総 説

胞 子 形 成 菌 の エ コ ロ ジ ー

——自然環境・食品・腸管における *clostridia*——

西 田 尚 紀*

Ecology of Spore-Bearing Organisms

——*Clostridia* in Natural Circumstances, Foods and Human Intestines——

Shoki NISHIDA

(Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa
University: 13-1, Takara-cho, Kanazawa-shi)

細菌で spore (孢子, または芽胞) を持つもののうち、嫌氣的でなければ生えないものを *Clostridium* (*Clostridia* は複数) といい、通性嫌気性あるいは好気性の下で発育する菌を *Bacillus* (*Bacilli* は複数) と呼ぶ。食品を取り扱う人達にとって、この *Clostridia* の中で *Clostridium perfringens* (和名にウェルシュ菌) は最も良く知られている菌であるが、食品細菌を取り扱う人の話題として、私はむしろ、より基本的で重要な性質として「孢子をつくる菌の特質」について説明し、この基盤の上に乗って *Clostridia* この中で特に *C. perfringens* に主として言及したい。

Clostridium と *Bacillus* は原則的に土壤微生物群といてよい。ここでは増殖よりいかに耐久化するかが種族保持にとってより重要である。

適者生存の原則に従って自然界ではそれぞれの生きものが驚くほど巧みに彼ら自身の生存の工夫をこらしている。土壤のようなところを定住の場所とする *Clostridium* や *Bacillus* はこの栄養の乏しい環境で生きる術として「孢子」という巧妙な生物体に変身する。一般に孢子をつくる原則として、(1) 栄養型細胞がよく発育する、(2) この発育過程でその障害、特に必須因子の欠けたときにできる^{1),2)}、と理解されているから土壤のようなところでは栄養物はたちまち何らかの欠乏状態となり増殖と同時にこの機構が働くものと思われる。Siala ら³⁾

は、森林地帯土壌の 1 g につき $10^5 \sim 10^6$ 程度いる細菌の 15~46% が孢子であると述べ、Smith⁴⁾ もまた土壌中から分離される *anaerobes* のすべてが *clostridia* であると述べているところからみても孢子こそがこの環境下での適者生存の最重要な因子といえるだろう。土壌の中にカビが入り込むと、それを食物として *Bacillus* は発芽すると Siala らはけい光抗体法を用いて証明している。

栄養細胞のこの *species* の性質を保持するに必要なもののすべてを template として孢子の中に運び込むが(栄養細胞のクロマチン体の 1/2~1/8 を孢子の中に持ち込む⁵⁾) 孢子と栄養細胞は形態の違いを初めとして⁶⁾ 化学構造⁷⁾、生化学的活性^{8),9)}、免疫学的性質¹⁰⁾ の上で、共通点の方がむしろ少ないくらいに違っている。したがって sporulation にしろ germination にしろ、両者間のどちらかへの移行に当たっては相当に激しい解体——再合成の機構が働くことが当然考えられる。この「孢子をつくる菌種」と「孢子をつくらぬ菌種」の間には比喩的ではあるが「卵をつくる動物」と「哺乳動物」ぐらいの差異があると考えて両者に対する考え方を別にすべきであると私は常々考えているが、この認識は現代の細菌学では必ずしも十分ではない。

しかしながら、実際的には細菌学では「グラム染色法」があって細菌はグラム陽性が陰性に二大別する慣行があり、この染色法が上記の私の主張を実用的に果しているように思える。spore および spore-like organelle を形成する菌種のすべてはグラム陽性の側にあって決して陰性側に無く、グラム陽性が否かによってかなりの区

* 金沢大学医学部微生物学教室：金沢市宝町 13-1
本稿は日本食品衛生学会第 30 回学術講演会 (昭 50.
10. 金沢) の特別講演をもとに執筆されたものである

別をすることが有益であることが広く知られているからである。細菌学のかなりポピュラーに使われている教科書に Jawetz, Melnick, Adelberg の書いたものがあり¹¹⁾, この中で彼らは「グラム染色性は系統発生上一連の形態的特徴と関係している」と述べている。高名なこの遺伝学者がどの理由からグラム陽性菌群に対し「phylogenetically related forms」と述べているか分からないが、少なくとも私は *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* など……の pleomorphism, 特に、これらの菌種がつくる棍棒状,あるいは、顆粒構造が spore 形成菌種の胞子と系統発生上一連の生理のもとにつくられるものとして再考されるべきであると考えている¹²⁾。ただ、現在は、胞子そのものがようやく注目され出し、このもののつ生物学的意義に向かってはなばなしい研究がなされているわけで spore-like structures が注目を受けないのもやむを得ない。

グラム染色性の相違の主なる原因はその cell wall の中の lipid layer の存在の有無に関係する (Salton¹³⁾) ことは今日、多くの人の認めるところである。グラム陽性菌の cell wall には lipid が少なく (約 2%) Muco-complex のやや厚い monolayer であるのに対し、グラム陰性菌の cell wall には lipid は 20% にも達している。Jawetz ら¹¹⁾はこの lipid を cementing substance と呼んでいるが、いわば「グラム陽性菌種はセメント抜き」,「グラム陰性菌種はセメント入り」の構造物に囲まれているといえることができる。グラム陰性の菌種はグラム陽性の菌種に比べてはるかに安定していて、容易に lysis を起こさない。これに反し、グラム陽性の上述の一連の菌種、特に spore 形成菌は、何らかの因子を働かせると容易に lysis を起こす^{14)~20)}。このような lysis は細胞のどこかにわずかの損傷を与え、引き続いて細胞自体の「burst」する作用が関係するものと考えられている。しかし少なくとも cell wall の中からも数多くの lysins が遊離してでてくる^{21), 22)}。一体、グラム陽性の上記杆菌群には lipid のような強固な cell wall 支持物質が欠けていて果してこの菌の保持に十分なのだろうか。

ここでもう一度 *Bacillus* と *Clostridium* が本質的には土壌で生きる生物であることを注意願いたい。彼らは上記のようにその cell wall には確かに lipid layer を持たないが胞子の表面にはグラム陰性菌の lipid layer よりも、はるかに強固な lipid layer を持ち²³⁾きびしい環境に耐えて残存する。胞子をつくる菌の生存にとってこの時期が圧倒的に長く栄養細胞は彼らにとってこの地上におけるほんの temporary phase の状態に過ぎない。発芽するや否やきびしい環境の中で増殖を抑止され、彼らは直ちに、spore stage への作動を始めねばならない。spore 形成菌が対数増殖が終わるや否や (stage I) すでに (asporogenous の菌の行わない) spore 形成

をめざしての 8~10% のタンパク turn over を開始している^{11), 24)}。このような菌種の栄養細胞の表面は細胞表面の壁を唯一の守りとするグラム陰性菌の表層とは生物学的に異なっても不思議ではないと思える。つまり発芽するや直ちに解体し胞子をつくるものにとって lipid よりむしろ lysins が重要であると考えるのはあまりに合目的解釈だろうか。しかし、こと、生存に関する限り合目的でない限り、自然界では生存が無いのであり、このように解釈してよいと私は信ずる。

ただ、ここで「*Bacillus* や *Clostridium* は原則的にすべて土壌細菌である」と述べたとき、例外について付言しておきたい。例えば *Clostridium* の中で *C. chauvoei* や *C. novyi* B, D 型, *C. perfringens* B, C, D, E 型などはほとんど土中からは分離されず、動物腸管から分離される。これらの菌はすべて *in vitro* の培地で spore 形成の悪い菌であることは、これらの菌が土壌中などに比べればはるかに栄養のよい場所 (動物腸管) を定住の場所とする *Clostridia* であることを物語ると思う。

Spore 形成菌はなぜいろいろなもの (酵素, 毒素, 抗生物質, その他の soluble antigens) を菌体外に容易に排出するのか。

Bacillus がプロテアーゼやジアスターゼ、あるいは抗生物質を容易に菌体外に排出するように *clostridia* のかなりの species は容易に毒素タンパクを菌体外に出す。このほか、免疫学的に活性なタンパクを含めて soluble antigens と呼び一括して考えよという人もあるが²⁵⁾、これらの菌のタンパク排出機構は実はその胞子をつくる性質そのものに関係しているという事実が近來注目をあびてきている²⁶⁾。以下、これについて述べる。

前述のように土壌に住む spore 形成菌にとっては、あまり当てにできない Vegetative cells をいち早く解体しこれを spore 体制に再合成する生理がその増殖機構にもましてこの菌の生存上大切な生理機構であるから、spore 形成の強いものほどこの解体酵素が強いとしても不思議でない^{24), 27)~29)}。もっとも、この際、出てくるプロテアーゼは 1 種類でなく、そのうちのどれが主役を果しているかについてはさかんに検討されている^{30), 31)}。増殖が少しでも抑止されると直ちにこの菌はこれの酵素が作動し、*B. subtilis* の実験では 1 時間に 8~10% ずつ程度のタンパクが新しい spore タンパクに入れ代わり 6 時間たてば母体の菌タンパクは全く解体され、新しいタンパクに入れ代わる²⁴⁾。このプロセスの中で、Stelow³²⁾ は彼の使用した *B. megaterium* では菌体中にあるプロテアーゼの 20 倍ものプロテアーゼが菌体外に soluble enzymes として排出されていると述べている。このプロテアーゼは菌体内では菌タンパクの turn over に直接関係していると考えられている³³⁾。これらのプロテアーゼは増殖が抑えられだし spore 形成の作動が始まるとき新しく合成されるもので³⁴⁾合成されるや否や菌体の外に

流出する（何故ならこの時期は cell wall や細胞の解体期に相当する．ここでは分子量がたとえ10万であろうと100万であろうと細胞からの遊離はきわめて容易なはずである）．このプロテアーゼ産生のメカニズムは exotoxins が菌体内でつくられるや直ちに外に溶出し、菌体内に証明されるより外でその存在を証明されるのにきわめてよく似ている．すでに Oakley²⁵⁾ は bacterial toxins の総説の中で、従来の exotoxins の中にさまざまな酵素を含めて soluble antigens として取り扱っており、clostridia の研究者達は、その生成溶出に関しては全く区別していないように思える．ここでは主毒素を α -toxin と名付け酵素であろうとなかろうとその他の soluble antigens を β , γ , θ , δ , κ ... などと名付けるのが慣習となっている．逆説的な表現を用いるならば spore 形成菌 (spore-like structure をつくるものも含めて) 以外は菌体外に soluble antigens を出さないはずである．グラム陰性の菌はいわゆる exotoxins に相当するタンパクは持っているが²⁶⁾ 菌の lysis がない限り容易に流出しない．

Soluble antigens (酵素, 毒素など...) と spore 形成菌との関係は spore の形成の有無より, spore stage のどこかを問題にすべきである．

もし, exotoxins の流出が, 上述したように, spore 形成に関係しているのであれば形態学的に特徴のあるこのメカニズムは容易に解明されていたと思われる．しかしながら, 実際に現れる現象としては, exotoxins を出す clostridia のたくさんの菌種では胞子をつくらない菌株の方がつくるものより毒素原性が強いものが少なくない．例えば, 我々が強毒株として保管している *C. tetani* Harvard 株, *C. perfringens* BP 6 K (我が国では PB 6 K といわれているが外国では BP 6 K) *C. novyi* 140 などは同種の他の株に比べて格段に胞子をつくりにくい菌であり, また自然界から分離される *C. novyi* でもこのことは明らかに観察することができる^{30), 37)}．これに反して *C. histolyticum* では spore 形成の強いものほど毒性が強^{38, 39)}, 胞子と毒素原性に関して格別の一貫した法則があるとは考えられなかった次第であった．*C. histolyticum* と spore 形成との関係については Seballd が「西田により later confirmation を受けた」と書いているので, 彼女の速報より早くでている我々の文献を引いておく⁴⁰⁾．もっとも, clostridia を一貫した法則などなくとも, 各 species それぞれについて spore 形成能と毒素原性との関係が分かれば, toxigenesis の解明の十分な糸口となり得るものと思われ, 私達が, 1964年来 *C. perfringens*⁴¹⁾, *C. sordellii*⁴²⁾, *C. novyi*, *C. tetani*⁴³⁾ *C. histolyticum*³⁰⁾ で行ってきた研究はまさしくこの線に沿って行われたものであった．このような具体的な事実の裏には, あくまで spore 形成と毒素との間に何らか深い関係があるのではないかという考えがあったが,

第1図 spore 形成の段階

1969年, パスツール研の遺伝学者 Schaeffer²⁶⁾ は *B. subtilis* あるいは *C. histolyticum* の mutants を使い, その生成する antibiotics, enzymes, toxins についてなされたパスツール研の学者の仕事を一方の土台とし, 他方, 私達の clostridia の胞子形成能と毒素原性

との諸論文を土台として、この「enzymes, antibiotics, exotoxins の生成」の仮説を構成し総説した。このとき、パスツール研の電子顕微鏡学者と組んでこの方面の研究にきわめて有用な方法論を提示した^{44)~46)}。すなわち、彼は *B. subtilis* 168 を用い亜硝酸、プロフラビン、 Cl_2CO 、UV、ニトロソグアニジンなどの mutagens を用いて spore 形成のいろいろな段階、いわゆる stage-blocked mutants をつくりその正確な定義を示した。この規定は今日孢子研究者の多くの人に用いられているので、次に簡単に記すこととする (第1図)。

spore 形成の I 期: 菌の対数増殖が終わり増殖にブレーキがかかりだすとき。細菌のクロマチンは一つの axial rod ようになる。**II 期:** クロマチンのほぼ $1/2 \sim 1/8$ を包んで細胞の一部に invagination が起こるが、この septum のところに cell wall の形成はない。**III 期:** septum の膜が延び小さい方の核を包む。**IV 期:** cortex の形成。**V 期:** cortex の外側に spore coat。**VI 期:** 耐熱性をもつ cortex の完成。**VII 期:** 母体の Lysis, spore の遊離。

この電顕による孢子段階の決め方はそれまで私やアメリカの学者が用いていた孢子対総菌数の比で示す方法より、具体的でかつ、論理にかなうものである。

この研究の中で明らかなことは、stage I~VII までのどの stage の菌も enzymes や exotoxins, antibiotics を産生することができるが、stage 0 にとどまる菌 (栄養型、すなわちクロモゾームが1個の細胞の中で2分しているもの) では上述の soluble antigens はでないということである。Schaeffer は遺伝学者であるためか、ある因子の (+) か (-) かにについてのみ述べているが、毒素を研究するものにとっては、どの stage が毒素原性にも最も関係があるかが今後の問題になると思う。この立場

から検討されたものとしては、わずかに「*C. histolyticum* の毒素産生は spore stage I 以後のものが毒素を産生するのに、0-stage のものに無い」とする研究⁴⁶⁾と *C. perfringens* の enterotoxin 産生株が spore coat タンパクにあるとする Duncan ら^{47), 48)}のものがあるに過ぎない。Duncan らはさらに、stage III あるいは IV のものもまた enterotoxin を産生する能力があるとも述べている。spore coat substance はこの時期につくられていると考えてよいからウェルシュ菌食中毒の起炎菌に対してはいたずらに spore 形成と enterotoxin との関係を追うより、上記 stage との関係で精査されることが望ましいと私は考える。

spore 形成菌を実際に取り扱う場合、その培養性状、生化学性状、免疫性状が spore 形成能によって強く左右されることにまず留意すべきである。

孢子が生化学的に非活性で栄養型と全く異なった形のものであることを知っていても、多くの人は実際に際して、これがどのように現れるかについては必ずしも知らない。例えば、孢子形成菌の中には同一種の菌と思われるのにコロニーの様相があまりにも異なるのでどうしても同一の菌種と思われないものによく出合う。しかし、よく調べてみると孢子をつくる性質の差でそのように異なっていることが少なくないことをまず念頭に置くべきである。加えて、*clostridia* のほとんどはペン毛を持ち、遊走しようとする傾向をもつのに、孢子をつくる力は抑止的に働き、したがって孢子をつくるコロニーは総じて拡がらず、かつ、孢子を反映して不透明白色である (*bacillus* などではさらにかっ色になることもある) このような孢子形成力の差は糖を含む血液寒地培地で、たとえ孢子形成が実際に起こらなくてもかなりの形態上の

第1表 缶詰由来の *C. sporogenes* の生化学性状の多様性

糖分解の型	菌株	グルコース	マルトース	フラクトース	シュクロース	ラクトース	ガラクトース	ラフィノース	サリン	卵白消化	ゲラチン消化	備考
A	16	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	内15株 (65%) は <i>C. sporogenes</i> のコロニー (rough 型)
B	3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
C	4	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
D	16	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3株をのぞくすべて (92%) は smooth 型のコロニー、円型
E	13	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
F	2	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
G	2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
H	2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
I	3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
J	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

差を示す場合が多い。考えてみれば、ある一つの species の中で、spore 形成の強い菌と失ったもの (O-stage あるいは O-stage に近いもの) がある場合、全く異なったコロニーが現れることの方が自然であり、また両者が生化学作用および免疫学反応の上で差がでてくる方がむしろ自然のはずである^{49)~52)}。栄養細胞を守る *bacillus* の cell wall はきわめてもろい性質のものであるから、いったん、孢子を形成する能力を失うと絶えず死滅したり変性したりする。十分経験した人でもこの変性した菌には手こずる。このような菌を調べるときには、弱く heat-selection したり、数代継代して「若返らす」ことが必要なのはこのためである。また菌移植の際生えてこなかったり、驚くほど遅い lag を示すものこの部類の菌であり菌として変性しやすいことを常に念頭に置く必要がある。*C. haemolyticum*, *C. chauvoei* などに属する菌株はどれもこの傾向をもっている。このような菌は前培養の適当な時間を選んで植えると驚くほどよく生える。spore 形成の喪失が菌の変性に重なり、コロニーや生化学性状を変え、同定に困った事例を述べる⁵³⁾。1973年日本缶詰研究所 (横浜市保土谷) の松田氏より、菌汚染缶詰中の *clostridia* を同定してほしいとの依頼を受けた。74 株中 62 株 (85%) はそのコロニー性状、培養性状、孢子の形態、生化学性状、および 1% グルコース加 2 日培養液のガスクロマトグラフィーの成績から *C. sporogenes* と推定したが、その生化学性状だけからみ

ると第 1 表のように多様な糖分解のパターンがみられた。R 型のコロニーと書いたのは、従来よく知られている medusa head のコロニーを指すものだが点線上部の菌群がそれでこれらのコロニーは総じて孢子形成力が強い。これに反して下の部分のパターンの菌群は円形スムーズのコロニーでその大部分は孢子を形成する能力を失った菌群であった。きわめてばらばらの成績を得る最大の理由として孢子をもつ菌群に特有の現象があることを強調したい。すなわち第 2 図 (a)(b) にみるように分離した *C. sporogenes* の中から「孢子をつくる菌群」と「つくらぬ菌群」をランダムに選んでその増殖カーブをとると孢子形成を失った菌がすべてきわめて不安定で autolysis を起こすか、(第 2 図 (a)) 初めから抑えられて (恐らくは lysis 気味に growth している) 増殖する (第 2 図 (b))。孢子をつくる過程そのものが生化学反応に複雑な影響を与えることの外に、spore 形成能を失った菌もまたこれよりはるかに異常な増殖曲線を示すことが示されている。(*C. sporogenes* は糖の存否にかかわらず、同じくらい増殖するので^{54), 55)} 第 2 図はベースとして糖不加の条件で培養されている)。したがって *clostridia* では 1 週間培養の後で成績を判定することはいたずらに困乱を起こすに過ぎない。この点、Bergey's Manual の第 8 版⁵⁶⁾ の *clostridia* の担当者達はその生化学性状を培養の早期 (明記していない) に判定していると聞いているが、この方がよいと私は考えている。

ただ、第 8 版では第 7 版⁵⁷⁾ にあった *clostridia* 93 種のうち 53 種をけずり 21 新種を加えるという手荒いやり方が示すように、*clostridia* の分類は全く安定していないのであり、この根本の原因が上記の増殖の不安定さと variability によるものであることを意識して作られて

第 2 図 (a) *C. sporogenes* の増殖曲線
—spore 形成力のある菌と無くした菌—
—●—●—, spore 形成をみとめられる菌群
---x---x---, spore 形成をみとめられない菌群

第 2 図 (b) *C. sporogenes* の増殖曲線の変化
—spore 形成力のある菌と無くした菌—
—●—●—, spore 形成のみとめられる菌群
---x---x---, spore 形成のみとめられない菌群。

第2表 Spore 形成と耐熱性

Spore 形成	菌 株 数	耐 熱 性		
		75° 15分	100° 1hr	100° 2hr (%)
+*	22	22	13	4 (18%)
+ or -*	9	9	6	3 (33%)
-*	31	22	18	17 (61%)

* + BHI 寒天かあるいはプロテオース寒天培地で 2% 以上の孢子を認めるもの。

+ or - (+) になったり (-) するもの

-上記培地で 0.1% 以下の孢子を認めるもの

いるようには思えない。第8版の *Bergey's Manual* では、一つの *species* の中の *strains* 間に本質的な差がなくただ環境によって差がでてくる場合この性質を「V」とし、本質的に差があるとき、これを「D」として「V」と区別しているが「D」として示される多くの性状が「V」である可能性が強い。(1976年以降は、*Bergey's Manual* 第8版の著者 Smith 教授と Hobbs 博士にさらに西田が加わってこれからの *clostridia* を点検することになっているので上述の点についてさらに検討したいと考えている)。

spore 形成力と強耐熱性とは一致しない場合が多いことは案外知られていない。

孢子の属性のうち人間社会と最も深く係わるものの一つはその耐熱性という性質である。少なくとも、普通の生細胞が耐えることのできない70°あるいはそれ以上、時として100°、5時間以上の加熱に耐えることも珍しくない。この耐熱性の本態についてはここでふれないで具体例を述べよう。例えばウェルシュ菌を土あるいは食品から非加熱あるいは70~90°加熱処理の下で分離すると(食中毒の場合でない限り)ここから分離されてくる菌のほとんどは100°の加熱に耐えない。しかし土からなら100°、1~5時間加熱してここから熱に耐えて分離される *C. perfringens* を得ることはさして困難なことではない⁵⁸⁾。

ここで注意しておきたいことは、このようなアブノーマルとも思える異常に強い耐熱性の性質は「形態学的にみえる spore 形成力」とは必ずしも一致しないということである。いやむしろ相反しているといった方が良い場合に私は数多く出合っている^{59), 60)}。この現象は一般にはあまり知られていないので詳しく具体例を引いて説明しておきたい。

土壌あるいは糞便から *C. perfringens* を分離する際、100° 1~5時間加熱してここから菌を得た時、これらの菌は同じ材料を非加熱あるいは100°以下の温度で加熱して得られたときの菌群に比べてはるかに孢子を形成する力は弱い。(100°以下の加熱で菌を分離すれば100° 1~5時間に耐える菌もこの中に含まれて分離されそう

なものだが、実際にこのような菌が分離されることはまれである。この耐熱性の特に強い菌は自然界ではその数が恐らくはきわめて少なく限られていることが原因とと思う)。この事実は *C. sporogenes* についても観察し得た。缶詰中に残存する *clostridia* の大多数が *C. sporogenes* である事実は前述したが第2表にみるとおり、この際は形態的に孢子の形成がきわめて悪い一群にむしろ耐熱性菌株(100°, 1~2時間)が圧倒的に多いことが分かった。このことは一体どのように考えるべきか。私は次のように考える。すなわち、缶詰の中に入り込んだ *C. sporogenes* は加熱により、選択を受け、耐熱性のもののみが残されようが、同時にこの加熱操作によって菌が *mutagenic effects* を受けているものと思われる。この結果耐熱性機構をもっている菌の spore 形成のどこかに、加熱による欠陥ができ、結果として「ほんのわずかしかならぬ菌」ができてくるものと思う。従来、加熱操作によって、いろいろ *mutagenic effects* が現れると述べた研究はあるにはあるが^{61)~64)}、生細胞(少なくとも孢子は生細胞である)を100° 1~5時間も加熱するという操作によってどのくらい変異が現れるかという研究は孢子を材料にする以外あり得ない研究であって、この方面の研究はさらになさるべきものが多々残されているというのが現状だと思う。以上の事実を知っておれば、例えば、*C. botulinum* で spore 形成力とはよくないのにやたらと耐熱性の強いものがあつたとしても了解し得るはずである。耐熱性と spore 形成力との相反的な関係は一つの菌の環境の差によってもでてくることは注目に値する。Anema ら⁶⁵⁾は *C. sporogenes* を種々のグルコース濃度で培養すると、孢子をほとんどつくらず *autolysis* を起こした環境下でできた孢子が孢子のよくできる環境でつくられた孢子の耐熱性(100° 13分)に対し断然耐熱性が強かった(100° 80分)と述べている。耐熱性の孢子は D-value が異なること、また耐熱性の孢子は *heatschock* を与えなければ発芽しにくいこと^{67), 68)}、あるいはリゾチームを培地に与えなければ発芽しにくくなっていることが知られている^{69)~73)}。

ウェルシュ菌食中毒は主としてエンテロトキシン陽性菌によるが陰性菌による可能性を見捨ててはならない。

spore 形成菌で食中毒を起こすものにウェルシュ菌 (*C. perfringens*) とセレウス菌 (*B. cereus*) がある。ウェルシュ菌食中毒は従来までは一般食中毒菌の主力を占めることはなかったのであるが恐らくは肉、特に鶏肉を食用とする習慣が広まるにつれて (我が国の現状では欧米と格段のひらきがある) ウェルシュ菌食中毒の比重が増すものと思われる。また文明の進歩とともに衛生状況が改善された場合、スタフィロコッカスやサルモネラ、そして我が国では腸炎ビブリオなどがなくなった後も、その spore 形成能という特異な残存力によって残る可能性が強い。英国あるいは米国では、急増しているウェルシュ菌の食中毒^{74), 75)}は、いったん起こると大量の人が罹患し、食中毒人数としては最も多い。このことは衛生状態が改善された状況下の気をゆるした間げきをついて起こることによるように思える。ウェルシュ菌はかなり増殖しても食品の香りは依然「fragrant」とであると記載されている⁷⁶⁾。

ウェルシュ菌食中毒が、耐熱性ウェルシュ菌によって起こるという1953年の Hobbs⁷⁷⁾ の記載以来、我々は、食中毒ウェルシュ菌については「耐熱性」という特質以外知るところはなかったが、最近、Duncan⁷⁸⁾、Nillo⁷⁹⁾ ら (それぞれ数多くの論文があるので最も新しいものだけ挙げておく) の努力によって食中毒ウェルシュ菌がエンテロトキシンを産出することが明らかとなった。その後外国および我が国の研究者によって疫学的にエンテロトキシン産生株の重要性が立証され^{80)~82)}、また微量の毒素の検出法も考案されるに至っている⁸³⁾。その後 Duncan^{47), 48)} は、さらにこれらのエンテロトキシン産出株は spore 形成力が強く、恐らくは spore 形成のメカニズムがエンテロトキシンの生成と関係すると述べている。ただし、spore 形成とエンテロトキシン産生力との比較検討の結果、この両者の間には必ずしも強い関係がみられないとの報告もだされているが^{80)~82)}、Duncan 自身 spore 形成の stage III あるいは IV のときに、すでに spore coat 物質が形成されることを推測している。エンテロトキシン陽性の株で案外孢子をつくらぬ株が多いことは我々も見聞している。

私は既述したところで、加熱により選択された株は耐熱性が強いのに形態的にはかえって孢子を形成しにくいものが多いと述べた。これとは逆に、加熱によって耐熱性も spore 形成能も強いものが選ばれてくることもあり数からいってこのような菌は限られているが、この菌の存在こそ危険であろうことも予告したのである⁸⁰⁾。Duncan 博士への手紙にも、この旨書いたことがあるのを彼は親切にも彼のエンテロトキシン産生株についての総説⁴⁷⁾の中で、私の名を引用しているが、私としてはこの菌の出す病原物質がエンテロトキシンのようなものであ

ることには思い至らなかった。これはウェルシュ菌食中毒では無熱下の腹痛下痢であり、毒素型の症状を呈するとはいえず、大量感染あるいは体内での菌増殖を考えないわけにはいかないので感染型食中毒という概念から抜け切れなかったためと思う。

しかしながら、私は今もなお、この中毒が感染型の中毒であるという本質を見誤ってはならないと思っている。Hall⁸⁴⁾ はアメリカで非耐熱性で untypable なウェルシュ菌によってかなりの食中毒が起こっていることを証明しているが、これらの菌は非加熱の cold board の肉製品中のウェルシュ菌によって起こされたものである。Hall の論文はエンテロトキシンの発見以前の論文であるのでエンテロトキシンとの関係について述べていないが、これらの菌は100°の加熱に耐えず、また untypable でかつ孢子をよくつくるというから、むしろ自然界に最もポピュラーに存在するごく普通のウェルシュ菌によって起こっているもののように思える。Hauschild⁸⁴⁾ は食中毒由来の菌と異なる普通のウェルシュ菌でも十二脂腸に入れば十分ウェルシュ菌食中毒の起こることを報じている。将来、エンテロトキシン陽性でないウェルシュ菌による感染型食中毒についてさらに検討されることが望ましい。

人腸管のノーマルフローラとしてのウェルシュ菌のエコロジー。

日本人の腸管中のウェルシュ菌の数は外国人の腸管中のウェルシュ菌数に比べて格段に多いらしい^{85), 86)}。Sutton⁸⁷⁾ ウェルシュ菌の多寡は住民の経済生活と関連すると述べているが、果していかがなものだろうか。これに関する文献は Smith⁸⁸⁾ によって総説されている。ウェルシュ菌検索法の進歩⁸⁹⁾は、SPS, TSN の市販の培地を生みだし⁸⁹⁾、さらに TSC などの研究もでている⁹⁰⁾。これらの培地はいずれも培地中の黒化コロニーを目して *C. perfringens* として計算するわけで、この点非特異的黒化コロニーについてたえず注意を払わねばならない不便さはあるが、(小児糞便では非ウェルシュ菌で黒化するものがあって上記の培地は厳重なチェックなしでは使用できない) Nagler 平板上に移しかえ、いちいちチェックするとほぼ Nagler 平板だけを使ったときよりも 10~10² 倍程度のウェルシュ菌を検出できることが分かった。

この TSN 培地を用いて老人の腸管を1年6か月にわたってウェルシュ菌を検索したことがある^{81), 82)}。この結果、分かったことは第3表に見るように菌を多く出す人は常に多く出すのに対し、少ない人は常に少ない場合が多いことが分かった。この老人はいずれも同一の施設(金沢市陽風園)の老人で、いずれも同一の食事をとっている。この歴然とした差は外からの因子によって決まっているのではなく個人差によるものと思われる。2日続けて検索するケースをたびたび繰り返したが、2日続い

第3表 糞便の中に恒常的に *C. perfringens* の多い人と恒常的に少ない人

老人名	被 験 数*	ウェルシュ菌を 1 ml 容量糞便 の中に常に 10^7 あるいはそれ以上を示す例数	(%)
H. K.	24	22	(91.7)
K. Y.	21	19	(90.5)
H. U.	29	25	(86.2)
H. T.	21	18	(85.7)
N. M.	22	17	(77.3)
M. C.	24	3	(12.5)
Y. M.	16	2	(12.5)
K. S.	29	2	(7.1)
S. M.	30	2	(6.7)
S. Y.	19	0	(0)

* 1972年9月より1974年5月まで、毎日続けて週ごとに、月ごとに、いろいろの間隔で調べた。

て 10^8 以上/ml 糞便容量というケースも数多くみられたから、これらの老人の糞便の中には少なくとも24時間は 10^8 台にウェルシュ菌が存在することは確実である。にもかかわらず、これらの老人は健康管理の上からは何らの症状^{88)~95)}も認められず、このような菌が存在することそのことは病原性と結びつかぬものであることが分かった。この1年6か月にわたって調査した老人の場合、この期間を通じて同一の血清型のウェルシュ菌であったので、この菌が定着していることが原因かと考えられたが $10^7 \sim 10^9$ 台のウェルシュ菌を示す別の老人のケースでは血清型は代わったのにウェルシュ菌の数値は依然変わらないので、老人の腸管にはたえずこの程度まで侵入したウェルシュ菌を増殖させる素質があると思われた。日本人の食事の中にどの程度ウェルシュ菌が含まれるかをみるために前述の施設の、1日分の食事に含まれるウェルシュ菌の数を1週間にわたって検査したが、 5×10^2 より決して上回ることにはなかった。腸管の中でどこで増えるのが問題であるが、大腸糞便の10%浮遊液をつくらせて 10^6 程度の菌を入れると糞便液の中で 10^9 に近く増大することが分かったが、この際、 α -toxin がほとんど産生されなかったことについては Goudies⁹⁶⁾ の述べた糞便中の α -toxin-destroying enzymes より、むしろ、この糞便中の毒素産生阻害物質が毒作用發揮を抑えていることが予想された。この物質が何であるかについては検討していない。

人間では幼児、少年にはウェルシュ菌が少ないのに老年になるに従って顕著にこの菌を腸管に巣くわせる人の数が増える。老人と幼児の腸管の正常細菌相を調べると、数少ない差別点の中でウェルシュ菌だけが歴然たる差異を有するが、これが何によるものかは今日まだ分かっていない。

ウェルシュ菌は上記に述べたようにたくさんいても害とならぬのに、Hobbs らはウェルシュ菌食中毒の際の判定の規準として多くの人から 10^5 /g 糞便の *C. perfringens* の発見されることを挙げている⁹⁷⁾。Hobbs らの測定数は恐らく Neomycin 加の Nagler 平板上の *C. perfringens* 数と思われるので上記の SPS, TSN, TSC などの培地を用いればその数は1桁～2桁ぐらいいは確実にあがるので、食中毒時には 10^7 /g 以上のこの菌が多くの人に発見されることが判定として必要なことになる。たしかに、 10^7 /g 糞便量が集団的に発見されれば、それは異常であり、症状を裏付ける根拠とはなり得る。これは、我が国でも、老人を除けば、やはり当てはまる数値といつてよい。上述したように、 $10^8 \sim 9$ 台/ml 糞便容量のウェルシュ菌を常に証明できる健康人がいるのに、 10^7 程度のウェルシュ菌でどうして臨床症状を示すかという疑問が当然起こる。 10^7 台という数値を裏打ちするような事実到我々も遭遇したことがある⁸⁹⁾。それは高タンパク食の腸内細菌への影響をみていたときのことであるが2人の志願者（ほぼ 10^8 台あるいはこれ以下のウェルシュ菌数を示す人）に同一食事を与え始めて3日目、2人とも突如 10^7 台のレベルに達し、次の日直ちに平常の数値にさがった。この時、志願者の1人は腹部膨満感と中腹部痛という臨床症状をもった（翌日治癒）。

この数的な矛盾は次のように解釈できると思う。すなわち、ウェルシュ菌食中毒は小腸におけるこの菌の増殖と、増殖からくる毒素によるのであるが、糞便中のウェルシュ菌数はむしろ大腸における菌数を反映しているに過ぎない。したがって数の多寡をもって直ちに症状を律するわけにゆかない。ただし、大腸に 10^8 前後のウェルシュ菌胞子をたえず保持する人のウェルシュ菌が、この人の小腸にどのような影響をもつかは興味ある問題とし

て今後検討したいと思っている。

結 語

以上、私は spore 形成菌の特質、特に、これらの菌群が何故タンパク分解酵素を始めたくさんの酵素あるいは毒素を容易に菌体外にだすかについてふれた。また胞子の耐熱性については、「缶詰」の中から最も頻繁に分離される *C. sporogenes* について説明し、耐熱性の特に強いものがかえって spore 形成が悪い場合が多いことについて警告した。また一般に *clostridia* を扱うときには spore 形成能の破壊が生化学性状に相当に強い影響を与えていることをまず認識すべきであることを併せて述べた。ウェルシュ菌食中毒についての最近の情勢を述べるとともにさらにエンテロトキシン陰性のウェルシュ菌についても注目されるべきであると述べた。またエンテロトキシンの生成はたしかに spore 形成のメカニズムに関係があるであろうが、形成された胞子との関係を求めるより spore 形成段階の上から見直されるべきであろうと述べた。さらに、日本人の健康老人の糞便の中に $10^{7-9}/\text{ml}$ 糞便容量のものが少なくないこと、およびその持つ意義について討議した。

文 献

- Grelet, N.: Ann. Inst. Past., **81**, 430 (1951).
- Tomcsik, J.: Erg. Microbiol. Immunit. Exp. Ther., **35**, 39 (1962).
- Siala, A., Hill, I. R., Gray, T. R. G.: J. gen. Microbiol., **81**, 183 (1974).
- Smith, L. D. S.: Appl. Microbiol., **29**, 590 (1975).
- Young, E., Fitz-James, P. C.: J. Biophys. Biochim. Cytology., **6**, 467 (1959).
- Kay, D.: Biochem. J., **109**, 810 (1968).
- Gould, G. W., Hurst, A.: The Bacterial spore, 1st ed., London & New York, Acad. Press (1969).
- Warren, S. C.: Biochem. J., **109**, 811 (1968).
- Deutscher, M. P., Kornberg, A.: J. Biol. Chem., **243**, 4053 (1968).
- Waites, W. M.: Biochem. J., **109**, 803 (1968).
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A.: Rev. Medical Microbiology, 11st (ed). p. 24, Tokyo, Maruzen (1974).
- 西田尚紀: 日細誌, **28**, 401 (1973).
- Salton, M. R. J.: The Bacterial Cell Wall. p. 32, Amsterdam, London & New York, Elsevier Pub. Co. (1964).
- Altenbern, R. A., Stull, H. B.: J. gen. Microbiol., **39**, 53 (1965).
- Kingan, S. L., Ensign, J. C.: J. Bacteriol., **96**, 629 (1968).
- Ogata, S., Hongo, M.: J. gen. Microbiol., **81**, 315 (1974).
- Doi, H.: 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 370 (1972).
- Kiritani, K., Mitsui, N., Nakamura, S., Nishida, S.: Jap. J. Microbiol., **17**, 361 (1973).
- Shimamura, T., Nakamura, S., Hayase, M., Nishida, S.: J. Med. Microbiol., **7**, 277 (1973).
- Nakamura, S., Nishida, S.: *ibid.*, **7**, 451 (1974).
- Fan, D. P.: J. Bacteriol., **103**, 388 (1970).
- Takumi, K., Kawata, T., Hisatsune, K.: Jap. J. Microbiol., **15**, 131 (1971).
- Yoneda, M., Kondo, M.: Biken's J., **2**, 247 (1959).
- Mandelstam J., Waites, W. M.: Biochem. J. **109**, 793 (1968).
- Oakley, C. L.: Ann. Rev. Microbiol., **8**, 411 (1954).
- Shaeffer, P.: Bacteriol. Rev., **33**, 48 (1969).
- Michel, J. F., Millet, J.: J. Appl. Bacteriol. **33**, 220 (1970).
- Spitzisen, J.: Spore III, ed. by L. L. Campbell, H. O. Harvorson, p. 125, Amer. Soc. Microbiol., Ann. Arbor (1965).
- Michel, J. E., Cami, B., Schaeffer, P.: Ann. Inst. Past., **114**, 11 (1968).
- Hall, F. F., Kunkel, H. O., Prescott, J. M.: Arch. Biochem. Biophys., **114**, 145 (1966).
- Prestidge L., Gage, V., Spitzisen, J.: J. Bacteriol., **107**, 815 (1971).
- Stelow, P.: *ibid.*, **122**, 642 (1975).
- Mandelstam, J.: 19th Symposium for Soc. Gen. Microbiol. "Microbiol Growth" p. 377 Cambridge, the Univ. Press (1969).
- Bernlohr, R. W.: J. Biol. Chem. **239**, 538 (1964).
- Ail, S. J., Kadis, S., Montie, T. C. (ed): Microbiol toxins. p. 255, p. 271, p. 301, p. 337, New York, & London, Acad. Press (1971).
- Nishida, S., Nakagawara, G.: J. Bacteriol., **88**, 1636 (1964).
- Nishida, S., Nakagawara, G.: *ibid.*, **89**, 993 (1965).
- Sebald, M., Shaeffer, P.: Compt. Rend., **260**, 5398 (1965).
- Nishida, S., Imaizumi, M.: J. Bacteriol., **91**, 447 (1965).
- 今泉昌明, 西田尚紀: 医学と生物学, **70**, 1 (1965).
- Yamagishi, T., Ishida, S., Nishida, S.: J. Bacteriol., **88**, 646 (1964).

- 42) Nishida, S., Tamai, K., Yamagishi, T.: *ibid.*, **89**, 993 (1965).
- 43) Sanada, I., Nishida, S.: *ibid.*, **89**, 629 (1965).
- 44) Ryter A., Szulmaster, J.: *Ann. Inst. Past.*, **108**, 604 (1966).
- 45) Ryter A., Shaeffer, P., Ioneso, H.: *ibid.*, **110**, 305 (1966).
- 46) Bayen, H., Frehel, C., Ryter, A., Sebald, M.: *ibid.*, **113**, 163 (1967).
- 47) Frieben W.R., Duncan, C.L.: *Eur. J. Biochem.*, **39**, 393 (1973).
- 48) Duncan, C.L., Strong, D.H., Sebald, M.: *J. Bacteriol.*, **110**, 378 (1972).
- 49) Bott, K.F., Davidoff-Abelson: *ibid.*, **92**, 229 (1966).
- 50) Dolman, C.E., Murakami, L.: *J. infect. Dis.*, **109**, 107 (1957).
- 51) Nishida, S., Yamagishi, T., Tamai, K., Sanada, I., Takahashi, K.: *ibid.*, **120**, 507 (1969).
- 52) Huang, C.T., Tamai, K., Nishida, S.: *J. Bacteriol.*, **90**, 391 (1965).
- 53) 加藤久人, 中村信一, 芥川俊彦, 松田典彦: 日細誌. **30**, 67 (1975).
- 54) Stickland, L.H.: *Biochem. J.*, **28**, 1746 (1934).
- 55) Hoogerheide J.C., Kocholaty, W.: *ibid.*, **32**, 949 (1938).
- 56) Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual*, 8th ed. p. 551, Baltimore, Williams & Wilkins Co. (1974).
- 57) Breed, R.S., Murray, E.G.P., Smith, N.R.: *Bergey's Manual*. 7th ed. p. 713, Baltimore, Williams & Wilkins Co. (1957).
- 58) Nakamura, S., Nishida, S.: *J. Med. Microbiol.*, **7**, 451 (1974).
- 59) Hall, H.E., Angelotti, R., Lewis, K.H., Foter, M.J.: *J. Bacteriol.*, **85**, 1094 (1963).
- 60) Nishida, S., Seo, N., Nakagawa, M.: *Appl. Microbiol.*, **17**, 303 (1969).
- 61) Northrop, J., Slepecky, R.A.: *Science*, **155**, 838 (1967).
- 62) Aubert, J.P., Millet, J., Castoridis-May, C.: *Compt. Rend.*, **253**, 1731 (1961).
- 63) Curran, H.R., Evans, E.R.: *J. Bacteriol.*, **34**, 179 (1937).
- 64) Nelson, F.E.: *ibid.*, **45**, 395 (1943).
- 65) Anema, P.J., Geers, J.M.: *J. Appl. Bact.*, **36**, 553 (1973).
- 66) Weiss K.F., Strong, D.H.: *J. Bacteriol.*, **93**, 21 (1967).
- 67) Roberts, T.A.: *J. Appl. Bact.*, **31**, 133 (1968).
- 68) Barnes, E.M., Despaul, J.E., Ingram, M.: *ibid.*, **26**, 415 (1963).
- 69) Adams, D.M.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 797 (1974).
- 70) Cassier, M., Ryter, A.: *Ann. Inst. Past.*, **121**, 717 (1971).
- 71) Cassier, M., Sebald, M.: *ibid.*, **117**, 312 (1969).
- 72) Duncan, C.L., Labbe, R.G., & Reich, R.R.: *J. Bacteriol.*, **109**, 550 (1972).
- 73) Baroch, J.T., Adams, D.M., Speck, M.L.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 793 (1974).
- 74) Duncan, C.L.: *J. Milk Food Technol.*, **33**, 35 (1969).
- 75) Hobbs, B.C.: *Postgraduate Med. J.*, **50**, 597 (1974).
- 76) McNicol, M., McKillop, E.J.: *Lancet*, **I**, 787 (1958).
- 77) Hobbs, B.C., Smith, M.E., Oakley, C.L., Warrack, G.H., Cruicksbank, J.C.: *J. Hyg.*, **51**, 75 (1953).
- 78) McDonel, J.L., Duncan, C.L.: *Infection & Immunity*, **12**, 274 (1975).
- 79) Nillo, L.: *ibid.*, **12**, 440 (1975).
- 80) Nillo, L.: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 521 (1973).
- 81) 刑部陽宅: 十全医誌. **83**, 709 (1974).
- 82) 安川 章, 岡田陽一, 北瀬照代, 宮本三郎: 食衛誌. **16**, 313 (1975).
- 83) Uemura, T., Sakaguchi G., Rieman H.F.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 381 (1973).
- 84) Hauschild, A.H.W., Nillo, L., Dorward, W.J.: *J. infect. Dis.*, **117**, 379 (1967).
- 85) Akama, K., Otani, S.: *Japan. J. Med. Sci.*, **23**, 161 (1970).
- 86) 赤真清人, 大谷 昌, 亀山昭一, 伊藤明治, 村田良介: 日細誌. **21**, 619 (1966).
- 87) Sutton, R.R.A.: *J. Hyg.*, **64**, 65 (1966).
- 88) Smith, L. DS.: *The Pathogenic anaerobic bacteria* 2nd ed., p. 118, Illinois, USA, C.C. Thomas Pub. (1975).
- 89) Marshall, R.S., Steenbergen, J.F., McClung, L.S.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 559 (1965).
- 90) Hauschild, A.H.W., Hilsheimer, R.: *ibid.*, **27**, 521 (1974).
- 91) Yamagishi, T., Serikawa, T., Morita, R., Nishida, S.: *Jap. J. Microbiol.*, **18**, 211 (1974).
- 92) 山岸高由: 日細誌. **30**, 36 (1975).
- 93) Olhagen, B., Mansson, I.: *Acta Med. Scand.*, **184**, 395 (1968).

-
- 94) Sapico, F.L., Emori, H., Smith, L. DS.,
Bluestone, R., Finegold, S. M.: J. infect. Dis.,
128, 559 (1973).
- 95) Olhagen, B., Mansson, I., Sapoco, F.L., Emori,
H., Smith, L. DS., Bluestone, R., Finegold,
S. M.: *ibid.*, 130, 447 (1974).
- 96) Goudies, J. R.: J. Pathol. Bacteriol., 78, 17
(1959).
- 97) Sutton, R. G. A., Hobbs, C. B.: J. Hyg., 66,
133 (1969).
- 98) 山岸高由, 守田良子, 高畠 学, 加藤久人, 中村
信一: 第12回日本細菌学会中部支部総会講演集
p. 44, (1975).
- 99) 西田尚紀: モダンメディア, 11, 2 (1965).