

破傷風菌の分離に関する実験的研究

東邦大学医学部公衆衛生学教室

高柳満喜子 城川 美佳 海老沢 功

(昭和62年3月24日受付)

(昭和62年5月12日受理)

Key words : Isolation of *C. tetani*, Experimental mixture, GAM medium, Fildes's method

要 旨

Clostridium tetani の分離に関する報告は近年のものが少なく、古典的な方法が現在もそのまま用いられる事が多い。

C. tetani と他菌との混合培養により、実験的に分離方法の検討を行い次の成績を得た。

1) *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., group G, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* との混合培養の結果、材料の増菌培地としては、GAM 培地のほうが肝肝ブイオン、クックドミート、チオグリコレート培地より優れた成績が得られ、この際 *C. tetani* の生菌数が最大値を示す培養日数は2日であった。

2) Fildes の斜面分離法を *E. coli* との混合液で検討した結果、GAM 寒天は血液加ハートインフュージョン寒天、ハートインフュージョン寒天と同様の成績を示し、swarming の抑制はなかった。観察の容易さ、培地作製の簡便さからみても GAM 寒天斜面分離法は推奨しうる。

3) 分離用培地への1.0%以上の glucose 添加は *C. tetani* の swarming を抑制し、2.0%の添加は発育をも抑制した。従って Zeissler 培地は分離用培地として適当でない。

4) GAM 寒天を使用しても *Streptococcus* sp., group G, *C. perfringens* との混合時、*C. tetani* の swarming が抑制され、分離率が低下した。またこの分離率は *C. tetani* の接種菌数と相関した。適当な選択培地のない現在、*C. tetani* をより確実に分離するためには前もって十分な増菌を行うと共に、何本かの斜面培地を併用する必要がある。

序 文

破傷風の診断は通常臨床的に行われるため *Clostridium tetani* の分離は臨床材料よりもむしろ土壌、糞便など環境材料を使用した疫学的研究の立場から行われる事が多かった。したがってその分離方法の記載も近年のものは少なく、使用する培地、培養日数などもさまざまである。

しかしながらより確実に菌を分離する事は疫学的研究の方法として重要であるばかりでなく、血清学的診断方法の全くない破傷風の場合、臨床診

断を確実にするためにも意義有ることと考え、分離方法の再検討を行った。

特に環境材料からの *C. tetani* の分離では通常、材料を増菌培養し、その培養液から *C. tetani* を分離するという二つのステップがとられる。本研究ではこの各々について、実験的混合培養により培地、方法について検討し2, 3の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

混合培養実験には次の5菌株を使用した。*Clostridium tetani* ES242 (破傷風患者創傷より分離した教室保存株)、*Streptococcus* sp., group G,

別刷請求先：(〒143) 大田区大森西5-21-16

東邦大学医学部公衆衛生学教室

高柳満喜子

Clostridium perfringens (両菌株とも破傷風患者創傷より破傷風菌とともに分離した教室保存株), *Escherichia coli* NIH-JC2, *Staphylococcus aureus* 209P.

2. 使用培地

増菌培養実験には自家製肝肝ブイオン (基礎培地, ハートインフュージョンブイオン—栄研), GAM ブイオン, GAM 半流動高層培地 (日水), チオグリコレート培地 (栄研), クックドミート培地 (栄研) の5培地を使用した。生菌数の測定には *C. tetani* は GAM 寒天または gentamicin 加 GAM 寒天 (両者とも 3% 寒天), その他の通性嫌気性菌にはハートインフュージョン寒天を使用した。分離実験では GAM 寒天, ハートインフュージョン寒天, 5% 馬血液加ハートインフュージョン寒天および Zeissler 寒天 (10% 馬血液, 2% glucose 加普通寒天) を中試験管に 5ml 分注し, 長さ約 15cm の斜面として用いた。また一部の実験では GAM 寒天平板, ハートインフュージョン寒天平板による分離も行った。

3. 実験方法

1) 増菌培地の検討

C. tetani は肝肝ブイオンで 5 日間培養し, 60°C, 10 分間加熱後遠心洗浄し, 生食水に浮遊させたものを実験用菌液とし, 4°C で保存した。この菌株は実験に先立ち GAM ブイオンで 18 時間前培養し, 培地当りの接種菌量が $10^1 \sim 10^3$ /ml になるよう生食水で希釈した。その他の菌も前培養後生食水で希釈し, それぞれ等量の *C. tetani* 希釈液と混合, その 0.2ml を各増菌培地 10ml に接種し 37°C で嫌気培養を行った。嫌気培養は GAS pack 法 (BBL), または steel wool 法 (95% N₂, 5% CO₂ 環境) を用いた。培養 1, 2, 3, 5, 7 日後に生菌数の算定を行ったが, この際の酸素暴露を避けるため, 各増菌培養試験管は測定回数分用意し, 測定日ごとに分けて嫌気ジャーに収納した。

生菌数算定は平板希釈法を採用し, 形成集落数を計測した。*C. tetani* は混合した通性嫌気性菌の発育と *C. tetani* の swarming を抑制するため, gentamicin 加 GAM 寒天の寒天濃度を 3% に調製したものを用いた。混合した通性嫌気性菌は

ハートインフュージョン寒天培地で 37°C, 24 時間好気培養を行った。*C. perfringens* との混合培養実験では *C. perfringens* は GAM 寒天 (3% 寒天) で嫌気培養を行い形成集落数を計測したが, 混合した *C. tetani* の生菌数測定は *C. perfringens* との菌数の差が大きく, 同一平板上で計測が不可能なため, Fildes の方法¹⁾に従い, GAM 寒天斜面培地で *C. tetani* を分離し, Most probable number (MPN) により暫定的に生菌数を推定した。

2) 分離方法の検討

C. tetani の swarming を利用した Fildes の斜面法を検討した。培地の検討は *C. tetani* と *E. coli* との混合接種で行った。*C. tetani* の培養液はそれぞれ 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} /ml になるよう希釈し, 各希釈液に 10^8 /ml の *E. coli* 培養液を等量混合し, その 0.5ml を培地の項で記した 5 種の斜面培地の凝固水部分に接種, 48 時間嫌気培養し, 斜面上部に *C. tetani* の swarming が観察できたものを陽性とし, 斜面 10 本中の陽性本数を比較した。混合菌種による *C. tetani* 分離率の比較は GAM 寒天を使用し, 混合菌として *E. coli* のほか *Streptococcus* sp., group G (以下 group G *Streptococcus* と記す), *S. aureus*, *C. perfringens* を用い, 斜面培地の検討と同様 *C. tetani* 培養希釈液を各混合菌培養液と混合接種後培養し, 斜面 10 本中の *C. tetani* 分離陽性数を比較した。

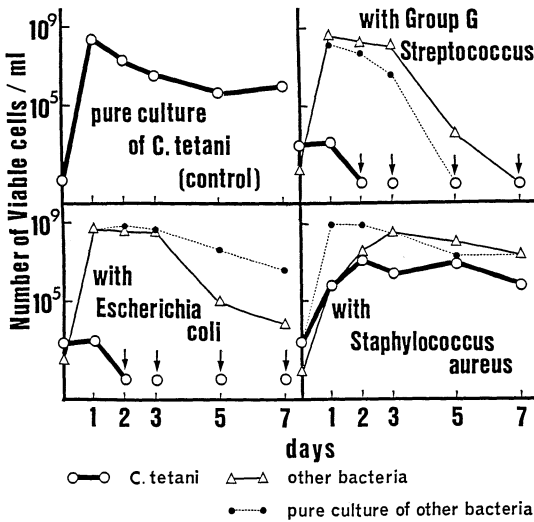
成 績

1. 増菌培養における *C. tetani* の消長

肝肝ブイオン (Fig. 1) で *C. tetani* を純培養した場合 10^1 /ml に接種された菌は培養 1 日で 10^8 /ml に増殖, その後徐々に減少して 5 日後には 10^6 /ml になった。グラフには示していないが, この 5 日後の値は 14 日後も変化がなかった。

group G *Streptococcus* と混合培養したときの *C. tetani* は 1 日目では接種時と同一菌数, 2 日目で降は全く菌の検出ができなかった。しかし混合培養した group G *Streptococcus* は培養 1 日で最大値まで増殖し, 2 日以降死滅期に入った。グラフには対照として group G *Streptococcus* を純培養した時の増殖曲線を点線で示しているが, *C. tetani* を混合培養した時の group G *Streptococ-*

Fig. 1 Growth of *C. tetani* in liver broth, when cultivated with other bacteria



C. tetani の増殖曲線は純培養した成績とほぼ同様であり、*C. tetani* の影響を受けていない。

E. coli との混合培養時も group G *Streptococcus* の場合と同様で、*C. tetani* の増殖は全く見られなかった。しかし *S. aureus* との混合培養では、*C. tetani* は純培養時に比べやや遅れるものの増殖がみられた。またこの際 *S. aureus* にも純培養時にくらべ増殖の遅れが観察された。

GAM ブイヨンでの実験では (Fig. 2) *C. tetani* 純培養時は肝肝ブイヨンと全く同様の増殖曲線が観察されたが、group G *Streptococcus*, *E. coli*, *S. aureus* のいずれの菌と混合しても、*C. tetani* は $10^5 \sim 10^7$ /ml に増殖しそのピークは培養 2 日であった。

GAM 半流動培地の成績 (Fig. 3) もほぼ GAM ブイヨンと同様であり、いずれの菌と混合しても *C. tetani* の増殖が観察された。なお今回の実験では、GAM ブイヨン以外は嫌気ジャーを必要としない培地であるが培地上部の酸素暴露部分を無くし嫌気性菌に対する培地有効体積を均一にするため、培養はすべて嫌気ジャーの中で行った。

チオグリコレート培地では、肝肝ブイヨンと同じく *E. coli* 混合時 *C. tetani* の増殖が全く見られなかった。group G *Streptococcus* 混合時は *C. tetani* の増殖が遅れたが、そのピークを示す培養

Fig. 2 Growth of *C. tetani* in GAM broth, when cultivated with other bacteria

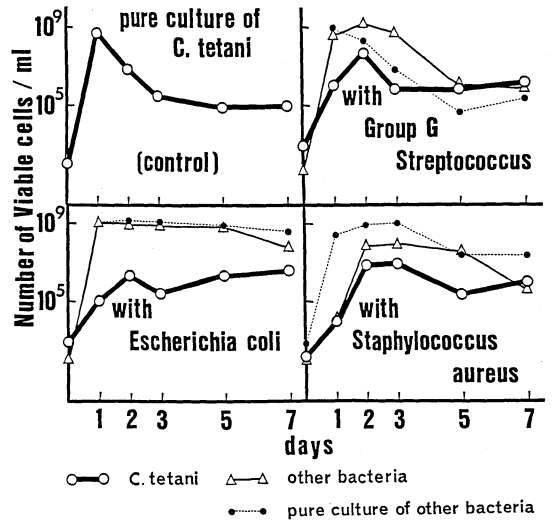
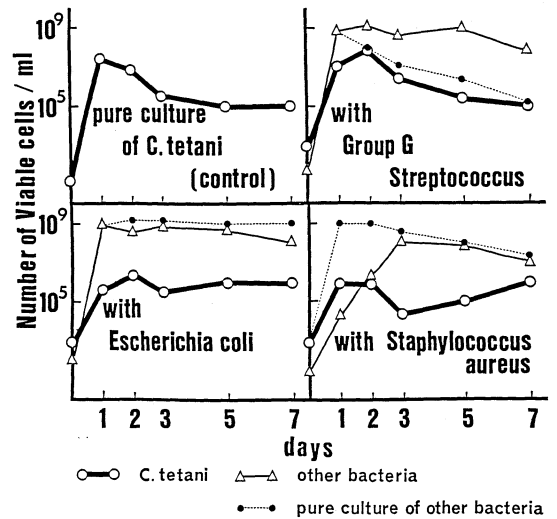


Fig. 3 Growth of *C. tetani* in GAM semisolid medium, when cultivated with other bacteria

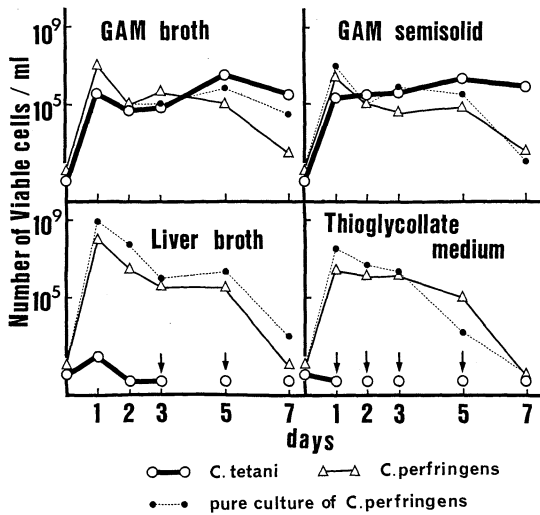


日数は 2 ~ 5 日と実験ごとに一定せず図示できなかった。

クックドミート培地ではいずれの菌と混合してもチューブにより非常に良い成績を示す場合と全く増殖しない場合があり、成績の再現性が見られずチオグリコレート培地と同様図示できなかった。

同様の増菌培地の検討は *C. perfringens* との混合培養についても行った (Fig. 4)。生菌数の算定

Fig. 4 Growth of *C. tetani* in 4 kinds of medium, when cultivated with *C. perfringens*



の項で述べたように両菌は同一平板培地で集落数計測が不可能なため、*C. tetani* については斜面分離し、MPN 法で生菌数を推定したが、斜面法は後の実験で示すように (Table 4), *C. perfringens* 混在時は特に問題があることが確認されたので *C. perfringens* との混合培養時のみをまとめて培地ごとに図示した。結果は *E. coli* 混合時と同様に GAM ブイヨン, GAM 半流動培地では *C. tetani* の増殖が見られたが肝肝ブイヨン, チオグリコレート培地では全く増殖が見られなかった。

2. 分離方法の検討

1) 斜面培地の検討

Fildes の原法では、ペプシン消化血液寒天斜面を使用しているが、今回は5種の斜面培地を用い、実験モデルとして *E. coli* を混合接種した (Table 1)。GAM 寒天とハートインフュージョン寒天では、*C. tetani* の最少接種量である 10^4 接種まで10本中10本とも *C. tetani* の swarming が観察された。血液加ハートインフュージョン寒天も同様に優れた成績であった。しかし Zeissler の培地では 10^5 接種しても陽性管は3本であり 10^4 接種では10本とも分離できなかった。

2) 培地中の glucose 濃度に対する影響

E. coli と混合時 Zeissler 培地で *C. tetani* の分離率が著しく減少した原因を究明するため glu-

Table 1 Comparison of the isolation rate of *C. tetani* from the experimental mixture with *E. coli*, employing four different kinds of slant media. The figures indicate numbers of positive tubes out of 10 inoculated tubes.

| Slant media | Initial inoculum of <i>C. tetani</i> (CFU/tube) | | | |
|---|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1.0×10^7 | 1.0×10^8 | 1.0×10^9 | 1.0×10^4 |
| GAM agar | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Heart infusion agar | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Heart infusion agar with 5% blood | 10 | 10 | 10 | 9 |
| Zeissler's agar (2% glucose, 10% blood) | 10 | 3 | 1 | 0 |

Initial inoculum of *E. coli*: 4.3×10^8 CFU/tube
Positive tubes were identified by the swarming colonies of *C. tetani* reaching the top of the slant medium.

Table 2 Influence of glucose on the isolation of *C. tetani* from the experimental mixture with *E. coli* on GAM agar slant medium. The figures indicate numbers positive tubes out of 10 inoculated tubes.

| Glucose concentration (%) | Initial inoculum of <i>C. tetani</i> (CFU/tube) | | |
|---------------------------|---|-------------------|-------------------|
| | 3.5×10^8 | 3.5×10^9 | 3.5×10^4 |
| 0 | 10 | 10 | 10 |
| 0.3 | 10 | 10 | 10 |
| 0.5 | 10 | 10 | 10 |
| 1.0 | 0 | 0 | 0 |
| 2.0 | 1 | 0 | 0 |

Initial inoculum of *E. coli*: 1.4×10^8 /tube
Positive tubes were identified by the swarming colonies of *C. tetani* reaching the top of the slant medium.

cose の影響を観察した (Table 2)。GAM 糖分解用半流動培地 (日水) の寒天濃度を1.5%に調製したものを基礎培地とし、glucose をそれぞれ0.3, 0.5, 1.0, 2.0%になるよう添加して斜面培地とした。*C. tetani* 希釈液は前実験と同様 *E. coli* と混合接種し、培養後分離率を検討した。結果は glucose 1.0%以上では *C. tetani* は全く分離できなかったが0.5%以下では影響はみられなかった。

さらに glucose 添加については *C. tetani* の純培養時についても検討した。ハートインフュージョン寒天に glucose を添加、平板とし、*C. tetani* 純培養希釈液をコンラージ塗抹培養し swarming と発育を観察した (Table 3)。glucose 添加量と

Table 3 Influence of glucose on the growth of *C. tetani* on heart infusion agar plate medium. The figures indicate numbers of positive plates out of 5 inoculated plates.

| Glucose concentration (%) | Initial inoculum of <i>C. tetani</i> (CFU/tube) | | |
|---------------------------|---|-------------------|-------------------|
| | 2.8×10^4 | 2.8×10^3 | 2.8×10^2 |
| 0 | 5 | 5 | 5 |
| 0.5 | 5 | 5 | 5(1*) |
| 1.0 | 5 | 5 | 3(1*) |
| 2.0 | 5 | 1 | 0 |

*The figures in parentheses indicate the number of positive plates on which only a few small colonies of *C. tetani* grew.

Table 4 Isolation of *C. tetani* from experimental mixture with other bacteria on GAM agar slant medium. The figures indicate numbers of positive tubes out of 10 inoculated tubes.

| Kind of bacteria (initial inoculum) | Initial inoculum of <i>C. tetani</i> (CFU/tube) | | | |
|---|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1.0×10^7 | 1.0×10^6 | 1.0×10^5 | 1.0×10^4 |
| Pure culture of <i>C. tetani</i> | 9 | 10 | 10 | 10 |
| With <i>E. coli</i> (5.5×10^8 CFU/tube) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| With <i>S. aureus</i> (5.7×10^8 CFU/tube) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| With group G <i>Streptococcus</i> (2.1×10^8 CFU/tube) | 9 | 8 | 5 | 0 |
| With <i>C. perfringens</i> (5.0×10^8 CFU/tube) | 9 | 5 | 2 | 0 |

Positive tubes were identified by the swarming colonies of *C. tetani* reaching the top of the slant medium.

C. tetani の発育は負の相関を示し、1.0%添加では 10^2 接種時5枚中3枚、2.0%添加では 10^3 接種しても1枚のみしか発育がみられなかった。また 10^2 接種時、0.5%と1.0%にそれぞれ1枚ずつswarmingの抑制された1~2個の単離集落のみが発育した平板が観察され、過剰のglucose添加は*C. tetani*のswarmingばかりでなく発育をも抑制することが示された。

3) 混合菌のswarmingにおよぼす影響 (Table 4)

分離培地の比較 (Table 1) で成績の良かったGAM斜面を使用し、増菌培地の検討で使用した4種の菌の培養液のおおのに*C. tetani*の希釈液を混合、斜面培地に接種した。*E. coli*および*S.*

Table 5 Isolation of *C. tetani* from the experimental mixture with group G *Streptococcus* or *C. perfringens* on GAM agar plate medium. The figures indicate numbers of positive plates out of 10 inoculated plates.

| Added bacteria | Initial inoculum of <i>C. tetani</i> (CFU/plate) | | |
|--|--|-------------------|-------------------|
| | 6.0×10^6 | 6.0×10^3 | 6.0×10^1 |
| Pure culture of <i>C. tetani</i> | — | — | 10 |
| With group G <i>Streptococcus</i> (1.4×10^6 CFU/plate) | 10 | 9 | 5(2*) |
| With <i>C. perfringens</i> (6.0×10^5 CFU/plate) | 9 | 5(3*) | 0 |

*The figures in parentheses indicate the number of positive plates on which a few small colonies of *C. tetani* grew.

—not tested

aureus 混合時は*C. tetani*純培養と同様、 10^4 接種まですべての斜面でswarmingが観察された。しかしgroup G *Streptococcus* および*C. perfringens* 混合時の分離率は低く、group G *Streptococcus* 混合時では*C. tetani* 10^3 接種、*C. perfringens* 混合時では*C. tetani* 10^5 接種でも、斜面10本中の5本のみが陽性であり、その陽性数はgroup G *Streptococcus*、*C. perfringens* いずれと混合した場合も*C. tetani*の接種菌量と相関した。

5) GAM寒天平板による分離 (Table 5)

斜面分離で成績の悪かった混合菌である*C. perfringens*とgroup G *Streptococcus*を用いて、通常の平板塗抹分離を行った。混合菌液 $10\mu\text{l}$ をGAM平板の1/4を残して3分画法でエーゼ塗抹し、*C. tetani*のswarmingまたは孤立集落を観察した。結果は斜面分離時と同様で、両実験菌の混合により明らかに*C. tetani*の分離率が低下した。またこれらの陽性平板のうちgroup G *Streptococcus*混合時の2枚と、*C. perfringens*混合時の3枚は、それぞれ1~2個の小集落によってのみ*C. tetani*の発育が確認できた平板である。

6) 土壌材料からの分離時におけるgentamicin (GM)加GAMブイオン効果 (Table 6)

教室保存の土壌材料について、増菌培地中のGM添加の効果を検討した。これらは海老沢らが報告した土壌材料のうち、50mg培養時に破傷風

Table 6 Effect of gentamicin in the enrichment medium, on the isolation of *C. tetani* from 16 soil samples*

| Isolation culture (GAM slant medium) | Enrichment culture (GAM broth) | |
|--|-----------------------------------|--------|
| | GM (+) | GM (-) |
| Number of positive samples | 8 | 6 |
| Positive | 2 of 2 tubes | 4 |
| | 1 of 2 tubes | 4 |
| Samples positive regardless of the presence of GM | 10 | |

*100mg soil sample inoculated

毒素のみが証明され菌の分離ができなかった14検体を含む16検体である²⁾。GMを25 μ g/mlになるように加えたGAMブイオンおよび非添加のGAMブイオン10mlに100mgの土壤材料を接種し、2日間増菌後その0.5mlをおのおの2本のGAM寒天斜面培地に接種、培養し*C. tetani*の分離を行った。*C. tetani*陽性検体数は増菌培地にGMを添加時には8検体、非添加時は6検体であった。さらにその陽性数のうちわけをみると斜面2本共陽性であったものはGM添加時には4検体、非添加時には2検体であり、1本のみ陽性のもはどちらも4検体であった。しかしGM添加時陰性で非添加時陽性のもが2検体あり、添加時、非添加時あわせて4本の斜面を使った時の陽性検体総数は10検体であった。すなわちこれらの土壤検体ではGM添加による*C. tetani*の選択効果は見られず、むしろ前述の斜面分離法の不確かさが実証された。なおこの実験では斜面分離と同時に3%寒天(GAM寒天)塗抹も試みたが、*C. tetani*の分離できた検体はまったくなかった。

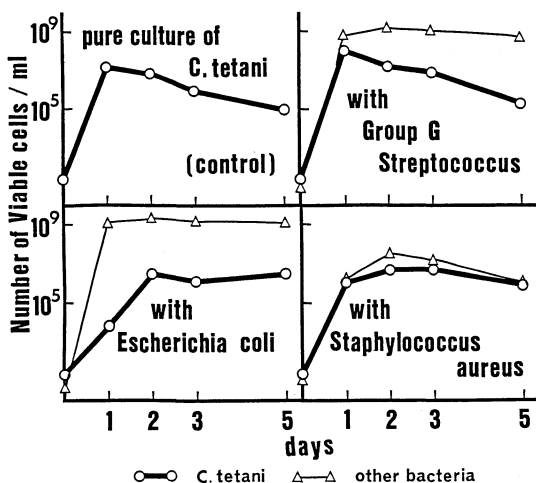
考 察

*C. tetani*は古くから様々な材料からの分離が試みられているが、近年の報告が少ないこともあり、肝肝ブイオンをはじめ、加熱血液ブイオン、血液ブイオン、クックドミート培地、チオグリコレート培地など古典的な培地を使用した成績^{1)~9)}が多く、教科書等に記載された方法にもそれらがそのまま継承されていることが多い^{10)~12)}。今回破傷風の疫学的研究を行うのに先立ち、現在嫌気性菌用培地として広く用いられているGAM培地

を中心として、破傷風菌分離のための基礎研究を行った。

破傷風菌は限られた臨床検体を除き、通常直接平板塗抹分離が困難なため、ブイオンで増菌後分離培養が行われる。しかし複数の菌種の混在する材料を非選択性のブイオンで培養した場合、果して目的の*C. tetani*の増菌が行われているか否かは疑問である。今回行った増菌培地の検討では、実験的に4種の菌をそれぞれ混合したが、肝肝ブイオンは混在する菌種によっては*C. tetani*の増殖を抑制することが示された(Fig. 1)。またクックドミート培地、チオグリコレート培地では成績の再現性が得られなかった。これに対しGAMブイオン、GAM半流動培地では混合実験のすべてで*C. tetani*が増殖し、増菌効果が認められた(Fig. 2, 3)。このことから他菌の混在する材料から*C. tetani*を分離する場合、古くから*Clostridium*の培地として定評のある肝肝ブイオン、クックドミート培地、あるいはチオグリコレート培地よりGAMブイオン、GAM半流動培地を使用したほうが優れた成績を得られるものと考えられた。増菌培養日数については研究者により報告が様々であるが、通常3日以上培養が行われている^{1)~8)}。しかし実験結果より(Fig. 2, 3, 4)、GAM培地を使用するかぎり培養7日までの観察で*C. tetani*が他菌の

Fig. 5 Growth of *C. tetani*, inoculated as a spore suspension, in GAM semisolid medium, when cultivated with other bacteria



増殖が遅れて増殖する¹⁰⁾という結果は得られず、2日間培養が適切であると考えられた。また今回の実験では、増殖ステージを揃えるため *C. tetani* は前培養後実験に供したが、材料中で芽胞を形成している可能性を考え、保存芽胞液のままの *C. tetani* を GAM 半流動培地で混合培養する実験を行った結果 (Fig. 5), 24時間後の測定ではすでに発芽による遅れは観察されず、混合培養時も前培養菌と同様の増殖を示した。Shoosmith らの嫌気培養条件では培養21分後50%の *C. tetani* の芽胞が発芽型芽胞になったという報告¹³⁾からも発芽に要する時間が混合培養における *C. tetani* の増殖に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。なお同じく *C. tetani* の増菌に用いられている血液ブイヨンについては今回検討していないが、培地作製の簡便さからいっても GAM 培地は推奨しうるものと考えられた。

分離方法としては、swarming を利用した Fildes の斜面法²⁾が分離確率が高く、純培養しやすいとされている。Fildes の方法は一般に原法のペプシン消化血液寒天の代わりに、血液寒天やチョコレート寒天斜面が用いられるが、実験的に *E. coli* を混合接種した場合の *C. tetani* の分離成績 (Table 1) では GAM 寒天斜面で優れた成績を得られることが確認できた。また血液の添加に関しては嫌気性菌には通常用いられない血液無添加のハートインフュージョン寒天でも GAM 寒天と同様の優れた成績を得、ハートインフュージョン寒天を使用する限り血液の添加は *C. tetani* の増殖に特に必要がないと考えられた。

Zeissler 寒天は4種の培地のうち最も分離成績が悪かった。Zeissler 寒天¹⁴⁾は栄養強化と培地の酸化還元電位を下げる目的で普通寒天に2%の glucose と10~20%の血液を加えたもので、おもに *Clostridium* の分離培地として用いられているが、*C. tetani* では、今回使用した嫌気培養法を用いる限り特に還元剤は必要とせず、1.0%以上の glucose 添加は *E. coli* と混合培養した時の *C. tetani* の swarming を抑制し、斜面分離率を著しく減少させ (Table 2), さらに2.0%の添加は *C. tetani* 単独平板培養時の増殖をも抑制し (Table

3), Zeissler 寒天は分離培地として適さないと考えられた。

GAM 寒天は *C. tetani* の swarming を抑制し、孤立集落を形成させると記された教科書¹²⁾があるが、少なくとも今回使用した菌株ではその現象はなく、他の教室分離株でも寒天濃度を1.5%に保つかぎり純培養で swarming の抑制された経験はない。さらに GAM 寒天は血液を加えた培地に比べ培地作製が容易であるばかりでなく、斜面上部における *C. tetani* の薄い膜状の増殖を観察しやすい利点をも持ち分離培地として適当であると考えられた。

しかしながら GAM 寒天を用いても混在する菌種によっては *C. tetani* の swarming が抑制され分離が成功しない可能性が示唆された (Table 4)。実際にわれわれは土壤材料の培養液中に破傷風毒素のみが証明され、菌の分離できなかった例をかなり経験している²⁾。今回4種の実験菌のうち group G *Streptococcus* と *C. perfringens* の混合時の *C. tetani* 分離率は明らかに減少した。その分離率は *C. tetani* の接種量と相関を示したが、GAM ブイヨンまたは半流動培地で増菌しても *C. tetani* の最大増殖値は $10^5 \sim 10^6$ /ml に留まる可能性は高く (Fig. 2, 3, 4), 少数の斜面培地での成績から増菌培養液中の *C. tetani* の有無を判断する事は危険であると考えられた。この両菌混合時の分離率の低下は通常の1.5% GAM 寒天平板に塗抹培養した場合 (Table 5) も同様に少数の swarming の抑制された孤立集落のみが得られた平板があったとはいえず、特に分離率の上昇はみられず、*C. tetani* のみを分離目的とする場合は平板法が斜面法より優れていると考えうる結果は得られなかった。

Clostridium の選択法としては材料の加熱の他、phenylethylalcohol やアミノグリコシッド系抗生物質の培地添加等が用いられるが、phenylethylalcohol は *C. tetani* の発育を阻止するので使用できない¹⁵⁾。加熱による選択は材料の汚染の高い土壤、糞便等で行われ、その加熱条件は様々であるが、真田ら³⁾は *C. tetani* の耐熱性と毒素産生能は負の相関関係を示すとして、毒素産生能の高い株を分離するために60°C、10分の加熱を薦めて

いる。しかし一般に無芽胞菌の死滅には60℃, 30分以上の加熱を必要とし, 60℃, 10分加熱後ブイヨン増菌しても, かなり多くの菌が残存増殖してくると考えられる。次に抗生剤による選択はまったく材料中の他菌の感受性に依存するものであるが, 土壌材料での分離実験では特に gentamicin による効果はみられなかった (Table 6)。しかしこの実験では結果として4本の斜面を使用したことにより斜面2本使用時の陽性検体数6検体 (GM非添加時), あるいは8検体 (GM添加時) を10検体に上昇させる事ができ, 前述の斜面分離法の不確実性を確認すると共に, この方法を採用する場合にはできるかぎり多くの斜面培地を用いる必要があることを実証できた。

今回われわれは *C. tetani* 分離方法の実験的検討として4種の菌を用い *C. tetani* と混合し増菌効果と分離成績を検討したが, 実際材料中に混在する菌は未知でありさらに多くの因子が影響すると考えられる。しかし今回の実験菌のうち group G *Streptococcus* と *C. perfringens* は破傷風患者の創傷分離株であり, 標準株を用いた他の2菌種についても破傷風創傷から分離しうる菌種であり¹⁶⁾, 実験的混合菌として適当であると考えている。分離方法についてはさらに検討中であるが, 有効な選択方法がない現在, 直接平板塗抹分離の困難な *C. tetani* の分離には肝肝ブイヨン, クックドミート, チオグリコレート培地などよりも GAM ブイヨンまたは GAM 半流動培地を用い2日間の増菌培養が有効であると考えられた。分離方法については GAM 寒天斜面培地を用いた方法が分離確率が高いが, この斜面法は混在菌によっては *C. tetani* の swarming を抑制する事が実証されたので増菌培養からの斜面分離には何本かの斜面を併用する必要があると考えられた。

文 献

1) Fildes, P.: Tetanus-I. Isolation, morphology

- and cultural reactions of *B. Tetani*. *British J. Exp. Pathol.*, 6: 62—70, 1925.
- 2) 海老沢功, 高柳満喜子, 倉田真理子, 城川美佳: 土壌中の破傷風菌の密度と分布. *感染症誌*, 60: 277—282, 1986.
- 3) Sanada, I. & Nishida, S.: Isolation of *Clostridium tetani* from soil. *J. Bac.*, 89: 626—629, 1965.
- 4) Beland, S. & Rossier, E.: Isolement et identification de *Clostridium tetani* dans le sol des Cantons de l'Est de la province de Québec. *Can. J. Microbiol.*, 19: 1513—1518, 1973.
- 5) Patel, J.C., Rao, S.S., Doshi, J.C. & Goodluck, P. L.: Presence of tetanus bacilli in health and disease., in *Proceedings of the First International Conference on Tetanus*, 1965.
- 6) Tenbroeck, C. & Bauer, J.H.: The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man. *J. Exp. Med.*, 36: 261—271, 1922.
- 7) Lowbury, E.J.L. & Lilly, H.A.: Contamination of the operating theatre air with *C. tetani*. *British Med. J.*, 237: 1334—1336, 1958.
- 8) Holmes, N.M., Smellie, G.D.: Tetanus: The potential for infection in the environs of a Glasgow Hospital. *Scot. Med. J.*, 11: 391—394, 1965.
- 9) 桜井信夫: 破傷風. *モダンメディア*, 14: 447—462, 1969.
- 10) 鈴木祥一郎, 上野一恵: 嫌気性菌 (日常検査シリーズ8), p. 37, 医学書院, 東京, 1974.
- 11) 小酒井望, 鈴木祥一郎 (編): 嫌気性菌と嫌気性菌感染症. p. 49—50, 医学書院, 東京, 1968.
- 12) 小沢 敦, 坂崎利一, 玉熊正悦, 波岡茂郎, 松本文夫 (編): 臨床細菌学 (講談社サイエンティフィック). p. 127—130, 講談社, 東京, 1977.
- 13) Shoemith, J.G. & Holland, K.T.: The germination of spores of *Clostridium tetani*. *J. Gen. Microbiol.*, 70: 253—261, 1972.
- 14) 村瀬光春: 嫌気性菌の検索 (臨床検査のコツシリーズ8), p. 43—44, 近代出版, 東京, 1983.
- 15) 二宮敬宇, 鈴木清明, 向坂 孝, 上野一恵, 鈴木祥一郎: Phenylethylalcohol 寒天培地による嫌気性菌の選択分離法. *メディアサークル*, 15: 447—482, 1970.
- 16) 中村 功, 大谷雅彦: 破傷風10例の細菌学的ならびに臨床的検討. *感染症誌*, 54: 78—83, 1979.

Experimental Study on the Method for Isolation of *Clostridium tetani*

Makiko TAKAYANAGI, Mika KIGAWA & Isao EBISAWA

Department of Public Health, Toho University School of Medicine

Classical techniques for the isolation of *C. tetani* appear even in the most recent textbooks, because few investigations have been made in this area in recent years. A reappraisal of the isolation methods of *C. tetani*, including the use of GAM (Gifu Anaerobic Medium), which is commonly used but hitherto unexplored for this purpose, appeared to be important in view of some conflicting results reported in the literature. The following cultural conditions were reappraised:

i) Media for enrichment culture and the duration of incubation, ii) media for isolation of *C. tetani* from the enrichment culture employing agar slant media, and iii) the recovery rate of *C. tetani* from the enrichment medium employing the optimal agar slant medium. As samples from which *C. tetani* is isolated usually contain other bacteria, we studied the isolation of *C. tetani* mixed experimentally with other bacteria, employing different media under several conditions. The following results were obtained:

1) The analysis of the growth curves of *C. tetani*, cultured simultaneously with *E. coli*, *Streptococcus* sp., group G, *S. aureus* and *C. perfringens*, revealed that GAM broth is the best medium as compared with the liver, cooked meat and thioglycollate broth media recommended by others.

2) GAM, blood and heart infusion agar slant media were equally useful for the isolation of *C. tetani* from the mixed culture with *E. coli*. There was no indication that GAM agar medium inhibited the swarming of *C. tetani*. The swarming colonies of *C. tetani* were more easily detected when the GAM agar slant was used than when the blood agar slant medium was used.

3) Glucose in the heart infusion agar medium inhibited the swarming of *C. tetani* at a concentration of 1%, and both growth and swarming of *C. tetani* were inhibited when the concentration of glucose was raised to 2%. In view of this finding, Zeissler's medium, which contains 2% glucose is not recommended for this purpose.

C. tetani failed to be recovered from samples mixed with *Streptococcus* sp., group G or with *C. perfringens*, even when GAM agar slant medium was used, when the dose of *C. tetani* added to the broth was not sufficiently large.

C. tetani must reach a certain level of density to be recovered from mixed cultures, and by means of plural, not a singular agar slant media. This is particularly important when clinical, soil and stool samples which are contaminated with an unknown number of bacterial species are subjected to isolation.
