Hobbs' type). Kumato MIFUNE. Pathological Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University. (Director : Prof. Dr. N. TOKURA and Lec. Dr. K. HAYASHI)

本論文の要旨は、第35回日本細菌学会総会(昭和37年4月、名古屋)及び日本細菌学会第15回九州支部総会(昭和37年10月、熊本)に於いて口演発表した。

緒 言

ガス壊疽病原菌としての *Clostridium welchii* の産生する毒素や感染機序については比較的詳細に研究され、WILSDON, A. J. (1931) が毒素による分型を提唱して以来、OAKLEY, C. L. (1943), OAKLEY C. L. et al. (1953), BROOKS, M. E. et al. (1957), その他の多くの研究者によって毒素の純化とその分類が明らかにされ、現在まで6種の毒素型が知られているが、同型間の細分類にまでは及ばず、しかもこれを日常検査室に駆使出来るほど簡単ではないという欠点がある。

Cl. welchii と人の消化器疾患特に食中毒との関係は、ZEISSLER, J. et al. (1949) 及び HOBBS, B. C. et al. (1953) による報告以来、ようやく一般の注目を惹くに至ったが、感染菌の生物学的性状や毒素分型による伝播系路の推定、疫学的調査特にその分布域の調査は、分離菌の血清学的分類やフェージ型別によるそれに劣ることは否めない事実である。従って、本菌群の血清学的分類は、これらの面に於いて利するところが大きい。

Cl. welchii の血清学的分類の試みは古くからなされている。HOWARD, A. (1928) は type A 株について凝集反応で供試菌の殆んどすべてに交叉反応を認め、本菌群の血清学的型別の困難を強調したが、HENRIKSEN, S. D. (1937) は凝集反応及び補体結合反応を併用し、MEISEL, H. (1938) は抽出多糖体を抗原とした補体結合反応を用い、ORR, J. H. et al. (1940) は補体結合反応及び沈降反応を用い、ORLANDS, E. S. et al. (1958)

及び ELLNER, P. D. et al. (1962) は可溶性抗原による寒天ゲル拡散法、等を用いて、*Cl. welchii* type A の型別を試み、株特異性があるため分類の整理に困難はあるが、いずれもその可能性のあることを示唆した。既に FELIX, A. et al. (1928) 及び KREUZER, E. (1939) は *Cl. welchii* type A, B, C, D には型特異耐熱性抗原の存在を提唱したが、これは HENDERSON, D. W. (1940) によって更に詳細に検討が加えられ、上記の事実が追認されたほか、*Cl. welchii* type A の somatic antigen(O抗原) は多様性で分類に適しないが、type B 及び type C のO抗原は型特異的で、type D のそれは7型に区別されることを明らかにし、かつ、type B 及び type D には100°C/30分間の加熱で被凝集性を失う易熱性抗原(L抗原とした)が存在し、本抗原因子はε毒素産生と平行関係があることを強調し、また、このL抗原は type A 及び type C には存在しないと報告した。HOBBS, B. C. et al. (1953) は食中毒原因菌として多数の耐熱性 *Cl. welchii* type A を分離し、HENDERSON, D. W. (1940) の方法に準じ、その血清学的分類を試みて11型別するなど、ようやくこの方面の研究も進展をみた。われわれは、1960年7月、たまたま長崎市及びその近郊に309名の集団食中毒事例の発生に際会したが(林等, 1961)、引き続いて同市内の一家族4名の食中毒事例(林等, 1961)に遭遇し、残存食品及び患者の血便または下痢便から一定の嫌気性菌を分離し、その生物学的性状が *Cl. welchii* に一致したので、同年山口県衛生研究所から *Cl. welchii* Hobbs' type の分与を受け、比較検討の結果、血清学

的に *Cl. welchii* Hobbs' type 2 及び type 6 であることを確認した。この際、分離株に難凝集性を認め、それが継代培養によって失われることが初めて見られ、また、1960年来実施した Hobbs 型菌の分布調査（林等、1962）に際して、Hobbs 型菌と非耐熱性の type A 菌とに交叉凝集を示す多数の株が分離されるなど、広く *Cl. welchii* type A 全体の抗原分析的研究の必要が認められた。こゝにその基礎的研究として先ず *Cl. welchii* Hobbs' type 11株(型) 及び type A 24株について詳細な実験を行なうこととし、また、食品業者及び一般健康人糞便並びに土壌から分離した *Cl. welchii* Hobbs' type の血清学的性状に関する知見を補遺する。

実 験 材 料

供試菌：Central Public Health Laboratory (London) の Hobbs 女史から1958年山口県衛生研究所の山県宏博士に送付され、1960年当教室で分与を受け、1958年以来肝片加肝臓ブイヨン (pH7.8) (LB と略す) で累代培養を重ねて来た *Cl. welchii* Hobbs' type 1~11及び type A の12株と、1961年 Hobbs 女史から再分与を受け、cooked meat medium (CM と略す) で累代培養を続けて保存した同型の12株、合計24株であって、便宜上、前者を LB 株、後者をCM株とする。また食品業者及び一般健康人糞便及び食品加工場内及び同付近の土壌からの分離株をも併試した。

培地：液体培地は肝片加肝臓ブイヨン及び cooked meat medium を使用したが、固形培地は Zeissler 培地又は教室の考案で連鎖球菌用 Todd 培地の組成を次の通りに変法したものをも使用した。

Todd 変法培地の組成：	Beef extract	10.0 (g)
	Heart infusion (栄研)	7.5
	NaCl	2.0
	NaHCO ₃	2.0
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.8
	Polypepton	10.0
	Yeast extract	3.5
	Glucose	2.0
	Agar	20.0
	distilled water	1000ml

以上を15ポンド15分高圧滅菌した後平板培地とした。また別に実験の目的によっては Svec, H. M. and McCoy, E. 培地 (1944) 及び Todd 変法培地に獣炭末を 0.5%の割合に添加したものを使用した。

Svec, H. M. and McCoy, E. 培地の組成

Casein hydrolysate (acid)	35ml
Ovalbumin hydrolysate (acid)	15ml
20% yeast extract solution	100ml
Sodium lactate	5ml
K ₂ HPO ₄	5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
Sodium thioglycollate	1g
Tryptophane	10mg
Glucose	2.5g
Agar	20.0g
distilled water	1000ml

以上をpH7.4に修正した後15ポンド15分間高圧滅菌して平板培地とした。

実 験 方 法

培養法：液体培地による累代培養は流動パラフィン重層法に従ったが、固形培地による場合は、液体培地培養菌の1白金耳を平板培地に塗抹し、これを細谷式嫌気性瓶又はデシケーター内に収めドライアイス法によって嫌気培養した。

免疫血清の作成

1) ホルマリン死菌免疫血清：各 Hobbs 型菌及び A 型菌をTodd 変法培地に37°C/18時間嫌気培養し、S 型集落を釣菌して純培養とし、その菌苔をかきとって、0.5%ホルマリン加生理食塩水に浮游し、3500rpm/30分間5回遠心洗滌した後、同液に3乃至4mg/mlの濃度に再浮游したものを2昼夜氷室に放置して免疫原とした。免疫には体重2kg前後の家兎を用い、4日間隔で1mlから漸次増量して総量60mg~100mg菌量になる迄静注し、最終注射から7日目に試験的採血を行ない、凝集素価が400倍以上の場合に全採血を行なった。血清は56°C/30分間非働化した後1%マーゼニン液を1/100容加えて-20°Cに凍結保存した。なお免疫前に家兎の正常血清中には供試菌24株に対する正常抗体のないことを確認した。

2) 生菌免疫血清：免疫原には生理食塩水浮游菌液を使用してホルマリン死菌免疫血清の作成に準じて行なった。

3) 加熱菌体免疫血清：供試菌の18時間平板培地嫌気培養菌を生理食塩水に浮游し、3500rpm/30分間3回遠心洗滌し、30分毎に駒込ピペットで攪拌しながら100°C/1時間加熱した後、更に3500rpm/30分間3回遠心洗滌して滅菌生理食塩水に5mg/mlの濃度に再

浮游したものを免疫原とし、家兎の免疫方法はホルマリン死菌免疫血清の作成の場合に準じて行なった。

凝集反応用菌液：供試菌の18時間嫌気培養菌を生理食塩水で 3500rpm/30 分間 3 回遠心洗滌し、1 乃至 2 mg/ml の割合に生理食塩水又は 0.5 %ホルマリン加生理食塩水に再浮游し、これを生菌凝集原として用いた。また、加熱菌凝集原は、洗滌菌の生理食塩水又は 0.5 %ホルマリン加生理食塩水浮游菌液を 100°C/30 分間加熱し、それを 3500rpm/30 分間 3 回遠心洗滌した後、それぞれ当該液に前記の割合に浮游したものである。0.5 %ホルマリン加生理食塩水は 10 %アンモニア水で pH7.0 に修正して使用した。

凝集反応とその判定：定量凝集反応の場合は、免疫血清の倍数稀釈液 0.5 ml と前項の凝集反応用菌液 0.5 ml とを混和し、37°C/2 時間保った後室温に放置し、翌日判定した。凝集素価は肉眼で管底の凝集塊を認める血清の最低稀釈濃度とし、特に凝集鏡で凝集塊を認めた場合の血清の最低稀釈濃度には (±) の符号を附した。スライド凝集反応は供試血清の凝集素価の 1 : 100 稀釈液を用いて行なった。

吸収試験：吸収原には生菌及び 100°C/1 時間加熱菌をそれぞれ 3500rpm/30 分間遠心洗滌したものを使用した。5 倍稀釈血清 5 乃至 10 ml に吸収原をどろどろになる程度に加え、37°C/2 時間保ちこの間、時々駒込ピペットで吸出、吸入し、一夜氷室に保った後、その遠心上清を吸収血清とした。

健康人糞便及び土壌から Cl. welchii の分離及び同定：糞便及び土壌の約 1 g を 5 ml のブイオンに充分に混和した後、100°C/15 分間煮沸し、その 1 ml を肝片加肝臓ブイオンに接種して流動パラフィンを重ねし、37°C/1 乃至 7 日間培養した後、これを Zeissler 培地に移植し、ドライアイス法で 37°C/24 時間培養後 β 溶血を示した集落を純培養とし、これについて生物学的性状検査を行なうと共に、抗Hobbs 型菌血清及び抗A 型菌血清を用いてためし凝集反応を行なった。生物学的性状の検査は、糖分解 (乳糖、ブドウ糖、蔗糖)、卵黄反応、ゼラチン液化、硝酸塩還元、インドール産生、牛乳凝固及び消化、運動、芽胞の有無、並びに、α 毒素中和試験について行なった。

α 毒素中和試験：マウスによる毒素中和試験のほか、Nagler 培地による方法を用いた。300 単位/ml の α-抗毒素を含むように滅菌生理食塩水で無菌的に稀釈し、その 2 滴を Nagler 培地の半平面に拡げ、よく乾燥した後、分離菌の肝片加肝臓ブイオン嫌気培養の 1 白金耳を劃線塗抹し、37°C/24 時間嫌気培養し、この際、

分離菌のレシチナーゼ反応が抗 α 毒素血清で完全に抑制されたものを Cl. welchii type A と同定した。α 抗毒素血清は千葉県血清研究所の永井吉郎博士の好意によって分与を受けたものである。

実 験 成 績

Cl. welchii Hobbs 各型菌の被凝集性：肝片加肝臓ブイオン累代培養株 (LB 株) の各型ホルマリン死菌免疫血清と相応する各型の LB 株及び cooked meat medium 累代培養株 (CM 株) の定量凝集反応の成績は、第 1 表の通りであるが、本表から特に次の 4 項が指摘出来た。

(1) ホルマリン死菌及び同加熱菌の被凝集性に全く変動を認めないもの (抗 type 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 及び A 血清と相応する各型の LB 菌及び CM 菌, 抗 type 5 血清と type 5 LB 菌, 及び抗 type 7 血清と type 7 LB 菌), (2) ホルマリン死菌の凝集価に比して加熱菌のそれが異常に低下するもの (抗 type 7 血清と type 7 CM 菌及び抗 type 9 血清と type 9 LB 菌及び CM 菌), (3) 全く凝集を認めないもの (抗 type 5 血清と type 5 CM 菌), (4) 供試した各型 LB 株ホルマリン死菌免疫血清は、type 4 を除き、相応する同型の LB 菌に対して同型の CM 菌より高い凝集素価を有することである。供試菌のうち、type 1 及び type 3 の LB 菌及び CM 菌、並びに type 5 の LB 菌は Zeissler 及び Todd 変法平板培地上で粘液形成が強く、これらは洗滌によって除去されたが、type 5 の CM 菌は平板培地培養菌苔をかき採るのにも困難を感じ、かつ、洗滌によっても、100°C/30 分間加熱によっても、その粘液物質は完全に除去されず、定量凝集反応の成績を妨げた。

第 1 表に見るような 100 乃至 400 倍の低い凝集素価を示す抗血清の再調製と、上述した 4 項の特異な現象の再現性或いはその変動を知るために、特に各型の CM 株を使用し、LB 株の場合と同様な方法で免疫血清を作成した。この際、type 5 CM 菌は、Zeissler 及び Todd 変法培地上の集落について、smooth かつ粘液の少ないものを釣菌しつゝ累代して純培養したものである。得られた抗血清について前回と同様各型の LB 菌及び CM 菌を凝集原として行なった定量凝集反応の成績は第 2 表に示される。本表に見られるように (1) 各型の CM 株で作成した抗血清は一般に高い凝集素価を含む血清が得られ、かつ、相応する同型の CM 菌及び LB 菌は同程度の凝集価を示した。(2) 抗 type 1 血清は免疫原とした CM

Table 1. Agglutination test with antisera against subcultured strains of *Cl. welchii* Hobbs' type in liver-liver broth medium and its homologous antigens

antisera against each strain of <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type subcultured in LB medium																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	A									
antigen prepared from each strain of <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type subcultured in LB or CM medium																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	A									
*	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM
*	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM
1600 (800)	400 (1600)	400 (400)	400 (100)	100 (100)	800 (400)	1600 (1600)	800 (400)	0 (0)	800 (400)	100 (100)	6400 (3200)	1600 (1600)	400 (100)	12800 (6400)	1600 (0)	1600 (0)	400 (200)	400 (400)	12800 (51200)	12800 (6400)

Remarks : The signs LB and CM mean the liver-liver broth medium and cooked meat medium respectively and the sign * or * * means a test strain which produced a mass of mucous substance on the subcultured medium. The signs l and s mean a large and small colony on the plate medium respectively. Brackets in the line of agglutination titers mean the titer against the antigen suspended in the 0.5% formalin saline solution and heated at 100°C for 30 minutes. Each antiserum of *Cl. welchii* Hobbs' type was obtained from rabbits immunized against the vaccine suspended in the 0.5% formalin saline solution.

Table 2. Agglutination test with antisera against subcultured strains of *Cl. welchii* Hobbs' type in cooked meat medium and its homologous antigens

antisera against each strain of <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type subcultured in cooked meat medium																									
1▲	2	3	4	5▲	6	7▲	8	9	10	11	A														
antigen prepared from each strain of <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type subcultured in LB or CM medium																									
1△	2	3	4	5○	6	7△	8	9△	10	11	A														
*	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM	LB	CM									
																	LB		CM						
			*			*	*	*																	
800	25600	1600	1600	200	400	1600	1600	1600	800	400	400	800	3200	1600	12800	6400	1600	1600	400	400	12800	12800	400	400	
(800)	(1600)	(1600)	(1600)	(200)	(400)	(1600)	(1600)	(1600)	(400)	(1600)	(200)	(400)	(100)	(200)	(6400)	(6400)	(100)	(100)	(400)	(400)	(400)	(6400)	(6400)	(400)	(400)

Remarks : See table 1. The sign ▲ in the line of antisera means that the agglutinin titer of antisera in this table were markedly different from one in the table 1. The sign △ in the line of antigen means that the boiled antigen reduced its agglutinable activity exceedingly, and the sign ○ means that the agglutinin titer raised against the antigen heated for 30 minutes at 100°C.

株ホルマリン死菌に25600倍の高い凝集素価であったが、加熱菌の凝集価は異常に低下し、100倍を示したに過ぎず、同型のLB菌はホルマリン死菌及び加熱菌とも800倍であった。(3) type 5 抗血清に対するCM株ホルマリン死菌の凝集価は、加熱によって400倍から1600倍と上昇したが、LB株のそれは800倍から400倍と逆に低下の傾向を示した。(4) type 7 及び type 9 抗血清は相応する同型のLB菌及びCM菌のホルマリン死菌に対しては、12800倍乃至1600倍の高い凝集素価を有しているが、その加熱菌に対するそれは著明に低下することが判かった。

各型のCM株を用いて作成した抗血清と各型LB菌及びCM菌との交叉凝集反応は、第3表に示されるように、抗 type 3 血清に対して type 4 菌、抗 type 7 及び type 9 血清に対して type 9 及び type 7 菌の間にそれぞれ交叉凝集が認められ、前者はホルマリン死菌及び同加熱菌との間にその凝集価に変動を認めなかったが、後者はそれぞれその共有する被凝集性はホルマリン加熱死菌で全く失われることを示した。

Table 3. Cross agglutination reactions of *Cl. welchii* Hobbs' type and type A tested.

antiserum					
3		7		9	
antigen					
3	4	7	9	9	7
400	100	12800	400	1600	200
(400)	(100)	(100)	(0)	(0)	(0)

Remarks : The cross agglutination reaction was demonstrated between type 3 and 4 or type 7 and 9.

Brackets : See the table I.

Type 7 のLB株は、Todd 変法平板培地上にやや不正形で不透明な大集落と、正円形で透明な小集落とを生じ、同型のCM株は大集落のみを認めたので、集落別にその被凝集性を検討した。その成績をまとめたものは第4表に示される。LB株に生ずる大小の各集落は、ホルマリン死菌及同加熱菌とも同型の抗LB菌免疫血清に6400倍乃至1600倍を示し、かつ、加熱によって大集落の被凝集性が僅かに低下したのみで、殆んどその凝集価に変動を認めなかったが、抗CM菌免疫血清に

対する凝集価は、両集落ともホルマリン死菌では3200倍乃至1600倍を示したにもかかわらず、加熱菌の場合100倍乃至200倍の低い値を示した。また、CM株の大集落は抗LB菌免疫血清にホルマリン死菌400倍、加熱菌100倍を示し、同型の抗CM菌免疫血清に前者12800倍、後者100倍といずれも加熱による著明な被凝集性の低下が認められた。

Table 4. Issue of the agglutination reaction with the homologous antiserum against *Cl. welchii* Hobbs' type 7.

		antiserum	type 7 of LB	type 7 of CM
type 7	l	non-heated	6400	3200
		heated	3200	100
of LB	s	non-heated	1600	1600
		heated	1600	200
type 7 of CM	l	non-heated	400	12800
		heated	100	100

Remarks : See the table 1. and 2.

第1, 第2, 第3及び第4表の成績を一括すれば次のようになる。(1) 供試したHobbs型各菌のLB株及びCM株の中、ホルマリン死菌及び同加熱菌ともその被凝集性に殆んど変動を認めず、所謂耐熱性抗原因子のみを有するか、或いは易熱性抗原因子を有しても著しく少量であるもの(type 1 LB株, type 2, 3, 4, 8, 10, 11及びAの各型LB株及びCM株, type 5 LB株), (2) 加熱によって著明な被凝集性の低下を認め、大量の易熱性抗原因子を有し、耐熱性のそれは著明に減少しているもの(type 1 CM株, type 7 CM株, type 9 のLB株及びCM株), (3) 加熱によって被凝集性が上昇し、加熱によって失われる難凝集性因子を有すると解釈されるもの(type 5 CM株)の3群に区別され、また、作成された免疫血清の側から見れば、(1) 抗 type 1 及び type 7 CM 菌免疫血清並びに抗 type 9 LB 菌及びCM菌を除いて、供試抗各型LB菌及びCM菌免疫血清はホルマリン死菌及び同加熱菌に対する同程度の凝集素価を有するが、(2) 上記の抗 type 1 及び type 7 CM菌免疫血清並びに抗 type 9 LB 菌及びCM菌免疫血清はホルマリン生理食塩水浮游菌を100°C/30分加熱することによって失われる所謂易熱性因子に対する

凝集素を多量に含んでいることが予想されたので、以下本易熱性因子の性状を詳細に検討すべく企図して実験を行なった。

易熱性抗原因子の変動を観察した実験：第1, 第2及び第4表の成績から type 7 LB菌及びCM菌と相応する抗血清並びにその交叉凝集反応はホルマリン死菌とその加熱菌との被凝集性の間に特に著明な変動が認められたので、先ず培地組成の差がその要因ではないかと考えて、LB菌をCM培地に、CM菌をLB培地にそれぞれ移植し、10乃至20代の累代培養を重ねた後、常法に従って、そのホルマリン死菌免疫血清を作成し、相応する抗原及び抗血清との凝集反応並びに交叉凝集反応を試みたが、第4表に示された成績と同様であって、10乃至20代の累代培養では培地組成による易熱性抗原因子の変動をみることは出来なかった。

易熱性抗原因子を証明せんとする試み：

(1) **ホルマリン死菌免疫血清を用いた実験：**Type 7 LB菌と CM 菌のホルマリン死菌免疫血清をそれぞれのホルマリン死菌及びその加熱菌で吸収した吸収血清に対する耐熱性並びに易熱性抗原の被凝集性から両者の関係を明らかにすべく次の実験を行なった。第5表にその成績が示される通り、type 7 LB菌のホルマリン死菌免疫血清は自原及び同型のCM菌にそれぞれ6400倍及び400倍の凝集素価を有していたが、同抗血清を type 7 LB菌及びCM菌のホルマリン加熱死菌でそれぞれ各別に又は同時に吸収すると、その吸収血清中にはいずれも LB菌ホルマリン死菌に対して400倍、CM菌ホルマリン死菌に対して同時吸収の場合を除いて50乃至100倍の凝集素価が残存し、同血清を LB菌ホルマリン死菌で吸収した吸収血清は自原は勿論 CM菌に対しても凝集反応を全く認めなかった。

また、type 7 CM 菌のホルマリン死菌免疫血清を前記同様LB菌及び CM 菌のホルマリン加熱死菌で各別又は同時に吸収した場合、その吸収血清は LB菌ホルマリン死菌に200乃至400倍、CM菌ホルマリン死菌には1600倍乃至6400倍の高い凝集素価が残存し、同血清のCM菌ホルマリン死菌による吸収血清は自原及びLB菌に対する凝集素は全く吸収され尽すことを示した。以上の成績から type 7 LB菌及び CM 菌のホルマリン死菌はいずれも耐熱性抗原を有し、それが前者に於いては大量であって、後者に於いては少量であることが知られる。かつ相応する抗血清中にもそれと平行して耐熱性抗原に対する凝集素が含まれ、またLB菌及びCM菌の易熱性抗原、並びにその相応する抗血清については全く逆の関係が示され、更に本易熱性抗原因子は

Table 5. Agglutinin absorption test illustrating the presence of thermolabile components of *Cl. welchii* Hobbs' type 7.

absorbed with	antigen		antiserum against	
			type 7 of LB	type 7 of CM
type 7	type 7 of LB	non-heated	400	400
		heated	0	0
	type 7 of CM	non-heated	100	3200
		heated	0	0
type 7 heated of CM	type 7 of LB	non-heated	400	400
		heated	0	0
	type 7 of CM	non-heated	50(±)	6400
		heated	0	0
type 7 heated of LB and CM	type 7 of LB	non-heated	400	200
		heated	0	0
	type 7 of CM	non-heated	0	1600
		heated	0	0
type 7 not heated of LB	type 7 of LB	non-heated		0
	type 7 of CM	non-heated		50(±)
type 7 not heated of CM	type 7 of LB	non-heated	0	
	type 7 of CM	non-heated	0	

Remarks : The signs LB and CM in the type 7 mean the strains of *Cl. welchii* Hobbs' type 7 subcultured in liver-liver broth medium or cooked meat medium. In the line of antigen, "heated" means that the antigen suspended in the 0.5% formalin saline solution was boiled at 100°C for 30 minutes. The sign (±) means the agglutinin titer of antiserum observed by agglutinoscope. Antiserum was prepared from immune serum against washed cells of type 7 suspended in the 0.5% formalin saline solution.

100°C/30 分間の加熱によって反応性と共に吸収原性をも消失することがうかがわれた。しかしながら、これまでの実験に使用した免疫原及び凝集原、就中その加熱菌によるそれらの作成にはすべて 0.5%ホルマリン加生理食塩水を使用したことは特に留意の要があると考えられ、従って本実験で予想される易熱性因子の性

Table 6. Agglutination test for the heat lability of the antigen of *Cl. welchii* Hobbs' type 1, 7 and 9.

serum antigen heated at	antiserum against <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type					
	1		7		9	
	antigen of <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type					
	1		7		9	
	antigen suspended in					
	saline	0.5% formalin	saline	0.5% foamalin	saline	0.5% formalin
non-heated	25600	25600	12800	12800	1600	1600
40°C 30min.	800	800	6400	6400	1600	1600
50°C 30min.	200	200	6400	6400	1600	1600
60°C 30min.	200	200	6400	6400	800	800
70°C 30min.	200	200	3200	3200	800	800
80°C 30min.	200	200	1600	1600	800	800
90°C 30min.	200	200	800	400	400	400
100°C 30min.	200	200	400	100	200	200
120°C 30min.	200	200	400	100	200	200
120°C 90min.	200	200	400	100	200	200

Remarks : In the line of antigen, the sign saline or 0.5% formalin means the physiological saline solution and 0.5% formalin saline solution respectively. Each antiserum of *Cl. welchii* Hobbs' type 1, 7 and 9 was obtained from rabbits immunized against live bacterial vaccine respectively.

状は抗原作成上ホルマリン加という条件が加味されねばならない。

(2) 生菌免疫血清を用いた実験：前項の各実験から免疫原及び凝集原の作成に際してホルマリンの影響を除外する必要があったので、以下の実験はすべて生菌による家兔免疫血清を使用し、特に指定しない限り、凝集原には生理食塩水浮游菌液を用い、また第2表に示されたように type 7 CM菌と同様の現象を認めた type 1 CM菌及び type 9 CM菌をも併試することとした。

先ず供試3株の予想される易熱性抗原因子の熱抵抗性試験を生理食塩水浮游菌液及び0.5%ホルマリン生理食塩水浮游菌液について各温度30分間加熱する方法で実施した。成績は第6表に示されるように、type 1 CM菌は40°C/30分間の加熱で急激に、type 7及びtype 9は徐々に90°C乃至100°C/30分間の加熱でその

被凝集性に著明な低下を認め、かつ低下した凝集価は120°C/90分間の加熱によっても変動を認めなかったが、type 7 CM菌の90°C乃至100°C/30分間加熱の場合のみ浮游菌液の両者の間にかなりの差異が認められたことが特に注目された。この事実は type 7 CM菌は所謂易熱性抗原 thermolabile antigen のほかホルマリン存在下の加熱によって凝集原性を失うホルマリン易熱性抗原 formolin-thermolabile component とも称すべき抗原部分を保有していることを示すものといえる。

易熱性抗原の存在は生菌免疫血清を当該加熱菌で吸収して残存する凝集素によって一層確認されるので、供試 type 1, 7及び9 CM菌の100°C/30分間加熱菌による相応する当該抗血清の吸収試験を行なった。成績は第7表に示されるように、各吸収血清の生菌抗原に対する凝集素価は、type 1及びtype 7ではそれぞれ6400倍、type 9では800倍の価を示し、供試3菌の易

Table 7. Absorption test illustrating the presence of heat labile antigen of *Cl. welchii* Hobbs' type 1, 7 and 9.

antiserum and absorption antigen		antiserum against <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type					
		1		7		9	
		untreated	absorbed with heated bact. of type 1	untreated	absorbed with heated bact. of type 7	untreated	absorbed with heated bact. of type 9
type 1	live	25600	6400	0	0	0	0
	heated	100	0	0	0	0	0
type 7	live	0	0	12800	6400	200	200
	heated	0	0	400	0	0	0
type 9	live	0	0	400	400	1600	800
	heated	0	0	0	0	200	0

Remarks : In the line of antigen, the sign live or heated means the antigen of living bacteria or that boiled for 30 minutes at 100°C.

熱性抗原が100°C/30分間加熱によって凝集素吸収能を消失すると共に当該吸収血清中には易熱性抗原に対する多量の凝集素が残存することを知った。また、同表に示されるように、type 7 及び type 9 間には 400 倍乃至 200 倍の交叉反応がみられたので、本項実験におけるように、自原の加熱菌で吸収して得た type 7 及び type 9 の吸収血清について易熱性凝集素を交叉的に (heterogenously に) それぞれの生菌で吸収試験を試みた。

第 8 表は type 7 及び type 9 の交叉的再吸収血清について行なった凝集反応の成績であるが、type 7 の再

吸収血清中には type 9 生菌で吸収してもなお自原の生菌に 1600 倍という高い凝集素が残存しているが、type 9 の再吸収血清中には type 7 生菌でその凝集素は吸収し尽されても早や自原に対する凝集素は残存しなかった。換言すれば type 7 CM 菌は type 9 CM 菌との共通な易熱性抗原部分のほか個々の易熱性抗原をも保有していることを示すものといえる。

耐熱性抗原の性状：type 1, 7 及び 9 CM 菌の生理食塩水浮游菌液を 100°C/60 分間加熱して洗滌した後、同液に再浮游したものを免疫原として作成した抗血清は、第 9 表に示されたように、各型とも相応する生菌

Table 8. Cross absorption test with the factor antiserum against heat-labile antigen of *Cl. welchii* Hobbs' type 7 and 9.

antiserum and absorption antigen		antiserum against heat labile antigen of			
		type 7		type 9	
		untreated	absorbed with living culture of type 9	untreated	absorbed with living culture of type 7
type 7	live	6400	1600	200	0
	heated	0	0	0	0
type 9	live	400	0	800	0
	heated	0	0	0	0

Remarks : Factor antiserum against heat-labile antigen was prepared by the method of absorption with homologous heated bacteria from immune rabbit serum against living bacterial vaccine.

及び加熱菌に対する凝集素価は変わらず、かつ、交叉反応も認めなかった。従って供試血清中には耐熱性抗原に対する供試3菌の個々の凝集素のみを含んでいるものと考えてよい。Type 9を除き、type 1 及び type 7 のホルマリン生理食塩水浮游菌は、その加熱によって著明に被凝集素価が低下し、易熱性抗原の場合と同様の現象が認められた。

生菌及び加熱菌の電顕的観察：各型菌の生理食塩水及び磷酸緩衝液浮游菌液 (pH7.2) 及びその100°C/30分加熱菌をコロイド膜面上に固定した生の試料並びにこれにクローム shadowing を施した試料について、それぞれ電子顕微鏡下に電子線透過度の過多や減少及びその形態変化等を観察したが、生菌及び加熱菌の間には全く差違を認めなかった。

累代培養による難凝集性の獲得の試み：第2表に示されたように、type 5 CM菌は100°C/30分間加熱によって400倍から1600倍と凝集価の著しい上昇が認められ、非加熱菌の難凝集性が予想されたので、type 4, 8, 9 及び11CM菌を使用し、Zeissler 培地、5%炭末加 Zeissler 又は Todd 変法培地、10%牛血清加 Todd 変法培地、Svec, H.M. and McCoy, E. 培地 (莢膜形成培地) に約10代累代培養し、スライド及び定量凝集反応で各代毎にその被凝集性を検査したが、いずれも変化を認めなかった。

健康人糞便及び土壌から *Cl. welchii* (Hobbs' type) の分離：長崎県下各地の食品業者及び一般健康人495名、食品原料貯蔵所並びに同加工場内及び附近の土壌128件について材料のブイヨン溶解液を100°C/15分間

Table 9 Agglutination reactions for somatic thermostable antigen of *Cl. welchii* Hobbs' type 1, 7 and 9

antiserum and absorption antigen			antiserum against heated antigen of					
			type 1		type 7		type 9	
			untreated	absorbed with heated bact. of type 1	untreated	absorbed with heated bact. of type 7	untreated	absorbed with heated bact. of type 9
type 1	saline	non-heated	1600	0	0		0	
		heated	1600	0	0		0	
	0.5% formalin	non-heated	1600	0	0		0	
		heated	800	0	0		0	
type 7	saline	non-heated	0		800	0	0	
		heated	0		800	0	0	
	0.5% formalin	non-heated	0		800	0	0	
		heated	0		100	0	0	
type 9	saline	non-heated	0		0		800	0
		heated	0		0		800	0
	0.5% formalin	non-heated	0		0		800	0
		heated	0		0		800	0

Remarks : Antiserum was prepared by immunizing rabbits against the antigen of *Cl. welchii* Hobbs' type 1, 7 and 9 boiled for 60 minutes at 100°C. In the line of antigen, the sign saline or 0.5% formalin means the suspended bacteria in the physiological saline solution and 0.5% formalin saline solution.

加熱する方法で一定の嫌気性菌を分離し、生物学的性状及び Nagler 培地上における α 毒素中和試験及びマウスを使用する毒素中和試験で *Cl. welchii* と同定出来たものは、糞便387株(78.1%)、土壌84株 (65.1%)、合計 471株 (75.6%) であった。これらの分離株につ

Table 10 Isolation of *Cl. welchii* from feces of healthy persons and soils

Samples	feces	soils	total
strains			
<i>Cl. welchii</i> isolated	387/495 (78.1%)	84/128 (65.1%)	471/623 (75.6%)
identified strains as <i>Cl. welchii</i> Hobbs' type			
type 1	12	1	13/471 (2.7%)
type 2	1	0	1/471 (0.2%)
type 3	10	2	12/471 (2.5%)
type 6	5	2	7/471 (1.4%)
type 9	1	1	2/471 (0.4%)
type 10	5	1	6/471 (1.2%)
total	34/387 (8.8%)	7/84 (8.3%)	41/471 (8.7%)
unidentified	6	1	7/471 (1.4%)

Remarks : In the line of isolated strains, the numerator means the number of isolated strains and the denominator means the number of samples, and in the line of typing, the numerator means the number of *Cl. welchii* Hobbs' type and unidentified strains, and the denominator means the number of isolated strains, respectively. 471 strains of *Cl. welchii* were isolated from samples which were steamed for 15 minutes at 100°C, 41 strains of them were identified as *Cl. welchii* Hobbs' type, and 2 of 7 unidentified strains have cross reactions with antisera of type 1, 9 and 10, one of them with type 6 and 9, one of them with type 4 and 9, one of them with type 4, 9 and A, one of them with type 9 and A, and one of them with type 7 and A.

いて、抗 Hobbs 各型免疫血清を用い、先ず生菌によるためし凝集反応を行ない、陽性の場合には定量凝集反応を実施した結果 (第10表)、Hobbs' type 1, 2, 3, 6, 9 及び10の各型41株 (8.7%) が検出され、特に type 1, 及び type 3 の検出は高率であった。特に注目すべきは食品業者糞便とその加工場内の土壌中に type 9 及び type 10 の各同型菌がそれぞれ検出されたことであった。

分離株の交叉凝集反応：前項の分離41株は、それぞれ当該血清の終末価まで凝集し、かつ類属反応を全く認めなかったが、第10表下段に示されるように、糞便分離の6株、土壌のそれ1株合計7株 (1.4%) は、type 1, 9 及び10抗血清に殆んど同程度に凝集するが、分離株は個有の共通抗原を有するもの2株、type 6 及び9, type 4 及び9, type 4, 9 及び type A, type 7 及び type A, また type 9 及び type A の各抗血清間にそれぞれ交叉凝集反応を呈したものの各1株であった。このうち、type 9 及び type A に交叉反応を示す Na20株は、type 9 抗血清に生菌で3200倍、加熱菌で100倍、type A 抗血清には生菌及び加熱菌ともに200倍の凝集価を示し、type 9 菌に共通な易熱性抗原部分を有し、かつその耐熱性抗原は type 9 菌以外に type A 菌とも共通部分を保有していることが推察された。

考 察

嫌気性菌の培養法は、菌種及び目的によって異なる一方、手技そのものに多少の難易があるが、従来使用されている Zeissler 培地その他の平板培地によるそれは、集落の観察、培養菌の生存期間、培養法の簡易性については再検討すべき点がないではない。この点に関して1960年来行われてきた当教室における予備実験について先ず紹介の要がある。常用のブドウ糖寒天培地、Zeissler 培地、VF 寒天培地に代用され、培地組成の栄養素や添加物の入手の容易な点を考慮して連鎖球菌用の Todd-Hewitt 培地を改変し、牛心又は馬肉浸出液を市販のハートインフュージョン培地、粉末酵母エキス及び少量の肉エキスの混合で代用し、2%の割合に寒天を加え平板培地とした。Rosenthal 法またはガス置換法で *Cl. tetani* 及び *Cl. welchii* を含む11株を供試して検査したが、供試菌は本培地によく増殖し、その集落の観察も容易であって、かつ Zeissler 培地上の集落を室温放置2日後肝片加肝臓ブイヨン又は cooked meat medium に移植した場合、増殖を認め

なかったのに比して、本培地上の集落はよく発育した。また、Rosenthal 法及び Schoetensack 法等のように還元剤を用いる方法は、大量の平板培地の使用や試薬品による培地汚染等の難点がみられ、ガス置換法ではデンケーター又は嫌気性瓶内の空気を吸引する際シャーレから培地が脱落することがあって培養操作の不便があったので、ドライアイス法を用いた。予めドライアイス片を既製の嫌気性瓶またはデンケーターの底に入れシャーレが直接ドライアイスに接しないように孔のある隔壁板を置く。シャーレの上蓋を下に Todd 変法培地に塗抹した平板培地との間に滅菌小木片を挟んでシャーレを僅かに開けたまま重ねて収め、培養瓶の上蓋を閉める。培養瓶の上蓋は止め金で固定する必要もなく、またシャーレの上蓋に陶焼のものを使用すれば木片を挟む必要はない。培養瓶の上蓋の活栓を開いたままこれにゴム管を連結し、その先端を消毒水を入れた試験管の管底までさし込んで37°Cに培養する。この際、ドライアイスから気化するCO₂ガスが空気と置換され、活栓に導かれたゴム管を通して気泡となって圧出されるが、ドライアイスが気化し終わっても水面を介して空気が逆流することはない。本法では厳密な嫌気性を要求する *Cl. tetani* の発育を認めないこともあったが、*Cl. welchii* のほか供試菌のすべては良好な発育を認めた。本法によって糞便及び土壌からの *Cl. welchii* の分離を試みた結果、良好な成績が得られ、林等 (1961, 1962) の既報の成績はすべて本法によって実験したものである。

Cl. welchii は、ガス壊疽病原菌としてのみならず、ZEISSLER et al. (1949) 及び HOBBS et al. (1953) によって指摘されたように、人の消化器疾患特に食中毒原因菌としての意義を加えたが、本菌分離の際、西田等 (1961) は材料の加熱を増すに従って toxinogenic strain は分離し難くなると述べ、HOBBS et al. (1953) の食中毒原因菌としての熱抵抗性変異菌と全く対蹠的であるが、一方、長崎地方に集団発生した食中毒事例 (1961) の際の患者の中毒症状は激しく欧米のそれと著しい差を示し、食品原料の種類やその加工並びに調理の方法の欧米との差異等が考えられ、本菌群による食中毒発現の機序と共に、*Cl. welchii* type A 全体としての意義も検討されねばならない。この際、感染菌の伝播系路や疫学的調査については、分離菌の生物学的性状並びに毒素分型が血清学的性状やファージ分型に劣ることは否めない。著者は、このような意図の下に、その基礎的研究として、*Cl. welchii* Hobbs' type

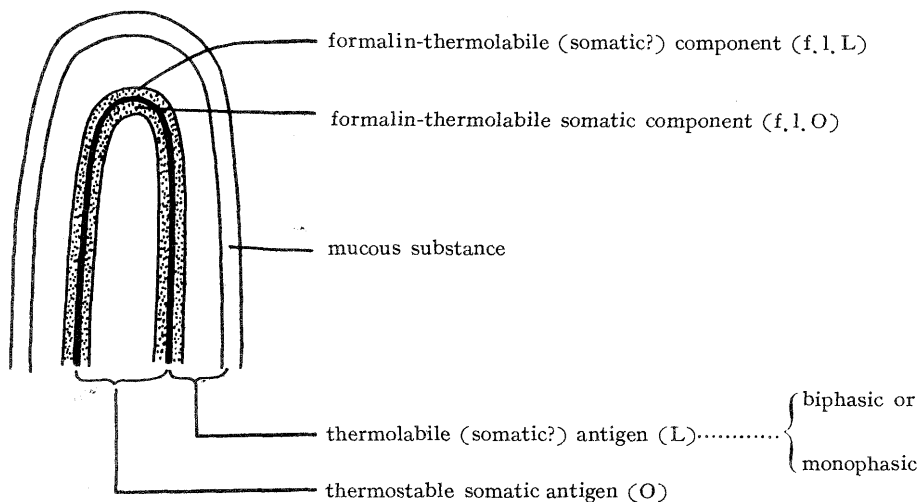
及び type A の24株並びに食品業者及び一般健康人の糞便、土壌から分離した48株を供試して抗原分析の研究に着手した。

実験は2段階に区別され、前半の実験 (第1, 第2, 第3, 第4及び第5表) で供試菌には易熱性抗原が存在し、菌株によって本因子の量的な差があることが予想されたが、抗原作成時に加熱抗原は0.5%ホルマリン加生理食塩水菌液を100°C/30分間加熱する方法がとられたので易熱性抗原の性状にはホルマリン加の影響という条件が加味されねばならなかった。従って実験の後半はホルマリンを除いてすべて生理食塩水浮游菌液 (生菌) を使用し、前半と同様の実験を type 1, 7 及び 9 菌について行ない、易熱性抗原の存在を確認し (第7及び第8表)、同時に本抗原の熱抵抗性試験に前半の実験で使用したホルマリン生理食塩水浮游菌液を一部供試したところ、各型にホルマリン易熱部分の存在が明らかにされた (第6表)。HENDERSON, D.W. (1940) は *Cl. welchii* type B 及び D に100°C/30分間加熱で被凝集性を失う易熱性抗原 (L抗原) を証明し、本抗原は somatic antigen の一部であろうとし、かつ type A 及び type C 菌にはこの種のL抗原は存在しないと述べたが、著者の実験で確認した易熱性抗原は明らかに HENDERSON, D.W. のL抗原と類似のものであって、第3及び第7表に示されるように、type 3 及び 4, type 7 及び 9 菌はそれぞれ易熱性抗原を共有し、かつ type 7 は共通な易熱性抗原の他に個有のそれを保有することも判かり、同時に本易熱性抗原は加熱によって吸収原性を失うことも確認された (第8表)。また、type 1, 5 (LB菌), 6, 7, 9, 10 (LB菌), 11菌 (第1及び第2表) 及び糞便から分離したNa20菌は、程度の差はあれ、加熱菌の被凝集性が低下することからこの種の易熱性抗原はかなり広く分布することが示唆される。SVEC, M.H. et al. (1944) は capsular polysaccharide が凝集反応及び沈降反応で各型菌 (type A, B, C, D) 間に交叉反応を示し、その分布の広いことを述べたが、著者の易熱性抗原を capsular antigen と考えてよいか否かは明らかでなく、染色所見及び電子顕微鏡的観察から特に "capsular," と称すべき所見も見出せなかった。

一方、100°C/1時間加熱菌免疫血清に対する耐熱性抗原は type 1 特に type 7 菌でホルマリン加生理食塩水浮游菌液の加熱で凝集価の著しい低下を認め、耐熱性抗原にも所謂ホルマリン易熱性抗原の存在を確認すると同時に易熱性抗原は加熱によって免疫原性を失うことも明らかであった。

Type 5 菌は難凝集性を示し、加熱によって凝集価の上昇を認めたが、本菌の集落は多量の粘液を形成し、洗滌及び加熱によっても、これを完全に除去出来なかったが、本菌以外の供試菌のすべては電子顕微鏡的観察でいずれも菌体周囲に——量的な差はあっても——粘液様物質を認めたことから本物質が難凝集性に密接な関連があるとも考えられなかった。

以上の実験成績を総括すれば、① *Cl. welchii* Hobbs' type には耐熱性抗原 (thermostable antigen) のみを有するか易熱性抗原 (thermolabile (somatic?) antigen) を有しても著しく少量のもの、②大量の易熱性抗原を有し耐熱性のそれは著しく減少しているもの、③難凝集性を有するものの3群に大別され、易熱性及び耐熱性抗原は更にホルマリン存在下で加熱によって消失する抗原部分 formalin-thermolabile component とも称すべきものを有し、かつ、④生菌及びホルマリン死菌免疫血清中にはそれぞれに相応する凝集素を含むことが証明され、本菌群の抗原構造を要約し、Schema とすれば次のようである。



HOWARD, A.(1928)及び HENDERSON, D.W.(1940) は *Cl. welchii* type A の血清学的分類の困難を述べているが、これに反し、HENRIKSON, S.D. et al. (1937), MEISEL, H, (1939), ORR, J.H. et al. (1940), ORLANS, E.S. et al. (1958), ELLNER, P.D. et al. (1962)等はその可能性を提唱するなど、*Cl. welchii* type A の血清学的分類に関する諸家の意見は一致していない。これは抗原組成に関する詳細な検討を欠くことにその原因を求むべきであって、著者の実験で明らかなように本

菌の菌体抗原の組成の解明は免疫血清作成や菌型の診断、更に近時整然と血清学的に整理された大腸菌群における如く、広く *Cl. welchii* type A 全体の血清学的分類への重要な資料を提示したものと思う。

要 約

(1) *Cl. welchii* の分離培養に際し、Todd 変法培地は Zeissler 培地、ブドウ糖寒天培地、VF寒天培地に代用され、本培地とドライアイス法の併用は他の嫌気培養法に比して簡便であると共に良好な成績が得られ、また本培地は発育集落の観察が容易であり、かつその生存期間は他の培地に比して長い利点をもつ。

(2) *Cl. welchii* Hobbs' type 22株、*Cl. welchii* type A 2株及び一部糞便及び土壌から分離した48株について抗原分析的研究を行なった。

(3) 供試菌は thermostable antigen, thermolabile (somatic (?)) antigen を保有し、かつ両抗原には所謂 formalin-thermolabile antigen が存在し、かつ

thermolabile antigen には二相性 (biphasic) のものも確認された。

(4) Thermolabile antigen は熱抵抗性に著しい差があるが、加熱によって反応原性、免疫原性及び吸収原性を失う。

(5) 生菌及びホルマリン死菌家兎免疫血清中にはこれらの各種抗原に相応する凝集素を含む。

(6) 以上の成績を要約して *Cl. welchii* Hobbs' type の抗原組成の Schema を提示した。

擱筆に当たり、恩師登倉教授並びに林講師の御懇篤な御指導と御校閲を感謝し、種々御教示を賜った高

橋助教に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) BROOKS, M.E., STERNE, M. and WARRACK, G.H. : A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. J. Pathol. Bacteriol., **74** : 185~195, 1957.
- 2) ELLNER, P.D. and BOHAN, C. D. : Serology of the soluble antigen of *Clostridium perfringens* types A-F by agar-gel diffusion. J. Bacteriol., **83** : 284~296, 1962.
- 3) FELIX, A. and ROBERTSON, M. : Serological studies in group of spore-bearing anaerobes ; qualitative analysis of bacterial antigens of *B. oedematis maligni* (*Vibrio septique*) and *B. tetani*. Brit. J. Exp. Path., **9** : 6-18, 1928.
- 4) HALL, I.C. : Differentiation and identification of the sporulating anaerobes. J. Infectious Diseases, **30** : 445~504, 1922.
- 5) 林薫, 釘田芳文, 田原守夫, 山県宏 : *Clostridium welchii* Hobbs' type 2 による集団食中毒事例. 長崎大学風土病紀要, **3** (1) : 1~9, 1961.
- 6) 林薫, 釘田芳文, 田原守夫, 山県宏 : *Clostridium welchii* Hobbs' type 6 による一家族の食中毒事例. 長崎大学風土病紀要, **3** (2) : 87~92, 1961.
- 7) 林薫, 三舟求真, 新城長重 : 沖縄における食中毒事例と Hobbs 型ウエルチ菌の分離. 長崎大学風土病紀要, **4** (3) : 157~165, 1962.
- 8) HENDERSON, D.W. : The somatic antigens of the *Cl. welchii* group of organism. J. Hyg., **40** : 501~512, 1940.
- 9) HENRIKSEN, S. D. : Dissociation of *Clostridium welchii*. Acta Path. Scand., **14** : 570~596, 1937.
- 10) HOBBS, B.C. et al. : *Clostridium welchii* food poisoning. J. Hyg., **51** : 75~101, 1953.
- 11) HOWARD, A. : Races sorologiques du *B. perfringens*. Ann. Inst. Pasteur., **42** : 1403~1419, 1928.
- 12) 石田勝一, 山岸高由, 河合康守, 西田尚紀 : *Clostridia* の毒素原性. I. *Clostridium welchii* の toxinogenic strains の分離について. 医学と生物学, **62** (2) : 41~44, 1962.
- 13) 石田勝一, 山岸高由, 西田尚紀 : *Clostridia* の毒素原性. II. *Clostridium welchii* の toxinogenic strains とその熱耐性の喪失について. 医学と生物学, **62** (4) : 89~92, 1962.
- 14) KREUZER, E. : Zur Kenntnis serologischer Verwandtschaftsbeziehungen einiger pathogener Anaerobier. Z. Immunforsch., **95** : 345~359, 1939.
- 15) MEISEL, H. : Ueber die Antigenstruktur der Gasbazillen. Z. Immunitäts., **92** : 79~86, 1938.
- 16) OAKLEY, C.L. : Toxins of *Cl. welchii*: a critical review. Bull. Hyg., **18** : 781~806, 1943.
- 17) OAKLEY, C. L., and WARRACK, H. : Routine typing of *Clostridium welchii*. J. Hyg., **51** : 102~107, 1953.
- 18) ORLANS, E.S., and JONES, V.E. : Studies on some soluble antigens of *Clostridium welchii* types B, C, and D. Immunology, **1** : 268~290, 1958.
- 19) ORR, J.H., and REED, G.B. : Serological types of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol., **40** : 441~448, 1940.
- 20) RODWELL, A.W. : Serological subtypes in *Cl. welchii* type A, B, C, and D. Australian Vet. J., **17** : 58~68, 1941.
- 21) SVEC, M.H., and McCoy, E. : A chemical and immunological study of the capsular polysaccharide of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol., **48** : 31~44, 1944.
- 22) WILSDON, A.J. : Observation on the classification of *Bacillus welchii*. Univ. Cambridge, Inst. Animal. Pathol., 2nd Rept. of the Director, 53~85, 1931.
- 23) 山県宏 : ウエルチ菌食中毒の概念と其の検索法. モダンメデイア, **4** (3) : 1~8, 1958.
- 24) ZEISSLER, J., and RASSFELD-STERNBERY, L. : Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. Brit. med. J., **1** : 267~269, 1949.

Summary

Though, in the anaerobic cultivation, the oxygen contained in air-tight jars can be removed by chemical methods, the technique is not only complicated but also sometimes the medium on the Petri-dish is stained with chemical reducing agents. It was a convenient method for the cultivation of *Cl. welchii* that the Todd modified enriched medium modified by the author

(beef extract 10.0g, heart-infusion powder 7.5g, NaCl 2.0g, NaHCO_3 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.8g, glucose 2.0g, yeast extract 3.5g, and agar-agar 20.0g in distilled water 1000.0 ml), was incubated in the environment of the displacement of the air in anaerobic jars by carbon dioxide evaporated from dry-ice. But by the application of this method, the colony of *Cl. tetani* which was strictly anaerobic could not be developed sufficiently.

Cl. welchii has been usually most frequently related to the gaseous gangrene of wounds, however, it has been stated by HOBBS et al (1953) and many other workers in England that a number of cases of gastroenteric diseases especially food poisoning have been caused by heat-resistant variants of *Cl. welchii* type A. It is known, on the other hand, that the isolation of toxinogenic strains of them producing α -toxin decreased more and more, by longer and higher heating of samples. But as previously reported, the onset of illness of a mass food poisoning incidents which occurred in July 1960 in Nagasaki city due to *Cl. welchii* Hobbs' type 2 was very acute and so severe that bloody excrement, intestinal bleeding, convulsion and delirium were seen. From these results, it seems to be thinkable that food poisoning caused by *Cl. welchii* is not always depending upon its α -toxin production. It is no denying that the serological typing of *Cl. welchii* isolated from samples may be more available than that according to biological characteristics or toxin components in case of epidemiological investigation of infectious route or distribution of *Cl. welchii*. Nevertheless, the examination of antigenic structures of *Cl. welchii*, for the purpose of serological typing, has not been carried out in details. In this paper, 22 strains of *Cl. welchii* Hobbs' type, 2 strains of *Cl. welchii* type A (toxinogenic strain) and 48 strains of *Cl. welchii* type A isolated from feces of healthy persons and soils were examined in this respect.

From the results of Table 1, 2, 3, 4 and 5, it was supposed that each strain tested possessed thermolabile components which were different in quantity, however, this thermolabile property ought to be regarded that the cells for the agglutination reaction suspended in the 0.5% formalin saline solution were heated for 30 minutes at 100°C . Table 6 showed the difference of the thermolabile property by heating degree of the cells suspended in physiological saline solution with or without the 0.5% formalin between the strains of type 1, 7 and 9, and that the strain of type 7 possessed, so to call it, the formalin-thermolabile component. From the results of the Table 7, it was demonstrated that the thermolabile components were overlapped between type 3 and 4, type 7 and type 9 respectively, and the strain of type 7 also possessed another peculiar thermolabile component. Table 8 showed that these components were deprived of its agglutinability and the activity of agglutinin-absorption after heating it for 30 minutes at 100°C .

It has been found by SVEC, M. H. et al. (1944) that each strain of *Cl. welchii* type A, B, C and D possessed one another overlapping "capsular" polysaccharides by the method of precipitation or agglutination test. On the other hand, HENDERSON, D. W. (1940) stated that *Cl. welchii* type B and type D possessed a thermolabile somatic antigen which lost the agglutinability after heating, and that this antigen could not be observed in *Cl. welchii* type A and type C. However, the thermolabile component confirmed by author could not be considered to be "capsular" by the method of capsule stain or the electronmicroscopic observation, but it

seemed to be similar to the L antigen observed by HENDERSON, D. W..

Though the strain of type 5 which was little agglutinated with the homologous antiserum has always produced a mass of mucous substance, the titer of the agglutination reaction rised markedly after heating of it. However, from the fact that the mucous substance was observed more or less, surrounding the cells of all strains tested as similarly as the strain of type 5, and they showed no changes in the picture after heating of them by the electronmicroscopic observation, the mucous substance could not be considered to be closely related to the inagglutinability.

Table 9 showed that the thermolabile component in the Table 6, 7 and 8 was deprived of its antigenicity after heating, and simultaneously, strains of type 1 and 7 possessed a formalin-thermolabile component in its thermostable somatic antigen as same as in the thermolabile component.

(Author)

Received for publication January 25, 1963