

気しゆ疽菌 (*Clostridium chauvoei*) の変異に関する試験

農林省家畜衛生試験場北陸支場 (支場長 杉浦邦紀)

指導 渡辺守松* 川島秀雄**

大 地 隆 温***

(昭和35年12月19日受付)

目 次

I 緒 言

II 実験材料および実験方法

1. R型株作出に関する実験の材料および方法
2. R型菌の生物学的性状に関する実験の材料および方法
3. R型菌の血清学的性状に関する実験の材料および方法
4. R型菌の病原性の変化に関する実験の材料および方法
5. R型菌の免疫原性に関する実験の材料および方法

III 実験成績

1. R型株作出に関する実験
2. R型菌の生物学的性状
3. R型菌の血清学的性状
4. R型菌の病原性の変化
5. R型菌の免疫原性

IV 考 察

V 結 論

文 献

I 緒 言

Clostridium chauvoei は病原嫌気性菌の1種で、主として反芻獣に、まれに豚や鹿に気しゆ疽を起す非伝染性の感染症を起し、炭疽菌とともに土壌病 (Soil disease) を起す代表的の菌である。

気しゆ疽は、牛では4~24カ月の若牛が多く感

染し、初徴として跛行がみられる。本病の特徴は、厚い筋肉を有する部、すなわち、股、臀、肩、胸側、頸、ときとしては顎凹、舌、咽頭にいわゆる、気しゆ疽瘡をつくることである。この腫瘍は初め小さくて疼痛があるが、すみやかに増大するとともに中心部がエ死となり、その結果、無痛、冷感、乾燥、黒変がみられる。これを圧すると捻髪音を発し、打診すれば、ガス産生のため鼓音を発する。切開すると汚赤色の泡沫を混ざる特殊の腐敗バター臭液を流出する。肢の腫脹のために跛行する。しばしば高熱を発し、採食、反芻は廃絶し、高度の呼吸困難、心悸亢進、脈搏微細およびはなはだしい意気消沈がみられ、ついには起立不能となり死亡する。

通常1~2日で死亡し、病巣部は暗黒色の乾燥した筋肉組織からなり、腫脹し、気泡が全般に見られる。

気しゆ疽瘡部は皮下結合織に出血性黄色膠様浸潤がみられる。局所のリンパ節は大いに腫脹し、かつ血液漿液浸潤がみられる。はなはだ急性で死亡したものではこれらの変化が欠除するか、あるいは各所の筋肉に点状の軽い変化があるのみである。これらの特徴的筋肉病巣のほか、ことに死亡後数時間経過した場合には、肝は腫脹して小気泡の集りがあり、豌豆大~桔桃大のエ死巣が散在し、その色は黄金様黄色、断面は乾燥し網状を呈する。脾は腫大せず、血液の色および凝固性も正常である。

多くの仔牛では、成長性の病巣が心臓の弁にみられ、心筋は脆弱で青味をおびている。胸腹腔に

* 現在農林省家畜衛生試験場第2部長

** 現在農林省動物医薬品検査所長

*** 農林省家畜衛生試験場中国支場在動中にこの試験を行った。現在北陸支場第2室長

は、漿液性、出血滲出液がたまりフィブリンが存在する。

潜伏期は牛では1～2日、山羊でも1～2日である。死亡率はほとんど100%を示すが、山羊では耐過するものが、人工感染でかなりある。

感染方法は本菌が芽胞形成し、土壌中に存在し、土壌とともに皮膚および粘膜の創傷より侵入し、また芽胞を含んでいる土壌に汚染された飲食物により腸より感染する。決して動物より動物へ感染することはない。土壌を汚染するもとは本病の屍体であり、屍体ではすみやかに芽胞が形成される。

Clostridium chauvoei は1880年 Arloing, Cornevin & Thomas らによつて確認せられ、後に Roux (1889) により人工培養が成功されたものである。

本菌は偏性嫌気性の大桿菌で周囲鞭毛を有し芽胞を形成する。このような *Clostridium chauvoei* に関する従来の諸家の記載によれば、その平板培養上の集落は、円形ボタン状、(Zeisslerの第IV型)を呈し、これを高層寒天に振盪培養した場合は円形凸レンズ状の集落(以下S型集落と呼称し、菌についてはS型菌と呼称する)を形成するものと、時に平板培養において不完全な樹葉状周縁を形成し(Zeisslerの第III型類似)、高層寒天振盪培養で綿塊状の集落(以下R型集落と呼称し、菌についてはR型菌と呼称する)を形成する可能性があることが認められている。

著者の保管中の *Clostridium chauvoei* 16株中 Zeissler の第IV型を形成するものは12株、第III型類似が2株、第IV型と第III型類似の両型を混成するもの2株であり、第IV型を形成するものが多かつたが、すでにR型集落の形成が明らかに認められたものもあつた。

これらの菌株はそれぞれ肝マブイオンで累代継代されてきたものである。

このように2つの集落型に大別されるが、S型集落を形成するものはもち論、R型集落を形成するものでも、動物に対する病原性は一般に強力であり、著者の保管中のR型集落を形成する西ヶ原

株においても、S型菌と同様少量でモルモットをたおしている。

また菌の形態においても特に差を認められない。したがつてR型菌は単に集落上の変化であるか、あるいはS型菌に比し、その性状が本質的に変異をきたしたものであるかどうかはまだ報告がない。

この点に関し著者は追求したので、その概略につき報告する。

II 実験材料および実験方法

1. R型株作出に関する実験の材料および方法

A. 材料

(1) 供試菌株

Clostridium chauvoei 沖繩株(以下O株と呼称する)および北海道株(以下H株と呼称する)の2株を用いた。これら2株は、ともに強毒S型株である(以下それぞれO.S株およびH.S株と呼称し、菌については、それぞれO.S菌およびH.S菌と呼称する)。これらは肝マブイオン(製法は2項A、(b)にあり)で継代保存されているものである。

B. 方法

上記O.S株およびH.S株を0.01%にイスラビン(3.6ジアミノ10メチルアクリジニウムクロライド)を加えた肝マブイオン(製法、後記)に継代した。

第1実験の方法

O株、H株とも37°C、3日間および10日間培養終了後、肝片の1～2箇を次の培地に移植し同様操作をくりかえした。

しかしこの方法ではO株、H株とも完全にR型集落のみならず、少数のS型集落を形成するものが随伴した。

第2実験の方法

イスラビン加肝マブイオン培養から肝汁寒天高層培地(製法2項A、(C))に振盪培養し、形成されたR型集落を純粹に釣菌し、これを次代のイスラビン加肝マブイオンに移植し、発育したものから再び振盪培養する操作をくりかえした。この方法ではR型集落形成菌のみを得ることに成功した。

それゆえ、以下のべるR型菌についての各実験は純粹に鈎菌して継代した系統のものであり、沖繩R型変異株（以下 O.R 株と呼称し菌については O.R 菌と呼称する）では30代ないし86代、北海道R型変異株（以下 H.R 株と呼称し菌については H.R 菌と呼称する）では50～110代にわたるものを使用した。

2. R型菌の生物学的性状に関する実験の材料および方法

A 材料

(1) 供試R型株

前1項、R型株の作出に関するところでのべたO.R 株と H.R 株である。

(2) 使用培地

(a) Zeissler 血液平板

製法原法のとおり

(b) 肝マブイオン

牛肝臓1にたいして水2の割合に加え、1時間煮沸浸出した液に、ペプトン1%、食塩0.5%を加えたものを、煮沸肝片を約0.5mmの立方型に細切し、これを20こ内外入れた中試験管に、約10ml加えたもので、pHは7.0内外に調製したものである。

なおイスラビン加の場合は、これに0.01%に添加したものである。

(c) 肝汁寒天高層振盪用培地

肝汁（牛肝臓1に対し水2の割合に加え1時間煮沸浸出したもの）にペプトン1%、食塩0.5%の割合に加え、寒天を3%に加え、pH7.0に調製し、高層としたものである。

(d) 葡萄糖加ブイオン

普通ブイオンに葡萄糖を0.5%に加えたものである。

(e) Zeissler 脳粥培地

製法原法通り

(f) B.T.B. 牛乳

全乳を試験管に入れ、適当な色調になるようB.T.B液を加えたものである。

(g) 肉片加牛乳

牛肉を100°C、30分蒸したものを細切し、これを

1～2g試験管に入れたものに全乳を約10ml加えたものである。

(h) Löffler 高層凝固血清

製法原法通り。

(i) ゲラチン培地

肉汁100mlに対し、ゲラチン30g、ペプトン1g、食塩0.5gを加えたものである。

(j) 糖類分解試験用培地

3%のポリペプトン水に0.5%に次の各糖類を加え、B.T.B添加の液体培地（PH弱アルカリ性に調製）を用いた。

添加した糖類は次のものである。

グリセリン、マンニット、ラムノーゼ、プルチット、グリコーゼ、ガラクトーゼ、レプローゼ、サッカローゼ、ラクトーゼ、マルトーゼ、イヌリン、ザリチン

B 方法

肝マブイオンで37°C24～48時間培養したものより、検査用各培地に移植し、37°Cで、それぞれ判定に必要な期間培養した。なお、本菌は偏性嫌気性菌であるため、Zeissler血液平板培養は減圧培養（圧力20～30mm）し、肝マブイオン以外の培地での培養はワゼリン重層法により培養した。

3. R型菌の血清学的性状に関する実験の材料および方法

A 材料

(1) 供試菌種および菌株

Clostridium chauvoei O, S株

Clostridium chauvoei H, S株

Clostridium chauvoei O, R株

Clostridium chauvoei H, R株

Clostridium septicum (株名, 広島および449)

Clostridium novyi (株名, 140)

Clostridium histolyticum (株名H22)

(2) 抗原用菌液製造用培地

1%葡萄糖加ブイオンをPH7.0にしたもの。

(3) 使用動物

体重1,500—3,000gの家兎

B 方法

(1) 抗血清製造用菌液の製法

葡萄糖加ブイオンに各菌を移植し、ワゼリン重層法により嫌氣的に37°C、24—72時間培養した菌体を生理食塩液で数回洗滌したものを生理食塩液で均等浮遊液としたものである。

(2) 免疫方法

菌液を5日ないし7日の間隔で次第に菌を増量しながら家兎の耳静脈から接種した。たゞし注射液量は2—3 ml を超過しないよう濃縮して接種した。なお *Clostridium chauvoei* 以外の菌は、はじめの2—3回は0.5%石炭酸加生理食塩液に浮遊させ、数時間してから接種したが、それ以後の接種時は、石炭酸を加えない生理食塩液に浮遊さしたものをを用い、免疫操作をくりかえし、高度に免疫されたものは全放血し血清を保存した。

(3) 凝集反応用菌液の製法

PH 7.0の1%葡萄糖加ブイオンに、各菌を移植し、ワゼリン重層法により嫌氣的に37°C、24時間培養したものを遠心沈澱後数回生理食塩液で洗滌後0.5%石炭酸加生理食塩液でMcFaland No. 2の濃度としたものである。

(4) 反応術式

(イ) 交叉凝集反応

各免疫血清を生理食塩液で倍数稀釈し、その各稀釈血清の1 ml を試験管に分注し、これに同量の菌液を加え振盪後、40°Cの恒温槽に60分感作後、直ちに結果を判定した。たゞし、*Clostridium histolyticum* 菌液の反応を判定する場合は37°C、24時間感作後判定した。

(ロ) 凝集素吸収試験

吸収菌は、1%葡萄糖加ブイオンに37°C、18—48時間培養したものを生理食塩液で数回洗滌し、最後に3,000 r.p.m. 60分間遠心沈澱した菌を使用した。

ついで、この遠心沈澱した菌に免疫血清を加え、とくに血清と菌量との比率は数回の予備試験で確実に対照とする凝集素を充分吸収し得る量を混合した。これを充分攪拌後、37°Cに2時間感作した後、1夜氷室に(5°C—6°C)に静置した後、3,000 r.p.m.60分間遠心沈澱して、その上清

を採取し、各濃度に稀釈後、抗原(菌液)を加えて凝集反応を行い、結果を判定した。なお凝集反応術式は前項(イ)の交叉凝集反応と同じである。

4. R型菌の病原性の変化に関する実験の材料および方法

A 材料

(1) 供試菌株

Clostridium chauvoei O.S. H.S. O.R H.Rの4株

(2) 使用動物

体重 200—300 g のモルモット

B 方法

肝マブイオンで37°C、48時間培養したものをガーゼ濾過し、肝片を除いた濾液を、モルモットの腹部皮下に接種して、病原性を検査した。

5. R型菌の免疫原性に関する実験の材料および方法

A 材料

使用菌株および動物は前記4項と同じである。

B 方法

O.R株、H.R株とも肝マブイオンに37°C24時間培養したものをガーゼ濾過して肝片を除いた培養菌液を用い、その2—15 ml をモルモットの腹部皮下に接種し、斃死したものは剖検後、菌培養を行ない、耐過したものはR型培養濾液接種後10—14日にS型の強毒菌芽胞2 M.L.D. を反対側の腹部皮下に攻撃して免疫原性の有無を検査した。

III 実験成績

1. R型株作出に関する実験

第1実験：イスラビン加肝マブイオンより、直接次のイスラビン加肝マブイオンに継代した実験成績

O株では、イスラビン加肝マブイオンに37°C、10日間培養後肝片の1—2個を次の培地に移植する方法では、31代目に、少数ではあるが、綿塊状集落(R型集落)の出現しはじめることを確かめた。また37°C、3日間毎の継代では、78代目にいたりR型集落の出現を認めている。

H株では10日間培養のもの37代、3日間培養の

ものは28代でR型集落の出現を認めた。

しかしこの方法では、O株、H株とも、10日毎の継代系で137代、3日毎の継代系のもので273代にいたるも完全にR型集落のみとならず、少数のS型集落を形成するものが随伴していた。

第2実験：R型集落を純粋に釣菌しつゝ継代した実験成績

R型菌作出に関する方法でのべたとおりの方法で純粋に釣菌し継代した成績は次のとおりである。

O株で、この方法を採用して、最初にR型集落を釣菌した時のR型集落は、第1実験でのべた方法で継代していた3日毎継代系の204代のものであり、あらためて、これを第1代として純粋にR型集落のみを釣菌しながら継代したが、その後はR型集落のみとなり、90代にいたっているが、変化は認められない。

H株においても、第1実験の方法で継代していた10日毎継代系の97代のR型集落から釣菌したものを第1代とし、O株同様継代し、110代にいたっているが、R型集落のみを維持している(以上図1参照)。

2. R型菌の生物学的性状

(1) 形態

S型菌は肝マブイオン、普通ブイオン、血液平板培養、其の他の発育培地においても桿状で長糸状を呈しないが、R型菌はS型菌に比し著しく長いものが多く、時には100μ以上の長糸状となり、あたかも悪性水腫菌(Clostridium septicum)の形態に類似してくる。

肝マブイオン、普通ブイオン、その他の液体培地、あるいは血液平板培地の18-24時間培養で、S型菌は十分に発育し、活発であるが、R型菌は十分発育するにもかかわらず運動性は認められないのが普通である。

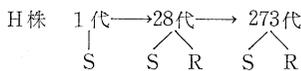
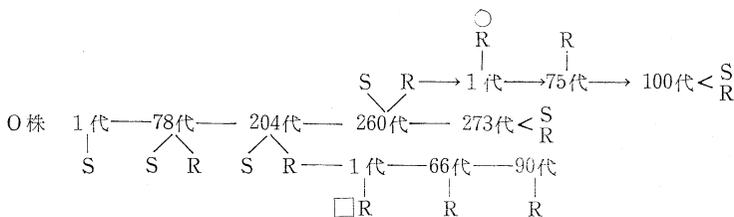
O.R株においては多数の非運動性菌中に時々固有運動をなすものを一、二発見することがあつたが、H.R株には運動性を呈したものは発見されない。

芽胞形成に関しては鏡検上芽胞を確認出来るものはなくなり、わずかにそれに似た小顆粒状のものをO.R菌体中に時々発見する。

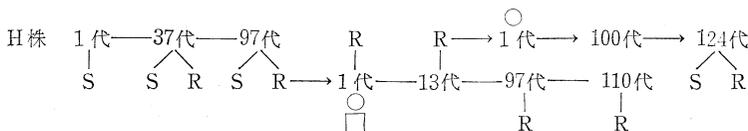
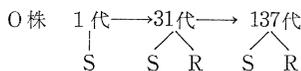
これを芽胞染色(Neisser法)すれば、菌体よりも巾の狭い赤色に着色する小楕円形部分を見る

図1 R型株作出経過

(1) 3日毎継代



(2) 10日毎継代



註 S=S型集落, R=R型集落, ○=復帰継代系, □=純粋釣菌継代系

ことが出来る。しかし H.R 菌では発見出来なかつた。

(2) 染色

肝マブイヨン、血液平板等の18→24時間培養の新しい菌は、塩基性アニリン色素によく染色されるが、培養の古いものは一見空胞のような非染色部分を生じ竹節の如き形状を呈す。Gram 染色法は陽性であるが古いものは不定である。なお、S型菌は古い培養では芽胞を形成するので、R型菌とは全く異つた所見である。

(3) 培養

(a) Zeissler 血液平板

37°C, 48時間培養で直径1—1.5mmの Zeissler 第Ⅲ型類似の集落を形成しS型と同程度の溶血性を有しているが、其の形状は明らかにS型の第Ⅳ型とは異なり Clostridium septicum の集落到に似てくる。集落の大きさは、S型に比しやゝ大きい。すなわち周縁不正の樹葉状集落を形成する。(図2参照)

(b) 肝汁寒天高層振盪培養

培地表面より約1cm以下に発育し、嫌気度はS型と差がなく、24~48時間で中等度のガスを発生

図2 血液平板培養集落所見 (37°C48時間)

区分 株	R 型		S 型		Cl. S 広島
	O株	H株	O株	H株	
所見					

註 Cl. S: Clostridium septicum

図3 高層寒天培養集落所見 (37°C, 48時間)

区分 株	R 型		S 型		Cl. S 広島
	O株	H株	O株	H株	
所見					

註: Cl. S=Clostridium septicum

し、直径1~2mmの球状綿塊状集落を呈するが、Clostridium septicum に比しやゝ縮毛状にと

ぼしい。なお培地の寒天濃度 0.5~5%の間ではその形状に変化を認めなかつた。(図3参照)

(c) 肝マブイヨン

24時間でよく発育し、中等度のガスを発生し、72~96時間で液体部は透明となり管底に菌は沈澱する。肝片は消化せず、特異の臭気を出し、S型と変るところがない。

(d) 葡萄糖加ブイヨン

ワゼリン重層法による嫌気性培養法で良く発育し中等度のガスを発生しつつ発育するが、S型は培養液が平等に濁るのに比しR型は絮状に発育し雲状を呈する傾向があり、2~3日後管底に柔い綿塊状を呈して沈澱し上清は透明となる。

(e) Zeissler 脳粥培地

中等度のガスを発生し良く発育するが、1カ月間培養してもこれを消化および黒変する事はなくS型と変る所がない。

(f) B.T.B 牛乳

原株および変異株の O.S O.R H.S H.R 4株につき比較したが、4株とも、酸産生は陽性であつたが、カゼイン凝固性は H.Rのみ陰性で O.S. O.R および H.S は陽性であつた。消化は全株陰性であつた。

(g) 肉片加牛乳

発育良好で、O.R株は48~72時間目頃よりカゼインを凝固し、透明乳清を分離したが、H.R株は1カ月間培養しても変化しなかつた。なお O.S.

表1 肉片加牛乳培養の牛乳凝固

株	培地数	発育 (24時)	凝 固							
			24時	2日	3日	4日	5日	7日	28日	
O.S	1	+	-	-	-	-	-	+		
	2	+	-	-	-	-	+	+		
	3	+	-	-	-	-	+	+		
O.R	1	+	-	-	+	+	+			
	2	+	-	-	+	+	+			
	3	+	-	-	-	+	+			
H.S	1	+	-	-			+			
	2	+	-	-			+			
	3	+	-	-			+			
H.R	1	+	-	-	-	-	-	-	-	
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	
	3	+	-	-	-	-	-	-	-	
Cl. S	1	+	-	+		+	+			
	2	+	-	+		+	+			

註: Cl. S=Clostridium septicum

H.S 両株とも 5~10日 でカゼイン凝固を来したが消化はしなかつた。(表 1 参照)

(h) Löffler 高層凝固血清

穿刺線にそい R 型菌を 37°C, 24~48時間培養したところ微量のガス発生を認めたが液化は認められず, S 型菌と変る所がなかつた。

なお対照として Clostridium botulinum, Clostridium historyticum 培養では液化を認めた。

(i) ゲラチン液化試験

表 2 R 型菌, S 型菌の生物学的性状

培地	株型	O		H	
		S	R	S	R
Zeissler	Z 型	IV	III	IV	III
血液平板	溶血	+	+	+	+
形態	稈状	稈状	糸状	稈状	糸状
高層寒天 (振盪)	レンズ状	綿塊状	レンズ状	綿塊状	
牛乳培地 (凝固)	+	+	+	-	
肉片加牛乳 (凝固)	+	+	+	-	
Löffler 血清 (消化)	-	-	-	-	
ゲラチン (液化)	+	+	+	+	

37°C, 3~4日 培養で, O および H 株の S.R 型菌ともこれを液化した。

以上の成績を一括表示すれば表 2 の通りである。

(4) 糖類分解試験

実験方法の項に記した方法で糖類分解試験を行ったが, S 型菌と R 型菌との間に差がみられなかつた。その成績は表 3 の通りである。

表 3 糖類分解試験成績

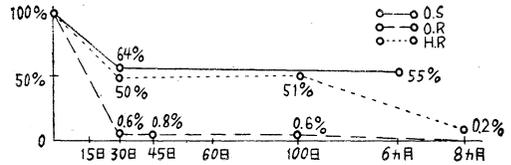
糖類	株型	O		H	
		S	R	S	R
Glycerin		-	-	-	-
Mannite		-	-	-	-
Rhamnose		-	-	-	-
Dulcitol		-	-	-	-
Glucose		+	+	+	+
Galactose		+	+	+	+
Levulose		+	+	+	+
Succharose		+	+	+	+
Lactose		+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+
Inulin		-	-	-	-
Salicin		-	-	-	-

注: + 十分解 - 一分解せず

(5) R 型菌の生存期間

大体発育終了し増殖が停止した時期と思われる肝マブイオン 37°C, 72時間培養を密栓して 5~6°C に保存した O.R および H.R 株の生存期間は, 図 4 に示すように S 型菌より短かく, かつ O.R 株は H.R 株に比し早期に大多数の菌が減少するようである。(図 4 参照)

図 4 R 型菌の生存期間



注: 肝マブイオン 72時間培養終了時の生存菌数を 100% とした。

其の後の同様な実験においてもほぼ同様の傾向を示したが, 時には H.R 株が 5 カ月保存で菌の生存を認めない場合もあり, 生存期間が S 型に比し短いことは明らかである。しかしこれらの実験を通じ少数ではあるがかなり長期間生存する個体も認められるところから, 同じ R 型菌中の個々の菌により, 生存期間に関する限りかなりの差があるものゝようである。

なお長期保存のものから新たに培養した発育菌の形態は矢張り R 型を維持していた。

3. R 型菌の血清学的性状

(1) 交叉凝集反応

Clostridium chauvoei 各株間, S と R 型菌間および 2.3 の Clostridium 属菌との交叉凝集反応成績は, 表 4 に示すように

抗 O.S 血清と抗 H.S 血清は共に O.S と H.S 菌に対してそれぞれ高い凝集価を示し, 強毒株ではあるが R 型様集落を形成する西ヶ原株や, 強毒 S 型菌である 494 株に対しても高い凝集価を示している。一方 O.R と H.R 菌に対しては, 前述の S 型菌に比し低い凝集価を示し, 特に H.R 菌に対しては両血清共低い価を示した。

つぎに抗 O.R 血清と抗 H.R 血清は, それぞれの対照菌である R 型菌に対し, 前者は, 5, 120 倍, 後者は 640 倍と比較的低い凝集価を示した。

表4 交叉凝集反応成績

菌種	抗血清 菌液	<i>Clostridium chauvoei</i>						<i>Clostridium septicum</i>		Cl. H	Cl. N
		O.R	O.S	H.R	H.S	西ヶ原	494	449	広島		
Clostridium chauvoei	O.R	5120	40960	320	10240	10240	20480	160	160		
	O.S	40960	163840	0	81920	163840	81920	0	0		
	H.R	320	320	640	640	160	160	320	160		
	H.S	163840	163840	20	163840	40960	81920	0	0		
	西ヶ原	163840	163840	80	163840	81920	40960		0		
Clostridium septicum	494	0	0	0	0			20480			
	広島	0	0	0	0				10240		
Cl. H		0	0	0	0					10240	
Cl. N		0	0	0	0						10240

註: Cl. H=Clostridium histolyticum 数字は凝集価
Cl. N=Clostridium novyi

しかし抗 O.R血清の O.S菌に対する価は O.R菌に対する価よりも、はるかに高い 40,960 倍を示し、他の S 型菌 (494) および前述の西ヶ原株に対しても同様高い価を示した。

抗 H.R 血清は対照菌である H.R 菌に 640 倍、O.R 菌に 320 倍、其の他の S 型菌には 0~80 倍の低い価を示した。

このように凝集価の低いものは、動物側にその因があるのではないかと思ひ、さらに 2 頭の兎を免疫して抗血清を作り試験を繰り返したが、いずれも対照菌たる H.R 菌に対しては 640 倍で前回同様低い凝集価であり、H.S 菌に対する凝集価は、2,560 倍前後を示し、前記の抗 O.R 血清について述べたのと同傾向を示した。

これらの現象を逆に抗原の側より観察すれば、O.R と H.R 抗原はともに原株たる S 型菌の抗血清あるいは、他の S 型株および西ヶ原株 (R 型様集落、強毒株) 等の抗血清に対して、S 型菌に比し被凝性が低下しているようである。すなわち、O.R 菌は抗 O.S 血清に対し 40,960 倍であるのに O.S 菌は 163,840 倍であり、H.R 菌は抗 H.S 血清に対し 640 倍であるのに、H.S 菌は 163,840 倍であり、また他の S 型菌 494 株や、R 型様の西ヶ原株の抗血清に対し O.R 菌はそれぞれ 10,240 倍および 20,480 倍凝集価であるのに 494 株および西ヶ原株は自己の抗血清に対してそれぞれ

81,920 倍の価を示している。一方抗 R 血清に対しても、R 型菌自身よりも S 型菌の方がよく凝集する。

また R 型菌は家兎に対して凝集素産生能力が低下している。

要するに S 型菌に比し R 型菌は生体に対する凝集素産生能力や被凝集性が低下している。

つぎに他菌種との交叉凝集反応において、相対応するものはそれぞれ高い凝集価を示したが、Clostridium septicum との関係を見ると特に興味がある。O.R および H.R 菌が抗 Clostridium septicum 血清により凝集せられたので同様実験を数回繰り返したが、O.R および H.R 菌は低いながら常に凝集し、その被凝集性が確かめられた。もちろん Clostridium chauvoei 以外の Clostridium 属菌の免疫に用いた家兎は免疫開始前には、対応菌のみならず、O.R および H.R 菌に対して凝集素の検定を実施したが全く陰性であつた。

逆に Clostridium septicum は抗 O.R 血清および抗 H.R 血清によつては凝集されなかつた。

すなわち、変異菌 O.R 株と H.R 株は抗 Clostridium septicum 血清によつて凝集せられ、Clostridium septicum と一部共通抗原がありそうに見えたので吸収試験を行った。

(2) 吸収試験

表5 凝集素吸収試験

No.	吸 收 試 験															対 照				
	1			2			3			4			5			6	7	8	9	10
抗血清	O·S			O·R			H·S			H·R			C·S			O·S	O·R	H·S	H·R	C·S
吸収菌	O·S	O·R	C·S	O·S	O·R	C·S	H·S	H·R	C·S	H·S	H·R	C·S	O·R	O·S	C·S	非吸収血清				
菌液 (抗原)	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇	〇〇〇
10																				
20	±	#																		
40		#																		
80		#																		
160		#				#														
320		#	#			#											#	#	#	#
640		#	#			#											#	#	#	#
1280		#	#			#											#	#	#	#
2560		#	#			#											#	#	#	#
5120		#	#			#											#	#	#	#
10240		#	#			#											#	#	#	#
20480						#											#	#	#	#
40960																	#	#	#	#
81920																	#	#	#	#
Cont																	#	#	#	#

註 卍〜±凝集の強さを示す。Cont. 全(-), C. S=Clostridium septicum

吸収試験の成績を一括表示すると表5の通りである。

S型菌とR型菌は共に家兎でS型菌とR型菌に対する凝集素を産生する。そして抗S血清および抗R血清をそれぞれS型菌およびR型菌で吸収した結果、それぞれ吸収しきれない抗体が残つた(表中 No. 1, 2欄参照)。一方抗 Clostridium septicum 家兎血清中には O.R および H.R 菌を凝集する抗体が証明され、これは O.R 菌で吸収することが出来るので、O.R 菌は Clostridium septicum に対する共通抗原をもっていると思われる。それでS型菌の抗原の一部がR型菌では失われ、そのかわりに Clostridium septicum と共通抗原の一部を獲得したと想像される。それで次の実験を行つた。

O.R 菌で検定した凝集価2.560 倍の抗 O.R 血清を Clostridium septicum で吸収すると、O.R 菌に対する凝集価は 640倍に低下した。(表5, No.2 およびNo.7 欄参照)。また H.R 菌で検定した凝集価 640倍の抗 H.R 血清を、Clostridium septicum で吸収した血清は H.R 菌に対し 160 倍で陰性で凝集価は低下した。(表5 No. 4 およ

び No.9 欄参照)。このことは抗 O.R 血清および抗 H.R 血清はともに Clostridium septicum によつて少量ではあるがR型菌に対する凝集素が吸収されたことを示すもので、Clostridium septicum とR型菌とは抗原的に一部共通したものが存在することを示すものである。

しかし抗 Clostridium septicum 血清を O.R 菌で吸収すると O.R 菌では凝集しなくなるが、Clostridium septicum での凝集価はほとんど変わらない(表5, No. 5, 10欄参照)し、抗O.R血清ではClostridium septicum は凝集しない(表5 No.7 欄参照)から、R型菌では Clostridium septicum に対する共通抗原は確認出来なかつた。しかし交叉凝集反応で O.R および H.R 菌が抗 Clostridium septicum 血清により凝集されるのでR型菌に一部 Clostridium septicum に共通な抗原を有するのではなからうかとの推察もなされるが、これらの点は考察のところで若干ふれたい。

4. R型菌の病原性の変化

(1) O.S と H.S 株の病原性検査

S型菌の O.S と H.S 株を肝マブイオンで37

°C, 48時間培養したものをガーゼ濾過し, 肝片を除いた濾液を腹部皮下に接種した結果は, 毎時ほぼ一定した成績を示し, 0.1—0.2ml で大体致死の経過をとり, 各臓器, 皮下などから菌が常に回収され敗血致死を示している (表6参照).

表6 S型菌のモルモットに対する病原性

株	O・S									
	0.3		0.1		0.05		0.02		0.01	
接種量 ml	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
転帰	20時	24時	48時	30時	40時	40時		20時	40時	
菌回収	+	+	+	+	+	-		+	+	

株	H・S					
	0.3		0.2		0.1	
接種量 ml	-	+	+	+	-	+
転帰		30時	24時	24時		24時
菌回収		+	+	+		+

註: +20時間目死亡 (以下これに準ず)

表7 R型菌のモルモットに対する病原性

株	O・R				H・R			
	12	5	3	0.5	12	5	3	0.5
接種量 ml	-	-	-	-	+7日	+11日	-	-
転帰								
菌回収					-	-		

註: +7日, 接種後7日目死亡 (以下これに準ず)

表8 R型菌のモルモットに対する病原性

株	O・R					H・R				
	10	5	3	1	0.5	10	5	3	1	0.5
接種量 ml	+7日	+70時	-	-	-	+30時	-	-	-	-
転帰										
菌回収	-	-				-				

(2) O・RとH・R株の病原性検査

前記H・SやO・Sの場合と同様方法で実施したR型菌についての成績は, 表7, 8の通りである.

以上の成績から, R型菌では接種培養液量を基準にしてS型菌と比較すれば著しくその病原性の低下が認められる. すなわちS型菌培養液では, その0.2ml 前後で気しゅ痘死をするのに, R型菌では5~12ml でも耐過する場合も認められた. なお致死の経過をとつたものも諸臓器からの菌培養成績は陰性であり, 接種局所でさえ生存菌は認められない場合がほとんどであり, 接種後体内で菌の増殖は認められずすみやかに死滅するものゝようである.

R型菌接種で斃死したものゝ剖検変状は, 強毒S型菌の無菌培養濾液を大量接種した場合の毒素

死変状に極似している. すなわち, 肺の肝変様病変がそれであり, また経過の長いものでは, 接種部は腫脹, ついで硬結, 癩痕を形成し, 瘦削, 栄養不良を示している.

なおO・R株は継代103代, H・R株は128代まで肝マブイオン通過による復帰試験を実施した (図1) が, O・R株は70代, H・R株は100代まではともにR型集落のみであつたが, O・R株は100代, H・R株は124代でR型集落に混つて顆粒状, ピラミッド形あるいは, 不正レンズ状の集落が出現するようになった. しかしモルモットに対する病原性は復帰していなかつた.

またモルモット通過による復帰試験では病原性の所で述べたようにR型菌はすみやかに動物体内で消滅するので試験が出来なかつた.

5. R型菌の免疫原性

モルモットで行なつた免疫試験は表9で示すように, O・R菌培養の15ml 10ml 5mlあるいは2ml 接種の各群とも接種後2~3日間接種局部は拇指頭大の腫脹を来し, 皮下に血様漿液が滲溜して波動を呈するが, やがて消退し, その部は脱毛後癩痕を形成した.

H・R菌15ml 接種のもの2頭, 5ml 接種のもの2頭が斃死し, 他は耐過したが, いずれも局所に痂皮を形成した. これらの変化は病原性のところでのべたとおりであるが, また死亡したものゝ臓器からの菌の回収も陰性であつた.

たゞ例外として5ml 接種で死んだ1頭からは接種局所からR菌を回収した.

つぎに耐過生存したものに10~12日後S型の強毒菌芽胞2MLDで攻撃して耐過の有無を検査した. (表9)

O・R菌接種群は2ml 前処置の1頭が陽性死したのみで他は耐過した. なお対照の無処置群は5頭中4頭陽性死を呈した.

次にO・R菌の免疫原性を従来の気しゅ痘予防液と比較した (表10). すなわちO・R菌の肝マブイオン37°C, 24時間培養の10ml 5ml 3ml および1ml を, おのおの3頭ずつのモルモットの腹部皮下に接種したところ, 10ml 群と5ml 群の1頭ずつが斃死したほかは全部耐過した. 耐過し

表9 R型菌の病原性および免疫原性試験

株	O・R								H・R								対照
	15	10	5	2	15	10	5	2	15	10	5	2					
接種量 ml	15	10	5	2	15	10	5	2	15	10	5	2					
転帰 §	-	○	-	○	-	○	-	○	+	+	-	+	-	-			
菌回収									-	-	+	-					
強毒攻毒	強毒S型菌芽胞 2MLD 接種 (前接種処置台10~12日後)																
転帰	-	-	-	-	-	+	-		-	-			-	-			
菌回収						+								+			

註：* 5頭中4頭陽性死 ○は腫脹，癍痕形成

表10 R型菌および気しゆ痘予防液の病原性および免疫原性試験

接種区分	O・R								Vaccin Lot No. 16								対照
	10	5	3	1	10	5	3	1	10	5	3	1					
接種量 ml	10	5	3	1	10	5	3	1	10	5	3	1					
転帰 §	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-			
菌回収	-	-							-	-	-						
強毒攻毒	強毒S型菌芽胞 2MLD 接種 (前接種処置台10~14日後)																
転帰	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-			
菌回収						+	+	+									

註* 3頭共陽性死

§ 10—3 ccのもの癍痕形成を示した。

たものにS型の強毒芽胞液の2MLDを反対側の腹部皮下に接種して免疫原性の有無を観察し、同時に現行の気しゆ痘予防液注射モルモットとの比較を試みた。1ml接種群3頭中2頭、3ml接種群3頭中1頭陽性死した他は全部生存したが従来の予防液より免疫原性はやゝ劣るようである。

R型菌接種により斃死したものよりの菌検出は陰性であり、斃死の原因は毒素による中毒死とも考えられる。ホルマリン・ワクチン注射群にも、そのみで斃死した例があるので菌の産生物あるいは培地の刺戟が強すぎたことも考えられる。

IV 考 察

菌が程度の差こそあれ変異することは、あまねく知られている事実であり、このような現象は自然界において菌の生活環境を通じて絶えず行なわれているし種々の感作を与えて人為的に変異を起すことも可能である。

坂崎¹⁾はチフス様症状のもとに死亡した鶏より分離した *Salmonella* のH抗原について追求し、分離当初は未知の因子 (Zx) を有していたが、8

カ月を経て再検したところ、*Sal. essen* と同様な因子に変化し、吸収試験の結果も明らかに *Sal. essen* と一致し、その他の生物学的性状もほぼ一致したとのべこの8カ月後のものを、その抗血清加培地で培養すると、17代 (32日) にして該菌のH抗原を分離当初のものと同様なものに復帰せしめた。また標準 *Sal. essen* に同様操作でそのH抗原を鶏より分離当初のもの (Zx) に転換することが出来たとのべ、かくしてこの未知な (Zx) 因子は *Sal. essen* のもつ因子より変化したものであることを確認している。そしておそらく、もともと *Sal. essen* と同一構造であつたものが、動物体内で変異をしたのであろうとのべている。

村瀬²⁾らは、鳥、魚、豚より従来一般に認識されている豚丹毒菌を分離し抗原の性状等につき比較して血清学的に差があることを認めており、また同種類の動物からのものも必ずしも同じでない成績を得ており、川島と安藤³⁾も変異 *Brucella* 菌につき、その性状を詳しく報告している。これらは自然に認められた菌変異であるが、一方、人

為的に諸感作を加えて変異菌を作出した報告も多数ある。小川⁴⁾は Gartner 菌につき、その R 型出現は菌の発育に不都合な因子の存在が主要素のようであるとのべている。

一方嫌気性菌特に *Clostridium chauvoei* を人工的に変異させた報告はきわめて少く、たゞ、高沢⁵⁾はブドウ糖加ペプトン水に無水炭酸ソーダを 0.2% の割に加え、さらに鶏肝小片をこれに加えた培地 (PH 7.6) に本菌を 24—48 時間培養後普通寒天斜面に移植することによつてきわめてまれに好氣的に発育する菌株を得たという報告があるにすぎない。この変異株は毒力が次第に減退するが、復帰試験により復元するとのべている。

著者は、近藤と杉村⁶⁾が豚丹毒菌のアクリフラビン耐性無毒株をつくつた方法を応用して *Clostridium chauvoei* の弱毒変異株をつくることに成功した。すなわち S 型の O 株と H 株より、R 型の O.R 株、H.R 株をつくつた。この変異株は運動性や芽胞形成の減弱生存期間の短縮等がみられた。また H.R 株は牛乳凝固性が陰性で酵索性変化がみられ、菌の代謝の変化がうかがわれる。変異株では生存期間がはるかに短くなつたが、これは芽胞形成能の低下によるものであろう。しかし、なかにはまだ芽胞形成能のある個体も残存するようで、このような菌は相当長期間生存する。さらにイスラビン加培地を継代することにより、芽胞形成能が完全に消失するかどうか、今後の問題である。

血清反応において、小島⁷⁾は赤痢本型菌、異型菌、大原菌等について、S 型および R 型菌の抗原構造に関し、S R 変異の血清学的分類学的研究を行つた中で、志賀菌ならびに大原菌においては S.R 間に血清学的独立性を有し、また異型菌の S 型血清には R 型菌は凝集されないが、R 型血清には R 型のみならず S 型菌も凝集すること、ならびに S 型血清の R 型菌による吸収血清は型特異的になることなどを認め、沈降反応でもこのことを認めたとのべている。長田⁸⁾、城谷⁹⁾らも変異コレラ菌について、S.SR. R 型菌に共通抗原およびそれぞれ特異抗原のある事を認めている。

坂崎¹⁰⁾は *Sal. mikawashima* を人工的に変異せしめたものは、生物学的にも血清学的にも、*Sal. bareilly* あるいは *Sal. thompson* と全く區別出来ないものとなり、*Sal. mikawashima* は *Sal. bareilly* の変異菌であろうとのべている。

昆野と越智¹¹⁾は、*Clostridium chauvoei* について系統的に詳細な血清学的研究を行い、*Clostridium chauvoei* は血清学的にほぼ均一性であることをのべているか、著者も *Clostridium septicum* の S 型株についてしらべたところ、その事実を認めている。

著者の S 型菌から変異させた R 型菌は被凝集性が常に S 型菌より低い。それは R 型菌は運動性がほとんど認められないところから、あるいはべん毛消失のため、被凝集性が低下したのではないかと思われるが、べん毛については鏡検により検査してないのでこの点については、はつきりいえない。また R 型菌は抗 *Clostridium septicum* 血清に凝集するようになった。

さらに S 型菌と R 型菌とそれぞれ対応した血清で交叉吸収反応を行なうと、おのおの吸収しきれない 1 部を残す。このことは、S 型から R 型に変異したことによつて、S 型の抗原の 1 部が失われ、別の抗原を獲得したことを示す。すなわち抗 *Clostridium septicum* 血清に対し、S 型菌は凝集しないのに、R 型菌は凝集するようになり、抗 *Clostridium septicum* 血清を R 型菌で吸収すると R 型菌は凝集しなくなる。また抗 R 型血清を *Clostridium septicum* で吸収すると R 型菌の凝集価は低くなるので、変異により R 型菌は、*Clostridium septicum* との共通抗原をあらたに獲得したと思われる。

しかし抗 *Clostridium septicum* 血清を R 型菌で吸収したのちも *Clostridium septicum* の凝集価はほとんど変らないし、抗 R 型血清に *Clostridium septicum* は凝集しないので、この関係は今後検討すべき問題である。

しかし眞柄¹²⁾は Weinberg の実験を紹介し、*Clostridium chauvoei* 中には *Clostridium septicum* との両方の抗血清によつて凝集され

表11 交叉凝集反応

抗原 抗血清	S	R	C·S
S	●	●	○
R	●	●	○
C·S	○	●	●

註: C·S = Clostridium
septicum

● 凝集 ○ 非凝集

表12 吸収試験

吸収 抗血清	S	R	C·S
S	●	△	○
R	△	●	△
C·S	○	●	●

註: C·S = Clostridium
septicum

● 吸収 ○ 非吸収

△ 一部吸収

● 対R型抗体のみ吸収

る共通抗原をもつものがあるらしいと述べているし、またWeinberg および Mihalescoは抗Clostridium septicum血清はある程度Clostridium chauvoei の感染を防ぎ、両者は近縁関係にあり、また両菌種間には、中間種があるのではないかのべており、これらの菌が、どのような性質のものか詳細な点は不明であるが、著者の実験成績とくらべ興味深い。

以上の成績をわかり易く表示すると、表11, 12の通りである。

病原性については、変異菌の O.R 株, H.R 株とも、それぞれS型菌に比し、その低下が認められるが、この場合は、菌をその培養液と共にモルモットの皮下に接種して比較した場合であり、

Clostridium chauvoei 感染が実験的に成立し、動物を斃死または重篤な症状にいたらしめるためには、まず毒素の存在が重要な条件であることから、この毒素のために、組織がエ死に陥つた場合に菌の増殖を来たし感染が成立するようである。今、一定量の Clostridium chauvoei 培養液を菌体部と液体部に分け、洗滌した全菌と全培養液を別々にモルモットに接種した場合、洗滌菌接種群には感染が成立しない場合が多いのに、全培養液接種群は斃死する場合が多い。このようなことから菌量のみによる病原性の強弱比較は Clostridium chauvoei の場合適当でないことを別の実験で認めている。

今回報告の実験におけるモルモットに対する病原性検査の結果、R型菌接種の斃死モルモットの解剖所見や培養所見からR型菌がモルモット体内で増殖した傾向は認められないことから培養液中に産生された毒素による斃死と考えるべきであろう。

著者のみだR型菌接種動物の剖検変状は小島¹³⁾らが強毒 Clostridium chauvoei S型菌培養液中のアグレッションのみを大量接種した場合に斃死したものゝ剖検変状と同様であり、また培養液にホルマリンを加えて殺菌した死菌含有のホルマリン、ワクチンを大量接種した場合の斃死例に極似しており、R型菌接種モルモットの致死原因も、この培養液中の毒素によるものと思われる。しかもまれにR型菌接種後早期に斃死したものゝ接種局所から、接種菌を回収できた例もある。

近藤、杉村¹⁴⁾らが気しゅ痘ワクチンの研究報告でのべているように著者も別の実験で、気しゅ痘菌体ならびに無菌培養濾液とも免疫原性のあることを確かめている。しかし著者の試験の範囲内では、一定量の培養液に菌を培養したものにつき、菌体と培養濾液とに分けて、それぞれ免疫賦与力を比較した場合菌体は培養濾液(毒素)に比較してはるかに弱いことを認めた。

いずれにしてもR型菌接種モルモットにみられた免疫は、おそらく大部分この培養液中の産生毒素によると考えられる。従つてR型菌による生菌

免疫は死菌ホルマリン、ワクチン、または無菌アグレッション、ワクチンと類似の効力のものと思われる。

V 結 論

1. イスラビン加培地継代通過により、*Clostridium chauvoei* のS型菌よりR型菌が形成された。

2. 形態上R型菌は明らかにS型菌と相違しているが、生物学的性状ではほとんど相違を認めなかつた。たゞし牛乳凝固性において、変異菌のH.R株は異つた態度を示し、これを凝固しなかつた。

3. R型菌についての血清学的検査の結果次のことがわかつた。

(1) SおよびR型菌は共に共通抗原を有するがS→Rにより、R型菌はS型菌の抗原の一部を失い、あらたにS型菌で吸収されない特異抗原を獲得した。

(2) R型菌はS型菌に比し家兎に対しての抗体産生能力および被凝集性が低下している。

(3) R型菌は抗 *Clostridium septicum* 血清に対し、S型菌は凝集しないのに凝集する性質を保有するようになった。

この血清中のR型菌に対する凝集素はR型菌で吸収される。

しかしこの場合 *Clostridium septicum* の凝集価は、吸収前と大差はない。

(4) *Clostridium septicum* は抗R型血清で凝集されない。

しかし、この血清を *Clostridium septicum* で吸収すると吸収前に比しR型菌に対する凝集価は低下する。

4. R型菌はS型菌に比し、病原性は著しく減弱している。これを肝マブイオンで復帰継代培養したが病原性の復帰は認められなかつた。

5. R型菌生菌免疫能はS型菌ホルマリン死菌ワクチンの免疫能よりやゝおとる成績であつた。

文 献

- 1) 坂崎利一：日本獣医学雑誌，13：121—127，1951。
- 2) 村瀬信雄他：家畜衛生試験場水曜会記事，4：7，1955。
- 3) 安藤敬太郎他：家畜衛生試験場研究報告，28：55，1954。
- 4) 小川誠：日本細菌学雑誌，6：161，1951。
- 5) 高沢寿：台湾総督府獣疫血清製造所報告，1：1，1927。
- 6) 近藤正一他：日本獣医学雑誌，11：131—148，1932。
- 7) 小島仁郎：日本細菌学雑誌，2：1—3，1947。
- 8) 長田富香：日本細菌学雑誌，4：168，1949。
- 9) 城谷勝光：日本細菌学雑誌，4：169，1949。
- 10) 坂崎利一：日本細菌学雑誌，6：154，1951。
- 11) 昆野恒太郎他：日本獣医学雑誌，9：1—13，1930。
- 12) 真柄正直：嫌気性細菌学，168，1947。
- 13) 小島増造：中央獣医学雑誌，2月号：1925。
- 14) 近藤正一他：獣疫調査所研究報告，18：111—133，1940。

Studies on the Variation of *Clostridium chauvoei*

T. OHCHI

(National Institute of Animal Health, Hokuriku Branch Station, Kashiwazaki, Japan)

Cl. chauvoei appears in tissues and cultures as a straight, rounded rod measuring about 0.6 X 3-8 μ . It usually appears singly, and this fact is useful in distinguishing it from *Cl. septicum* and other anaerobic bacilli which frequently occur in materials suspected of blackleg which is similar to gasgangrene in human beings. *Cl. septicum* usually occur in long chains or in long filament. Spores are oval and appear eccentrically, swelling the rods into lemon-shaped structures. Very young cultures are motile by means of peritrichic flagella. It is strictly anaerobic and will not grow on ordinary glucose agar. The addition of blood or tissue makes ordinary broth and agar favorable for it. It grows well on all media made with a liver extract but not luxuriantly.

Deep colonies in tube agar are delicate and compact, being lens-shaped. In liver-liver

broth the fluid becomes moderately clouded. Gelatin containing a little serum is slowly liquefied, and a few gas bubbles are formed. Acid and gas are formed from glucose, levulose, galactose, maltose, lactose, and sucrose. Inulin, mannitol, glycerol, rhamnose, and dulcitol are not fermented. All strains produce antigen for agglutination, which is however not shared with *Cl. septicum*.

This organism exists in the soil, and when pastures or grazing grounds once contaminated with it, it will infect ruminants, susceptible to the disease especially cattle year after year. The disease seems to be a wound infection and to be similar to gasgangrene in human beings.

In rare cases, some strains form R type colonies in tube agar, which are very similar to those of *Cl. septicum*, and it is very difficult to distinguish them from *Cl. septicum* from the point of the shape of colonies, and the characters of R type is not clarified yet. Therefore, the author made a variant of *Cl. chauvoei*, R type, by means of serial passage through liver-liver broth added with acriflavin and compared the characters and pathogenicity between S type and R type strains.

1) Artificial variation of *chauvoei*.

Virulent strain Hokkaido (H) or Okinawa (O) was cultivated in liver-liver broth added with acriflavin at 0.01% for 72 hours at 37°C, thereafter a drop of cultivated broth was poured in tube agar. A deep colony in the tube agar was fished and inoculated in acriflavin-added liver-liver broth. Thus, the cultivation was carried out alternately and S type colonies varied to R type. In case of the strains O•R type, colonies of 30-80 generations of serial passage and in case of the strains H•R type, colonies of 50-110 generations were used for experiments. The former was named as O•R and the latter H•R.

2) Bio-chemical characters of R type organisms.

a) R type colonies of both strains are very similar to those of *Cl. septicum*, and the organisms occur in long filament like *Cl. septicum*.

Spores were not readily formed. The organism demonstrated a lesser degree of resistance to the heating and survived for a shorter in refrigerator than S type. Even young cultures became much less motile suggesting the loss of flagella.

b) There is no difference in fermentation of sugars between S type and R type, but only strain H•R lost its coagulability of milk.

3) Sero-reaction in case of R type.

Original strains O and H, and variant strains O•R and H•R were used for making antiserum by means of hyperimmunization against rabbits. In addition to these strains, *Cl. septicum* was used to prepare hyperimmunized serum to compare the antigenicity of both bacilli.

a) S type organisms (O and H) could not absorb the anti-R serum completely leaving a part of antibody unabsorbed. R type organisms showed similar results. Namely, it might be said that R type organisms lost a part of S type and was shared with other

antigen.

b) R type organisms showed a decrease of the ability in producing antibody in rabbit and of agglutinability in contrast to the S type organisms.

c) R type organisms showed the agglutination to anti-Cl. septicum serum, but not after absorption with R type organisms. However, the agglutination of Cl. septicum to homo-serum did not change before and after absorption with organisms. Anti-R type serum did not agglutinate Cl. septicum, but agglutination titer to R type decreased after absorption with Cl. septicum.

From the results mentioned above, it may be concluded that some antigens of R type organisms were shared with Cl. septicum instead of losing a part of antigens of the S type organisms.

4) Pathogenicity of R type organisms.

Although guinea pigs were easily infected by inoculation with 0.1 ml of liver broth culture of S type, most of guinea pigs inoculated with 10 ml of the culture of R type survived. The low pathogenicity of R type organisms did not recover by serial passage through favourable media.

5) Immunogenicity of R type organisms.

Guinea pigs immunized with 1-15 ml of the culture of R type organisms showed a complete resistance against challenge with 2 MLD of spores of virulent strain (O or H).
