

Studies on Clostridium sporogenes
II.Saccharolytic and Biological Properties of Two
Types of Clostridium sporogenes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7830

Clostridium sporogenes に関する研究II. 2群の *Clostridium sporogenes* の糖分解性状ならびに
生物学的性状について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

中 塩 哲 士

(昭和60年10月16日受付)

缶詰由来の *Clostridium sporogenes* I型菌 (*C. sporogenes* に特徴的な "Medusa head" のコロニーを形成する菌群)と, II型菌(不整形あるいは円形ボタン状で smooth 型のコロニーを形成する菌群)の鑑別性状を求めた。まず, 教室保存の *C. sporogenes* 30株と8種類の異なった基礎培地を用いて, 糖分解反応の術式, 判定基準を検討した。糖添加培地培養液と糖無添加基礎培地培養液との pH 差が 0.5 以上を判定基準 (Δ pH0.5 法)とした場合, いずれの基礎培地においても糖分解反応の陽性, 陰性の判定が容易であった。 Δ pH0.5 法の有用性は病原性クロストリジア 8菌種 175株において確認された。この事実に基づいて, Δ pH0.5 法により *C. sporogenes* I型菌, II型菌の糖分解性状を検討した結果, I型菌では全株がセロビオース分解陽性であったのに対し, II型菌では 41株中わずか 6株(15%)が陽性であった。*C. botulinum* A-190 に対して, I型菌全株が強い溶菌活性を示したのに対して, II型菌ではわずか 4株(10%)が溶菌活性を示したに過ぎなかった。また, 液体培地における増殖は I型菌は II型菌より明らかに良好であった。以上まとめると, *C. sporogenes* I型菌, II型菌の間には, コロニー性状, 耐熱性, 孢子形成能に加えて, セロビオース分解能, *C. botulinum* A-190 に対する溶菌活性および液体培地における増殖度に明らかな差異が認められた。

Ker words *Clostridium sporogenes*, sugar fermentation reaction, differential criteria, identification of clostridia.

前報¹⁾で著者は缶詰由来の *Clostridium sporogenes* がそのコロニー性状から 2群に分けられ, それぞれ I型菌, II型菌と命名し, これについて検討した成績を報告した。すなわち *C. sporogenes* に特徴的な "Medusa head" のコロニーを形成する菌株を I型菌とし, 不整形あるいは円形ボタン状で smooth 型のコロニーを形成する菌株を II型菌とした。II型菌は蛋白分解性 *Clostridium botulinum* と諸性状が酷似し²⁾, DNA-DNA 相同性試験においても区別し得ない菌群であった³⁾⁴⁾。I型, II型の菌群の間には, DNA-DNA 相同性で約 30%異なること, 耐熱性, 孢子形成能

に差異があることを前報¹⁾で明らかにした。本報においては, 糖分解能を含む生物学的性状の差異についてさらに検討を加えた。元来, *C. sporogenes* は糖を加えない基礎培地で増殖させた時, 著しく培地がアルカリ性に傾くこと, かつ用いた基礎培地の種類によってアルカリ性の度合に差のあることを経験しているのので, このような菌種に対して, 糖分解反応を正確に判定するには, 被験培地培養液と糖無添加基礎培地培養液とを対比させることが必要ではないかと考えた。この方法は他の *Clostridium* の糖分解反応の判定の際にも有効ではないかと考え, まずこの方法について詳細に検

Abbreviations: BBL, Baltimore Biological Laboratory; *C. bifermentans*, *Clostridium bifermentans*; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; *C. chauvoei*, *Clostridium chauvoei*; CDC, Center for Disease Control; *C. histolyticum*, *Clostridium histolyticum*; *C. septicum*, *Clostridium septicum*; *C. sordellii*, *Clostridium sordellii*; *C. sporogenes*,

討を試みた。

材 料 と 方 法

I. 使用菌株

前報¹⁾で報告した、缶詰由来の *C. sporogenes* I 型菌 (*C. sporogenes* に特徴的な “Medusa head” のコロニーを形成し、*C. botulinum* A-190 と約 70% の DNA-DNA 相同性を示す菌群) 21 株と、*C. sporogenes* II 型菌 (不整形型あるいは円形ボタン状で smooth 型コロニーを形成し、*C. botulinum* A-190 菌と 80% 以上の DNA-DNA 相同性を示す菌群) 41 株、および金沢大学医学部微生物学講座保存株で “Medusa head” のコロニーを示す *C. sporogenes* 30 株²⁾、病原性 *Clostridium* 8 菌種 175 株：第 I 群 (saccharolytic species); *C. septicum* (15 株), *C. chauvoei* (25 株), *C. perfringens* (20 株), *C. botulinum* E 型 (12 株), 第 II 群 (proteolytic and saccharolytic species); *C. sordellii* (26 株), *C. bifermentans* (21 株), *C. botulinum* A, B, F 型 (31 株), 第 III 群 (proteolytic but non-saccharolytic species); *C. histolyticum* (12 株), *C. tetani* (13 株)。

II. 糖分解試験用培地

ペプトン, 2% (W/V); 塩化ナトリウム, 0.5% (W/V); システイン塩酸塩, 0.05% (W/V); 寒天, 0.1% (W/V) (pH7.2) を基礎培地とした。ペプトンとして、以下のペプトンを用いた。ポリペプトン (大五栄養, 大阪), ポリペプトン S (大五栄養), プロテオースペプトン (大五栄養), バクトペプトン (Difco), プロテオースペプトン No.2 (Difco), フィトンペプトン (BBL), トリプテケースペプトン (BBL), GAM 糖分解用半流動寒天培地 (日水製薬, 東京) も基礎培地として用いた。

III. 糖分解試験

小試験管 (12×106 mm) 中の基礎培地 3 ml に、東洋濾紙 85 SB (東洋, 東京) を用いて濾過滅菌した糖を最終濃度 1% (W/V) になるように加えて、肝片加肝臓ピジョンで 16–18 時間培養した被験菌液 0.15 ml を接種した。ただし、エスクリン, イヌリン, サリシンは最終濃度 0.5% (W/V) に加えた。37°C にて一週間培養後、Zeromatic SS-3 型 pH メーター (ベックマン-東芝, 東京) で pH を測定した。

IV. 糖分解反応の判定

糖分解反応の最適判定基準を決定するために、教室保存の *C. sporogenes* 30 株を用いた。これらは特徴的

な “Medusa head” のコロニーを形成する菌株である。フルクトース, グルコースを分解陽性糖, ガラクトース, マンノースを分解陰性糖として用いた。Partridge らの方法³⁾により、ガスクロマトグラフィーを用いて、被験 30 株により前 2 者の糖は分解され、後 2 者の糖はまったく分解されないことをそれぞれ確認した。糖分解反応の判定に際して、従来は被験培養液 pH が 6.0 以下の値を示した時分解反応が陽性と判定された (以下最終 pH 6.0 法と呼ぶ)。これに対して本報では、糖添加培地培養液と糖無添加基礎培地培養液との pH 差が 0.5 以上の時分解反応が陽性とする方法を検討した (以下 ΔpH 0.5 法と呼ぶ)。ΔpH 0.5 法の詳細は成績の項に記述した。糖分解判定法の適否を判断するために、被験糖として病原性 *Clostridium* 属において、その分解性状が Bergey's manual of determinative bacteriology 第 8 版⁴⁾ (以下 Bergey's manual) において “d” と記載されている糖を検討した。“d” とは被験菌種の 11–89% の菌株が陽性の場合に用いられ、これに対して “+” は 90% 以上の菌株が陽性の場合、“-” は 10% 以下の菌株が陽性の場合に用いられる記号である。各菌株において、糖分解試験を同一条件下で 5 回繰り返して、5 回の測定の平均値で各菌種における糖分解性状を決定した。

IV. 生物学的性状の検討

1. 菌の増殖度

小試験管 (12×106 mm) 中の肝片加肝臓ピジョンで 37°C, 16 時間培養した菌液 0.5 ml を、2% (W/V) トリプテケースペプトン (BBL), 1% (W/V) 酵母エキス (Difco), 0.5% (W/V) グルコース, 0.5% (W/V) 塩化ナトリウム, 0.05% (W/V) システイン塩酸塩を含む培地 (以下 TYG 培地とする) 10 ml に接種し、37°C で培養し島津スペクトロニック 20 光電比色計 (島津, 京都) を用いて経時的に OD_{560nm} を測定した。

2. マイトマイシン C 感受性試験

中試験管 (17×165 mm) 中の 10 ml の TYG 培地に培養した対数増殖期初期 (OD_{560nm} = 0.10–0.15) の培養菌液に、マイトマイシン C (三共, 東京) を最終濃度が 1 μg/ml になるように加えて、経時的に OD_{560nm} を測定し、溶菌を起こしたものを感受性陽性とした²⁾。

3. *C. botulinum* A-190 (A 型) に対する溶菌活性
C. botulinum A-190 を TYG 培地を用いて、37°C で 18 時間培養した菌液 0.1 ml を、TYG 寒天平板培地に均等に塗布した。被験菌を TYG 培地において 18 時間培

Clostridium sporogenes; *C. tetani*, *Clostridium tetani*; DNA, deoxyribonucleic acid; MC, mitomycin C; OD, optical density; TYG, trypticase yeast extract glucose; VPI, Virginia Polytechnic Institute.

養した菌液の一金耳量を、上述の平板培地上にスポットして、37°C、48 時間水素ガス下で嫌気培養した。指示菌 *C. botulinum* A-190 に対する溶菌斑の形成の有無で、溶菌活性の有無を判定した。

成 績

I. *C. sporogenes* の基礎培地培養液の最終 pH

教室保存の *C. sporogenes* 30 株 (すべて "Medusa head" のコロニーを形成する) を各種基礎培地に 7 日間培養した際の平均最終 pH は使用したペプトンの種類により著しく異なり、ペプトンの種類により 2 群に分かれることがわかった (表 1)。すなわち、ポリペプトン S、バクトペプトンおよびフィトンペプトン (第 I 群) をそれぞれ加えた基礎培地培養液においては、平均最終 pH は著しく酸性に傾き、それぞれ 6.66, 6.69, 6.76 の値を示した。これに対して、プロテオースペプトン No. 2, ポリペプトン, トリプチケースペプトン, プロテオースペプトン (第 II 群) をそれぞれ加えた基礎培地培養液においては、平均最終 pH は逆にアルカリ性に傾き、それぞれ 7.18, 7.24, 7.29, 7.30 の値を示した。プロテオースペプトン No. 2 を加えた基礎培地培養液における平均最終 pH は 7.18 を示し、菌未接種基礎培地の pH (7.2) に最も近い値を示した。また、同一の基礎培地における菌株間の最終 pH の変動はプロテオースペプトン No. 2 基礎培地において最も小さく (最低 pH, 7.00; 最高 pH, 7.40)、逆にポリペプトン S 基礎培地において最も大きかった (最低 pH, 6.35; 最高 pH, 7.09)。

II. 糖分解反応の判定基準の検討

C. sporogenes 30 株を用い、フルクトース, グルコースを分解陽性糖, ガラクトース, マンノースを分解陰性糖の対照として、それぞれ 30 株全株陽性 (陽性率 100%), 30 株全株陰性 (陽性率 0%) と判定されるような判定基準を検討した。なお、用いた *C. sporogenes* 30 株において、これら糖の分解性状がそれぞれ完全に陽性あるいは陰性であることは、ガスクロマトフィーを用いて培地の被験糖量を測定することにより予め確認した (成績略)。

被験培養液の最終 pH が 6.0 以下を陽性とする従来からの方法 (最終 pH 6.0 法) で判定した場合、得られた成績は用いたペプトンの種類により著しく変動した (表 2)。プロテオースペプトン基礎培地, GAM 糖分解用半流動培地においては、全株ともフルクトース, グルコースの分解反応は陰性と誤って判定された。バクトペプトン基礎培地を用いた場合に最も良好な成績を示し、グルコースについては全株分解陽性、フルクトースについても 1 株を除いて全株分解陽性と判定された。その他のペプトンを用いた基礎培地においては相当数の菌種がフルクトース, グルコースについて分解陰性と誤って判定された。判定基準を pH 6.20 あるいは pH 6.50 に設定した場合もほぼ同様の成績を示し、特に相当数の菌株が、分解陰性であるべきガラクトース, マンノースについて分解陽性と誤って判定された。

続いて、糖を加えない基礎培地培養液と被験培地培養液との pH 差 (Δ pH) を糖分解反応の判定基準とし

Table 1. Variable final pH of 30 *Clostridium sporogenes* cultures in different basal media

Basal medium*	Source of peptone	Final pH of 7-day culture			Group***
		Minimum	Maximum	Mean pH**	
Polypeptone S (Daigo)	Soybean	6.35	7.09	6.66	I
Bacto peptone (Difco)		6.37	7.05	6.69	
Phyton peptone (BBL)	Soybean	6.33	7.06	6.76	
Proteose peptone No. 2 (Difco)		7.00	7.40	7.18	II
Polypeptone (Daigo)	Casein	7.01	7.49	7.24	
Trypticase peptone (BBL)	Casein	7.05	7.49	7.29	
Proteose peptone (Daigo)	Meat	7.07	7.49	7.30	
GAM (Nissui)	Meat	7.17	7.59	7.41	

* Basal medium includes the specified peptone at 2% (W/V).

** Mean pH = $\frac{\sum \text{final pH of 30 strains}}{30}$

*** See text.

Table 2. Evaluation of fermentation reaction of 30 *Clostridium sporogenes* strains by the conventional method*

Basal peptone medium**	Percentage*** of positive strains			
	Fru****	Glu	Gal	Man
Polypeptone S (Daigo)	87	73	0	0
Bacto peptone (Difco)	97	100	0	0
Phyton peptone (BBL)	43	33	0	0
Proteose peptone No.2 (Difco)	20	23	0	0
Polypeptone (Daigo)	70	93	0	0
Trypticase peptone (BBL)	70	50	0	0
Proteose peptone (Daigo)	0	0	0	0
GAM (Nissui)	0	0	0	0

* See text.

** Basal medium includes the specified peptone at 2% (W/V).

***% = $\frac{\text{Number of positive strains}}{\text{Number of strains tested (30)}} \times 100$

**** Fru, fructose; Glu, glucose; Gal, galactose; Man, mannose.

Table 3. Evaluation of fermentation reaction of 30 *Clostridium sporogenes* strains by the Δ pH 0.5 method*

Basal peptone medium**	Percentage*** of positive strains			
	Fru****	Glu	Gal	Man
Polypeptone S (Daigo)	100	97	0	0
Bacto peptone (Difco)	100	100	0	0
Phyton peptone (BBL)	90	83	0	0
Proteose peptone No. 2 (Difco)	100	100	0	0
Polypeptone (Daigo)	100	100	0	0
Trypticase peptone (BBL)	100	100	0	0
Proteose peptone (Daigo)	100	97	0	0
GAM (Nissui)	97	93	0	0

* See text.

, *, **** Refer to the footnotes of Table 2.

た場合、ペプトン培地の相違による成績の変動は著しく減少した。ΔpH の最適レベルを求めて、判定基準として ΔpH が 0.3, 0.5 あるいは 1.0 としたそれぞれの条件下で検討した。ΔpH が 0.3 を判定基準とした場合、いずれのペプトン基礎培地においてもフルクトース、グルコースについては全株が分解陽性と正しく判定されたが、分解陰性であるべきガラクトース、マンノースについて相当数の菌株が分解陽性と誤って判定された(成績略)。これに対して ΔpH が 1.0 を判定基準とした場合、いずれのペプトン基礎培地においても、ガラクトース、マンノースでは全株が分解陰性と正しく判定されたが、分解陽性であるべきフルクトース、

グルコースについて相当数の菌株が分解陰性と誤って判定された(成績略)。しかしながら、ΔpH が 0.5 を判定基準(以下 ΔpH 0.5 法と呼ぶ)とした場合、いずれのペプトン基礎培地においても偽陽性反応あるいは偽陰性反応がほとんどみられず、バクトペプトン、プロテオースペプトン No.2, ポリペプトン、トリブチケースペプトンをそれぞれ加えた基礎培地においては、フルクトース、グルコースでは分解陽性率が 100%、ガラクトース、マンノースでは分解陽性率が 0% を示し、糖分解反応の判定基準として pH 0.5 法が最も適していることがわかった(表 3)。

続いて ΔpH 0.5 法を用いて、まず病原性 *Clostri-*

Table 4. Re-evaluation by the Δ pH 0.5 method of fermentation characters of the sugars recorded as "d"

Species	Number of strains tested*	Sugar fermented by stated % of strain		
		$\geq 90\%$	11-89%	$\leq 10\%$
<i>C. sporogenes</i>	30	Maltose Sorbitol Sucrose Trehalose	Salicin	Rhamnose
<i>C. botulinum</i> types A, B, F	31	Maltose	Salicin Sucrose	Melibiose
<i>C. sordellii</i>	26	Fructose Ribose	None	Arabinose Raffinose Xylose
<i>C. bifermentans</i>	21	Fructose Mannose Ribose Sorbitol	None	Xylose
<i>C. perfringens</i>	20	Raffinose Ribose Trehalose	Inulin Salicin	Dulcitol
<i>C. botulinum</i> type E	12	Maltose Ribose Sorbitol Sucrose Trehalose	Inositol	Amygdalin Arabinose Galactose
<i>C. chauvoei</i>	25	None	None	Cellobiose Dulcitol
<i>C. septicum</i>	15	Esculin Galactose Ribose Salicin Trehalose	None	None

* Each strain was tested five times.

dium 7種の Bergey's manual において "d" と記載されている 42 の糖分解性状 (グリセロールを除く) について再検討した。各菌株について糖分解試験を 5 回繰り返して、その合計の陽性率を求め、Bergey's manual に準じて +, d, - で表示した。その結果、42 の糖性状のうち、36 の糖性状 (86%) は "+" あるいは "-" のいずれかに載然と整理され、同定の鑑別性状となり得ることがわかった (表 4)。このうち *C. sporogenes* においては 6 の糖性状のうちサリシンを除いてすべてが "+" か "-" に区分された。このことは用いた他の菌種、すなわち *C. botulinum* A, B, F 型, *C. sordellii*, *C. bifermentans*, *C. perfringens*, *C. botulinum* E 型, *C. chauvoei*, *C. septicum* においても観察された。なお、依然 "d" として残されたものについて、特に *C. sporogenes* においては被験 30 株全株が 5 回の試験のうち 1~4 回分解陽性を示した。すなわち "d" と判定された糖分解性状は、各菌種における菌株

間の相違によるものではなくて、むしろ strain instability (同一菌株において性状が不安定なこと) による場合が多いことがわかった。

III. *C. sporogenes* I 型菌, II 型菌の糖分解性状

以上の事実に基づき *C. sporogenes* の糖分解性状を検討した。まず、I 型, II 型菌からそれぞれ無作為に 10 株を選んで、32 種類の糖に対する分解性を検討した結果、セロビオース、シュクロース分解性において、I 型, II 型菌の間に差が認められたので、これらの 2 種類の糖に対する分解性を被験 62 株全株について検討した (表 5)。I 型菌と II 型菌とは互いにセロビオース分解性について顕著に異なった。すなわち、I 型菌 21 株全株が分解陽性であったのに対して、II 型菌 41 株中セロビオース分解陽性株はわずか 6 株 (15%) に過ぎなかった。このうち II 型菌においては孢子形成の認められた菌株 8 株中 5 株 (63%) がセロビオース分解陽性株であったのに対して、孢子形成の認められなかつ

Table 5. Cellobiose and sucrose fermentation of two types of *Clostridium sporogenes* isolated from canned foods

Colonial type	No. of strains tested	No. of cellobiose fermentation-positive strains (%)	No. of strains showing fermentation reaction of sucrose		
			—*	+	‡
I	21	21 (100)	3	14	4
II	41	6 (14.6)	2	5	34

* —, Δ pH (the pH difference between cultures with and without sugar) < 0.5; +, $0.5 \leq \Delta$ pH < 1.0; ‡, $1.0 \leq \Delta$ pH

Table 6. Lytic activity against *Clostridium botulinum* A-190 and mitomycin C susceptibility of two types of *Clostridium sporogenes* isolated from canned foods

Colonial type	No. of strains tested	Number of lytic activity* positive strains (%)	No. of strains (%) sensitive to Mitomycin C		
			‡**	+	—
I	21	21 (100)	4 (19.0)	14 (66.7)	3 (14.3)
II	41	4 (9.8)	16 (39.0)	3 (7.3)	22 (53.7)

* Lytic activity against *C. botulinum* A-190 strain. See methods section.

** ‡, OD reduction ≥ 0.20 ; +, $0 < \text{OD reduction} < 0.20$; —, no OD reduction.

た菌株では、33株中わずか1株(3%)がセロビオース分解陽性株に過ぎず、セロビオース分解性状と孢子形成との間に密接な相関がみられた。シュクロース分解については、I型菌21株中4株(19%)のみが分解強陽性を示したが、II型菌41検中34株(83%)が分解強陽性株であった。

IV. *C. sporogenes* I型菌, II型菌の生物学的性状

1. 増殖度

I型菌, II型菌からそれぞれ5株を無作為に選び、TYG培地における増殖度を比較した結果、I型菌はII型菌に比して明確に良好な増殖度を示した。すなわちOD_{560nm}の最高値はI型菌では約1.5を示したのに対して、II型菌では1.0以下であった(成績略)。両型菌とも培養2日目以降OD_{560nm}が著しく減少し、自己融解の著しいことがわかった

2. マイトマイシンC感受性

マイトマイシンC添加によりOD減少が認められた菌株(以下MC感受性株と呼ぶ)は、I型菌21株中18株(86%)、II型菌41株中19株(46%)であった。MC感受性株のうちでOD減少が0.20以上を示してMC感受性の高い菌株の割合は、I型菌においては18株中4株(22%)であったのに対して、II型菌においては19株中16株(84%)であった(表6)。

3. *C. botulinum* A-190に対する溶菌活性

被験62株全株について、*C. botulinum* A-190に対する溶菌活性の有無を検討した結果、I型菌全株とも*C. botulinum* A-190に対し強い溶菌活性を示したのに対して、II型菌ではわずか4株(10%)のみが溶菌活性を示した(表6)。なおこの4株のうち3株はセロビオース分解陽性株であった。

考 察

*Clostridia*の糖分解試験に際して、培養中にpH指示薬が還元、脱色されるために、これを予め培地に加えて培養途中のpH変化が観察できない、このために最終判定時の酸度のみに基づいて糖分解反応が判定されているが、特に蛋白分解性の強い菌種における糖分解成績が各研究者により著しく異なっているのが現状である。この原因として、使用培地、培養時間、培養法、判定基準などの諸術式が各研究者により異なっていることが考えられるが、最大の原因は培養最終pHがある一定のpH(通常pH6.0)以下を示した場合に分解反応陽性とする判定法にあると思われる。Bergey's manual⁹⁾には糖分解試験の術式、判定法は記載されていない。各菌種には標準株(reference strain)が同定の便宜のために設けられており、培養条件、判定法の

相違による混乱が避けられるように配慮されているに過ぎない。CDC Laboratory manual⁷⁾や VPI Anaerobe Laboratory manual⁸⁾ (以下 VPI manual) は被験培養液の最終 pH が 6.0 以下を糖分解反応陽性とみなすように推薦している。VPI manual は操作の煩雑な pre-reduced 法を使用しているが、pre-reduced 法は嫌気要求度の高い無芽胞嫌気性菌には確かに必要であるが、clostridia には必ずしも必要ではなく、むしろ培地の強い緩衝能のため pH 変化が表われにくく、分解能が弱い場合は分解反応陰性と判定され易い問題点がある。また Bergey's manual で用いられている "d" の代わりに、VPI manual においては糖分解性状の記載に "+", "-+", "-w", "w" などの記号を用いている。しかしながら、ある一定の pH 値以下を分解陽性とする従来からの判定では、ペプトンの種類や検討した菌種により、培地の酸性化あるいはアルカリ化の度合が著しく異なることから、正確な成績を得ることは困難であった。しかしながら、糖を加えない基礎培地培養液と被験培地培養液との pH 差が 0.5 以上を分解陽性の基準 (Δ pH 0.5 法) とした場合、多くのペプトン培地において糖分解反応を正しく判定できることが本研究において判明した。牛嶋ら⁹⁾も同様に pH 差に注目して、いくらかの無芽胞嫌気性菌を用いて pH 0.35 を判定基準としている。VPI manual⁸⁾においても従来からの方法によって判定が困難な場合には、基礎培地培養液と被験培地培養液との pH 差が 0.3 以上を判定基準とする様に記載されている。しかしながら多数の clostridia を用いた今回の検討において、 Δ pH が 0.3 を判定基準とした場合には誤って分解反応陽性 (偽陽性) と判定される菌株が相当数出ること、さらに各菌種について糖を加えない基礎培地を 2 本づつ用いた時、これらの培養液の間には最大 0.3 近い pH の違いがあったことから、clostridia においては糖分解反応の判定基準としては、0.3 あるいは 1.0 よりも 0.5 が適していると考えられる。*C. sporogenes* はいかなる糖も分解しないと佐々木¹⁰⁾、Winkle¹¹⁾、Zeissler ら¹²⁾は述べているが、近年の研究者¹³⁾¹⁴⁾は本菌がいくつかの糖を確かに分解すると述べている。これらの矛盾した成績は、異なる培地を用いて、特に一定の pH 値以下を分解反応陽性とする判定法を用いた場合には、容易に起こることと思われる。*Clostridium* 属においては、菌種により各性状は著しく異なっているので、Prévot ら¹⁵⁾は *Clostridium* 属を 10 属に区分しているくらいである。さらに各菌種においても菌株間に生物学的性状の著しい多様性がみられるが、このうち耐熱性と生化学性状の多様性に関しては著者の研究室からいくつかの報告がなされている^{16)~18)}。

Bergey's manual で "d" と記載されている 42 の糖性状は、従来は同定の鑑別性状としては実際上使用できないものであった。今回、多数の菌株を用い、糖分解試験を 5 回繰り返して、 Δ pH 0.5 法で再検討した結果、36 (86%) の糖性状が +、あるいは - に載然と判定され、新たに鑑別性状として用い得ることがわかった。以上のことから、clostridia の糖分解試験に際して Δ pH 0.5 法を判定基準とすることにより、不正確な判定をなくすとともに、遺伝学的に近縁な菌群の鑑別のための鑑別性状が得られることから、 Δ pH 0.5 法は clostridia の糖分解試験に有用と考えられた。

缶詰由来の *C. sporogenes* I 型菌、II 型菌の間には DNA-DNA 相同性で約 30% の差があること、および生物学的性状としてはコロニー形態、耐熱性、孢子形成能が異なることは既に報告した¹⁾。今回新たに増殖度、セロビオースおよびシュクロース分解性、マイシシ C 感受性、*C. botulinum* A-190 に対する溶菌活性などの性状が両型間で異なることを明らかにした。細菌の性状に関して、同一菌種でありながら、その由来場所、分離条件により分離菌株の諸性状が異なることについてはいくつかの報告がある^{16)~19)}。今回検討した *C. sporogenes* I 型菌、II 型菌はその分離された食品由来を異にする傾向がある。すなわち、I 型菌 21 株中、2 株 (10%) が獣肉由来、8 株 (38%) が魚肉由来の菌群であった。これに対して II 型菌 41 株中 18 株 (44%) が獣肉由来であり、魚肉由来株はわずかに 4 株 (10%) に過ぎなかった。貝、甲殻類、あるいは野菜、果物類からの分離率は I 型菌、II 型菌ではほぼ同程度であった。これらの食品を構成した動物、植物などの生物体を経由することにより、異なった菌型が選択されたものと考えられる。

孢子形成の認められた I 型菌全株、および II 型菌のうち、孢子形成の認められた 8 株中 5 株 (63%) がセロビオースを分解したのに対して、II 型菌のうち孢子形成の認められなかった 33 株においてはわずか 1 株 (3%) しかセロビオースを分解しなかったことから、セロビオース分解能と孢子形成能とは密接に関連しているように思われた。しかしながら *C. perfringens* においては孢子形成の認められない菌株にセロビオース分解陽性株が多いことから、この関係は菌種毎に異なるように思われた。なお、セロビオースと同様に β -glucoside 結合を有するエスクリン、サリシン分解能に関して、両型間に差がみられなかったことから β -glucosidase の有無ではなく、基質特異性に差があるものと思われた。

C. sporogenes II 型菌は、I 型菌よりも増殖度が不良で、培養 2 日目以降の自己融解が激しく、さらにマイ

トマイシン C に対する感受性が高く溶菌の度合の著しい菌株の割合が高かった。前報¹⁾において、*C. sporogenes* II型菌は I型菌に較べて、孢子形成は貧弱であるが、耐熱性の強い孢子を形成することを明らかにしたが、Anema ら²⁰⁾は *C. sporogenes* において、栄養型細胞の自己融解が激しい時に、耐熱性の強い孢子が形成され易いと述べているが、著者はこの点を確認した。以上のことから、*C. sporogenes* I型菌、II型菌は、コロニー性状、耐熱性、孢子形成能に加えて、セロビオース分解能、*C. botulinum* A-190 に対する溶菌活性、液体培地における増殖度などの生物学的性状において、互いに明確に異なる菌群であることを著者は明らかにした。

結 論

缶詰由来の *Clostridium sporogenes* I型菌 (*C. sporogenes* に特徴的な “Medusa head” のコロニーを形成する菌群) と、同II型菌 (不整形型あるいは円形ボタン状で smooth 型のコロニーを形成する菌群) の鑑別性状を求めて、糖分解能をはじめとする生物学的性状を検討した。この際に教室保存の *C. sporogenes* 30 株 (“Medusa head” のコロニーを示す) を用いて、糖分解反応の術式、判定基準についてまず検討し、さらに著者の新しい判定基準に基づいて 2 群の *C. sporogenes* の糖分解能を検討し、以下の結論を得た。

1. *C. sporogenes* 30 株の平均最終 pH は、用いたペプトンの種類により著しく異なった。したがって糖分解反応を判定する際に、最終 pH が 6.0 以下を示した場合を分解反応陽性とする従来の方法では、ペプトンの種類により成績は著しく変動した。これに対して糖を加えた場合と加えない場合の培養液の最終 pH の差 (Δ pH) を判定基準として、 Δ pH が 0.5 の場合 (Δ pH 0.5 法) に、いずれの基礎培地においても糖分解反応は正しく判定された。

2. この方法の有効性は、病原性クロストリジウム 7 種 180 株を用いて、Bergey's manual において “d” (11~89% の菌株が陽性) と記載されている 42 の糖分解性状を再検討し、確認された。このうち 36 (86%) の糖性状が同定に際して新たな鑑別性状となり得た。

3. この事実を基礎として、 Δ pH 0.5 法により、*C. sporogenes* I型菌、II型菌の糖分解性状を比較した結果、セロビオース、シユクロース分解能で差が認められた。I型菌においては 21 株全株がセロビオース分解陽性株であったのに対して、II型菌においては 41 株中 6 株 (15%) がセロビオース分解陽性株にとどまった。

4. *C. sporogenes* I型菌、II型菌の間に増殖度、マイトマシ C に対する感受性に差が認められた。また *C. botulinum* A-190 に対して、I型菌全株が強い溶菌

活性を示したのに対して、II型菌 41 株ではわずか 4 株 (10%) が溶菌活性を示したに過ぎなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った金沢大学医学部微生物学講座西田尚紀教授に心から感謝致します。また本研究の遂行にあたり終始御指導を賜った金沢大学医学部微生物学講座中村信一助教授はじめ微生物学講座各位、ならびに聖マリアンナ医科大学臨床検査医学講座中村正夫教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 中塩哲士: *Clostridium sporogenes* に関する研究 I. *Clostridium sporogenes* と蛋白分解性 *Clostridium botulinum* の DNA-DNA 相同性、細胞壁構成糖および抗原性状について。十全医会誌、(投稿中)
- 2) Kiritani, K., Mitsui, N., Nakamura, S. & Nishida, S.: Numerical taxonomy of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* strains, and their susceptibilities to induced lysins and mitomycin C. Jap. J. Microbiol., 17, 361-372 (1973).
- 3) Lee, W. H. & Riemann, H.: The genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. J. Gen. Microbiol., 84, 85-90 (1970).
- 4) Wu, J. I. J., Riemann, H. & Lee, W. H.: Thermal stability of the deoxyribonucleic acid hybrids between *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Can. J. Microbiol., 18, 97-99 (1972).
- 5) Partridge, R. D. & Weiss, A. H.: Extraction procedure for TMS carbohydrate ethers. J. Chromatograph. Sci., 8, 553 (1970).
- 6) Smith, L. Ds. & Hobbs, G.: *Clostridium*, p551-575. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 1974.
- 7) Dowell, V. R. Jr. & Hawkins, T. M.: Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. p96. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, 1974.
- 8) Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C. (eds.): Anaerobe laboratory manual, p79-106, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1974.
- 9) 牛嶋 彊・谷 悦子・鈴木祥一郎: pH メーター

- による嫌気性菌の糖発酵の判定法. 医学と生物学, 87, 149-154 (1973).
- 10) 佐々木茂雄: クロストリジアに関する研究. II. 土壌中のクロストリジア. 十全医会誌, 38, 191-264 (1933).
- 11) Winkle, S.: Mikrobiologische und serologische Diagnostik, p103. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1955.
- 12) Zeissler, J.: Anäerobenzuchtung, p115-116. In W. Kolle, P. Kraus und P. Uhlenhuth (eds.), Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 3te Auf., X. Gustav Fisher und Urban Schwarzenberg, Wien, 1930.
- 13) Smith, L. Ds.: The pathogenic anaerobic bacteria, p313-320, 2nd ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1975.
- 14) Willis, A. T.: Clostridia of wound infection. p254-261. Butterworth & Co., London, 1969.
- 15) Prévot, A. R., Turpin, A. & Kalaiser, P.: Les bactéries anaérobies, p1071-1097, Dunod, Paris, 1967.
- 16) Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M.: Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., 17, 303-309 (1969).
- 17) Nishida, S., Yamagishi, T., Tamai, K., Sanada, I. & Takahashi, K.: Effects of heat selection on toxigenicity, cultural properties and antigenic structures of clostridia. J. Infect. Dis., 120, 507-516 (1969).
- 18) Nakamura, S. & Nishida, S.: Reinvestigation of the relationship between sporulation, heat resistance and some biochemical properties in strains of *Clostridium perfringens*. J. Med. Microbiol., 7, 451-457 (1974).
- 19) Dolman, C. E. & Murakami, L.: *Clostridium botulinum* type F with recent observations on other types. J. Infect. Dis., 109, 107-128 (1961).
- 20) Anema, P. J. & Geers, J. M.: Controlling the sporulation on *Clostridium sporogenes* and the heat resistance of the spores. J. Appl. Microbiol., 36, 553-558 (1973).

Studies on *Clostridium Sporogenes* II. Saccharolytic and Biological Properties of Two Types of *Clostridium Sporogenes* Satoshi Nakashio, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., 94, 973-982 (1985)

Key words: *Clostridium sporogenes*, sugar fermentation reaction, differential criteria, identification of clostridia

Abstract

The present study was pursued to investigate the differential criteria between the umbonate and rhizoidal colony-forming strains (colony-type I) and the convex, circular and smooth colony-forming strains (colony-type II) of *Clostridium sporogenes* isolated from canned foods. At first, the optimal condition for evaluation of sugar fermentation reaction by clostridia was investigated by using eight different basal media and 30 strains of *C. sporogenes* (colony-type I) stocked in our laboratory. Sugar fermentation was correctly evaluated in any basal media by the Δ pH 0.5 method in which the pH difference of 0.5 between cultures with and without sugar was the critical level. The applicability of the Δ pH 0.5 method was confirmed by using 175 strains of eight species of pathogenic clostridia. All of the type-I strains of *C. sporogenes* fermented cellobiose, whereas only 6 (15%) strains of type-II did. All of the type-I strains showed strong lytic

activity against *C. botulinum* A-190 strain, whereas only 4 (10%) strains of type-II did. Growth in liquid media was more abundant in the type-I strains than in the type-II strains. From these results, the differential criteria between the two types of *C. sporogenes* from canned foods were as follows; cellobiose fermentation character, lytic activity against *C. botulinum* A-190 strain, growth ability in liquid media, in addition to the differences of colonial properties, heat resistance and sporulation frequency.