

Clostridium

absonumの分離とその培養及び生化学的性状について

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: 早瀬, 満 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8633

Clostridium absonum の分離とその培養 及び生化学的性状について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

早 瀬 満

(昭和51年4月23日受付)

先に, Nakamura, Shimamura, Hayase, Nishida は *Clostridium perfringens* 様菌種として *Clostridium paraperfringens* Nakamura, Shimamura, Hayase & Nishida 1973 を *species nov.* として提唱した。この時同時に, 著者が既に分離したまま, 分類学的位置を決めかねていた *C. perfringens* 様菌株について, 中村らと共に数値分類 (Numerical taxonomy) 及び DNA-DNA 相同性試験 (DNA-DNA homology) により, この菌群を *Clostridium absonum sp. nov.* として提唱した。この際, この菌群が *C. perfringens* と極めて似ているにもかかわらず, そのレンチネース活性が *C. perfringens* の A 型抗毒素血清で抑制され難い事及びマウスに対し毒性を示す事から, この菌群について, 更に分布, 生化学的性状, 毒性などについて検討する必要があると考え, このことについて検討した結果を本報で報告する。

実験方法及び材料

供試菌株: *C. absonum*; 前報¹⁾の数値分類実験に用いられたこの菌種の代表株 3 株, 即ち, *C. absonum* HA 7103, HA 7107, HA 9103 及び結果の項で述べる新分離法で分離した 20 株計 23 株を主として使用した。 *C. paraperfringens*; 前回¹⁾の実験で使用した 10 株, 即ち *C. paraperfringens* 3-1, 3-3, 9, 1W, 5, G, H, 2227, 7606, 12/16B を用いた。 *C. perfringens*; 教室保存の非加熱分離株 20 株と国立予防衛生研究所より分与を受けた *C. perfringens* type A PB6K N₅L₇ の計 21 株を使用した。

生化学的性状試験: Sterne, van Heyningen ら²⁾の記載に従って行った。更にゼラチン液化能は従来の方法より鋭敏な Virginia polytechnic Institute (U.S.A.) の方法³⁾も併わせ行った。 V.P.I. の方法は次の如くで

ある。 0.5% プロテオーゼペプトン (Difco), 1.0% 酵母エキス (Difco), 0.5% 食塩, 0.1% チオグリコール酸ナトリウム, 10% ゼラチン (pH. 7.2) を 5 ml ずつ中試 (16.5 × 165mm) に分注滅菌後, 肝片加肝臓パイオンで前培養した菌液 0.5 ml を植菌し, 嫌気ジャーで 37°C 3 週間培養後 1 時間 4°C に放置し, その後室温で試験管を逆にして内容物の落下時間を測定し, 植菌していない培地の落下時間の 1/2 以内で落下するものを陽性とする。ミルクの stormy fermentation を検討するために使用した培地は, 脱脂粉乳 20g を蒸留水 180 に溶解し 10 ml ずつ中試に分注し, 100°C 15 分 3 日間 3 回間歇滅菌し使用した。 DNA 相同性試験: Nakamura ら¹⁾の記載に従って行った。

毒素産性及びその活性の測定: 毒素産生用培地は Nishida ら⁴⁾のクックトミートブローを使用し, 7 時間 37°C 培養の培養濾液を原毒素とした。段階稀釈の毒素液 0.4 ml を 1 群 2 匹のマウスの尾静脈に静注し, 48 時間以内のマウスの生死を観察し 2 匹のマウスに対する MLD を求めた。同時にレンチネース活性を van Heyningen⁵⁾の方法によって測定した。

レンチネース活性と *C. perfringens* の A 型抗毒素血清との親和性: (1) in vitro の中和実験; 毒素液 0.4 ml に種々の濃度の *C. perfringens* A 型抗毒素血清 0.05 ml を加え 37°C 20 分反応させた後, 0.02M borate buffer pH 7.2 (含 0.1 M Ca⁺⁺) を加え総量を 1 ml とし Mitsui ら⁶⁾の記載に従って調整した卵黄液 2 ml を加え, レンチネース反応の結果起こる各管の混濁度を光電比色計 (島津スペクトロニクス 20) の波長 470 nm を用い 5 分毎 1 時間測定した。(2) in vivo の中和実験; in vitro と同様に毒素液 0.4 ml と種々の濃度の *C. perfringens* A 型抗毒素血清 0.05 ml を混合し 37°C 20 分反応させた後, 0.45 ml を 1 群 2 匹のマウスの尾静脈に静注し 48 時間以内のマウスの生

Isolation of *Clostridium absonum* and its cultural and biochemical properties Mitsuru Hayase Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University Director: Prof. S. Nishida).

死を観察し2匹のマウスに対するMLDを求めた。なおC.perfringensのA型抗毒素血清(550国際単位/ml)は千葉県血清研究所の製品を使用した。oxygen-labile hemolysinの産生とその活生の測定及びC.perfringens θ 抗毒素血清との親和性: oxygen-labile hemolysin産生用培地は3%(w/v)プロテオーゼペプトン(Difco)0.25%フラクトース,0.5%食塩,0.1%チオグリコール酸ナトリウム(pH7.4)を使用した。この培地で4代継代培養した菌液を0.1ml/10mlの割合で植菌し37°C7時間培養した培養濾液を原毒素とした。oxygen-labile hemolysinはPillemerら⁷⁾の方法に従って測定した。次に原毒素0.05mlに適宜稀釈したC.perfringensの θ 抗毒素血清0.1mlを加え室温に15分放置後、この混合液の残余のoxygen-labile hemolysin活性を測定し精製C.perfringensの θ 抗毒素血清との親和性をみた。なお、精製C.perfringensの θ 抗毒素血清(618単位/ml)は国立予防衛生研究所の村田良介博士より分与を受けた。C.absonumの毒素の精製:毒素産生用培地は次のものを使用した。プロテオーゼペプトン(Difco)3g,フラクトース0.25g,食塩0.5g,チオグリコール酸ナトリウム0.1g,FeSO₄·7H₂O,0.1mg,MnSO₄·7H₂O20mg,ZnSO₂·7H₂O0.6mg,MnCl₂·4H₂O0.4mg,Na₂HPO₄0.57g,KH₂SO₄0.14g,thiamine-2HCl0.1mg,pyridoxamine-2HCl0.1mg,nicotinic acid0.1mg,calcium-pantothenate0.1mg,pimelic acid0.1mg,riboflavin0.05mg,biotin0.005mg,蒸留水100ml(pH7.4)。この培地を6個の1ℓの三角フラスコに900mlずつ入れ滅菌後培養に用いた。前培養は同じ培地で37°C4時間4代静置培養を繰り返した。5代目の菌液9mlを900mlの培地に植菌し37°C7時間培養後、冷却遠心機で6,000rpm(4,000xg)15分間遠心しその上清⁵⁾400mlを原毒素とした。蛋白質の測定は牛血清アルブミンを標準とするLowryら⁸⁾の方法によった。hot-cold hemolysin活性の測定はPillemerら⁷⁾の方法によった。なお、レシチネース, oxygen-labile hemolysin, 致死活性の測定はそれぞれ前述の方法によった。毒素液の分画精製はMitsuiらの方法によった。操作はすべて4°Cで行い遠心は冷却遠心機で6,000rpm(4,000xg)15分間行った。なお精製の詳細は結果の項で述べる。

実験結果

1. C.absonumの新分離法 C.absonumのレシチネース反応がC.perfringensのA型抗毒素血清で抑制され難い事を利用し、C.perfringens及びC.paraperfringensから区別しえるかもしれぬと考えC.perfringensのA型抗

毒素血清が1, 2, 3, 6, 9国際単位/mlになるようにナグラー平板培地に加えて検討を行った所、表1に示す如く2国際単位/mlで三者を区別するに充分であった。又、この平板を用いる前の増菌用培地としてC.absonumがサリシンを即時分解するが他のclostridiaでサリシンを分解するものが少ない事を利用し、0.5%サリシン加プロテオーゼペプトン培地を使用した。新分離法は次の如くである。まず、小豆大の試料をサリシン加プロテオーゼペプトン培地に入れ37°C1晩培養した。泡のふいた管から1白金耳とりC.perfringensのA型抗毒素血清を2国際単位/ml含むナグラー平板に塗布し37°C1晩培養した。この際、もっとも混同されやすいC.bifermentansについてはラクトース加イオンを用いて、ラクトース分解陽性菌をとることでC.bifermentansの混入を殆んど避けることができた。ナグラー平板上でレシチネース反応が抑制されてない菌を釣菌しラクトース加イオンで1晩培養後、泡のふいた管から1白金耳とり、グルコース加血液寒天上に塗布し37°C1晩培養後C.perfringensのコロニー性状と同様の鉤状の緑色で溶血のあるコロニー(図1)を釣菌し常用の生化学性状試験を行った。この際、2%ゼラチン液化能とラフィノース分解の2項目を加えた。C.absonumの決定に際しては、サリシン即時分解、ラクトース分解陽性、ラフィノース分解陰性、C.perfringensのA型抗毒素血清でレシチネース反応が抑制され難い事(図2)、菌中が0.8~1.0 μ mである事の5点を他の菌群との鑑別点とした。上述の分離法で土壌からC.absonumの分離を試みた所、第1回は試料90のうち44即ち49%の試料に、第2回は試料45のうち23即ち51%の試料にこの菌を認めた。但し、同時に人糞便についても49試料について分離を試みたが1株も分離しえなかった。

2. DNA-DNA 相同性試験 これらC.perfringensと極めて似た新分離株が、C.absonumに一致するか否かをみるため無選択的にえらんだ新分離株3株(Amano-8 Maruhashi-3, Cpp-8)とこれらとC.absonum HA 7103, C.paraperfringens 2227, C.perfringens PB6KとのDNA上の相同性をしらべた。Amano-8, Maruhashi-3, Cpp-8はC.absonum HA 7103とそれぞれ76%, 80%, 90%と高い相当性を示したが、C.paraperfringens 2227とは31%, 29%, 28%と低く、C.perfringens PB6Kとは12%, 12%, 11%と更に低くC.absonumの記載と完全に一致し、新分離株はC.absonumに属することが確かめられた。

3. C.absonumの毒性とレシチネース活性及びC.perfringensのA型抗毒素血清との関係、上述の新分離法で得られた菌株から任意に26株を選び、その毒性を調べ

表1 ナグラー平板上における *C. perfringens* type A antitoxin によるレシチネース反応の抑制

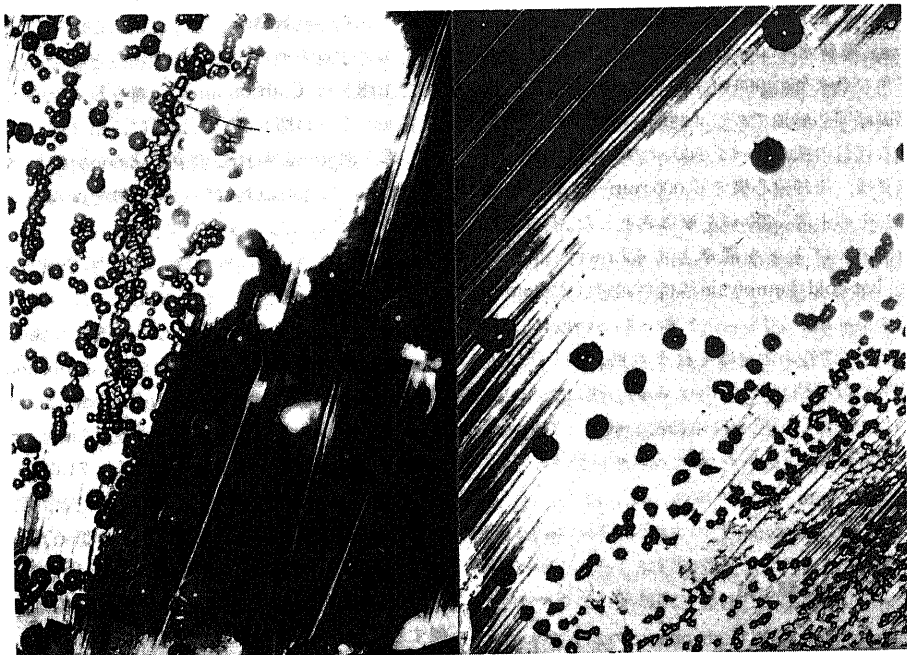
使用菌株	<i>C. perfringens</i> type A antitoxin in Nagler's plate (international units/ml)					
	0	1	2	3	6	9
<i>C. paraperfringens</i>						
2227	++*	+	+	±	±	-
3-1	++	+	+	-	-	-
H	++	+	+	+	-	-
<i>C. absonum</i>						
HA 7103	++	++	++	++	++	++
HA 9103	++	++	++	++	++	++
<i>C. perfringens</i>						
PB6K	++	++	+	+	-	-
S 008-1	++	+	-	-	-	-
S 7142	++	+	±	-	-	-
S 7137	++	+	±	-	-	-
S 7132	++	+	±	-	-	-

*++ : コロニー周囲にレシチネース反応陽性

+ : コロニー下にレシチネース反応陽性

± : コロニー下にかすかにレシチネース反応陽性

- : 完全にレシチネース反応なし



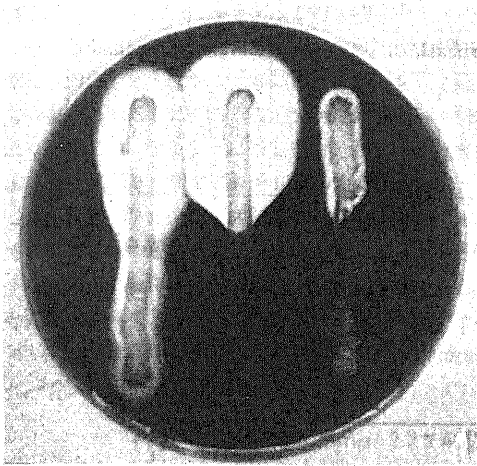
C. perfringens

S 003-3

C. absonum

HA 7103

図1 *C. perfringens* と *C. absonum* のコロニー
(1%グルコース加血液寒天上)



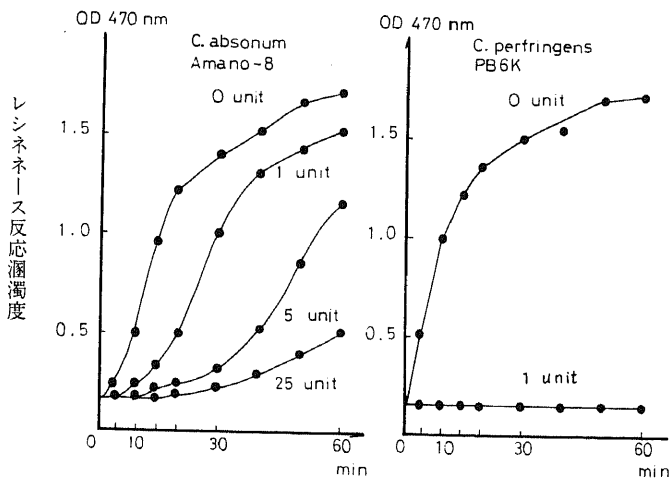
1 2 3

- 1 *C. absonum* HA 7103
- 2 *C. perfringens* PB6K
- 3 *C. paraperfringens* 2227

ナグラー平板下半分に *C. perfringens* の A 型抗毒素血清 (550 国際単位/ml) を塗布してある。

図2 ナグラー平板上における *C. perfringens* の A 型抗毒素血清によるレシチネース反応の抑制

た所18株に2.5~5.0MLD/mlの毒性があった。同時にレシチネース活性を測定した所0.3~6.9 Egg units (Eu) /mlの活性を示した。次いでこの *C. absonum* のレシチネース活性と毒性の *C. perfringens* A型抗毒素血清との関係を見た。まず, in vitro では *C. absonum* Amano-8 と *C. perfringens* PB6K を同時に培養し,そのレシチネース活性をそれぞれ4.6Eu/ml, 5.2Eu/mlとだいたい同程度に調整し使用した。結果は図3に示す如く, *C. absonum* Amano-8 は25単位の *C. perfringens* A型抗毒素血清を加えても,レシチネース活性は遅延しながらも認められた。しかし, *C. perfringens* PB6K は1単位の抗毒素血清の投与でそのレシチネース反応は完全に抑制された。*C. absonum* Amano-8 の他に7株 (HA 7103, HA 7107, Amano-3, P311, P317, P309, Maruhashi-3) の *C. absonum* についても全く同様の結果を得た。次にマウスを用いて毒性と *C. perfringens* A型抗毒素血清との関係を見た。結果は表2に示す様に *C. absonum* 5株と *C. perfringens* PB6K を用いた所 *C. perfringens* PB6K はその30MLD を1単位の抗毒素血清で中和しえたが *C. absonum* ではわずか1~2MLD を中和するのに2~4単位の抗毒素血清が必要であった。即ち, *C. absonum* のレシチネースは *C. perfringens* の A型抗毒素血清との親和性はほとんどなく, そのわずかな毒性を中和するには大量の *C. perfringens* の A型抗毒素血清が必要であることが確かめられた。



* : 加えた *C. perfringens* の A 型抗毒素血清単位 (国際単位)

図3 *C. perfringens* の A 型抗毒素血清による *C. absonum* と *C. perfringens* の培養液のレシチネース活性の抑制 (in vitro)

表2 C. absonum と C. perfringens の培養液の致死活性 レシチネース活性及び中和に必要な C. perfringens type A antitoxin の最小単位

Activities 10.4 ml	C. perfringens PB6K	C. absonum				
		Amano-8	Maruhashi-3	Kawai	Amano-5	Amano-6
(MLD)	30	2	1	1	0	0
(EU) Antitoxin equivalent #	-*	1.8	1.3	-	0.07	0.1
	1	4	4	2	-	-

* - : 実験せず

: 0.4 ml の培養液中の致死活性を中和するのに必要な C. perfringens A 型抗毒素血清の最小単位

表3 C. absonum と C. perfringens の OL-hemolysin 活性を中和に必要な C. perfringens の θ -antitoxin

C. perfringens θ -antitoxin units added	OL-hemolysin	
	C. absonum HA 7103 (3.7 OL-HU)	C. perfringens PB6K (79.8 OL-HU)
61	±	-
12	+	-
6	+	±
3	+	±
1		+

+ : 完全溶血
± : 不完全溶血
- : 溶血なし

OL-hemolysin : oxygen-labile hemolysin の略

4. C.absonum と C.perfringens の oxygen-labile hemolysin 活性と C.perfringens の θ 抗毒素血清との親和性, C.absonum HA 7103 と C.perfringens PB6K を同様に培養し, 両者の oxygen-labile hemolysin 活性を測定した所, それぞれ 74 hemolysin units (Hu) /ml, 1596Hu/ml であった。この両者の oxygen-labile hemolysin 活性を中和するのに必要な C.perfringens の θ 抗毒素血清の最小単位を求めた。結果は表3に示す如く C.absonum HA 7103 の0.05ml (含3.7 Hu) を中和するのに61 θ antitoxin units (θ -Au) 以上の θ 抗毒素血清が必要であり, C.perfringens PB6K の0.05ml (含79.8 Hu) を中和するには6 θ -Au 以下の θ 抗毒素血清で充分であった。即ち, C.absonum の oxygen labile hemolysin を中和するには C.perfringens の oxygen-labile hemolysin (θ 毒素) を中和するのに必要な θ 抗毒素血清の約 340 倍以上の θ 抗毒素血清が必要な事が確かめられた。

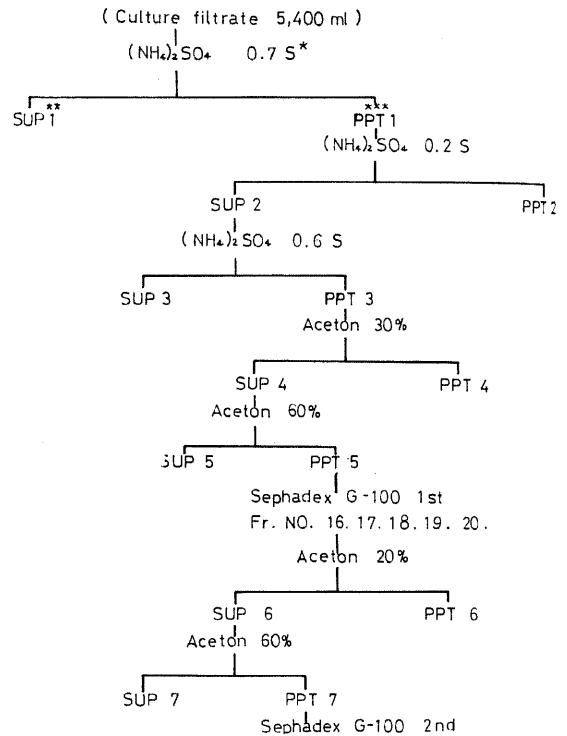


図4 C. absonum の毒素の精製法

S* : Saturation の略
SUP** : supernatant の略
PPT*** : precipitate の略

5. C.absonum のレシチネースの精製・C.absonum の毒性が弱いながらもレシチネース活性と比例するように見え, かつ in vivo で C.perfringens の A 型抗毒素血清と親和性が弱いながらも中和される傾向を示したので C.perfringens の α -toxin における如くレシチネース活性と毒性が一致するか否かを見るため C.absonum HA

7103 の毒素の分画精製を試みた。まず、原毒素 5,000 ml を出発材料とし精製法は図 4 に示す如く行った。即ち 5,400 ml に 0.7 飽和になるように粉末硫酸をスターラーで攪拌しながら加え 30 分放置後遠心分離して PPT1 を得た。PPT1 を生食水 140 ml に溶解し硫酸を 0.2 飽和になるように加えて PPT2 を遠心分離で除き、その SUP2 に 0.6 飽和になるように硫酸を加えた。30 分放置後遠心分離で PPT3 を得てこれを 40 ml の生食水に溶解した。これにスターラー攪拌下 30% 飽和になる様に冷アセトン を滴下し直ちに遠心分離し得た SUP4 にさらに冷アセトン を滴下し最終 60% 飽和にした。30 分放置後遠心分離し PPT5 を得てこれを 14 ml の生食水に溶解した。このアセトン分画によりほとんどの oxygen-labile hemolysin

活性は除去された。この PPT5 を Sephadex G-100 上に充填し 0.02M borate buffer pH7.1 (含 0.003M CaCl_2) にて溶出した。フラクションナンバー 13 番に oxygen-labile hemolysin 活性ピークが認められ、Hot-cold hemolysin 活性、レンチネース活性、MLD のピークは 18 番にあった。即ち、oxygen-labile hemolysin 活性と 3 つの活性は分離され、そして 3 つの活性が同一画分にある事が確かめられた。さらにレンチネース活性等の高い部分 16 番から 20 番を集め次の操作を行った。わずかに混在する oxygen-labile hemolysin 活性を除去する目的で、冷アセトン を 20% 飽和になるように滴下し PPT6 を直ちに除去しその SUP6 にさらに冷アセトン を滴下し最終 60% とした。30 分放置後遠心分離し PPT7 を得た。

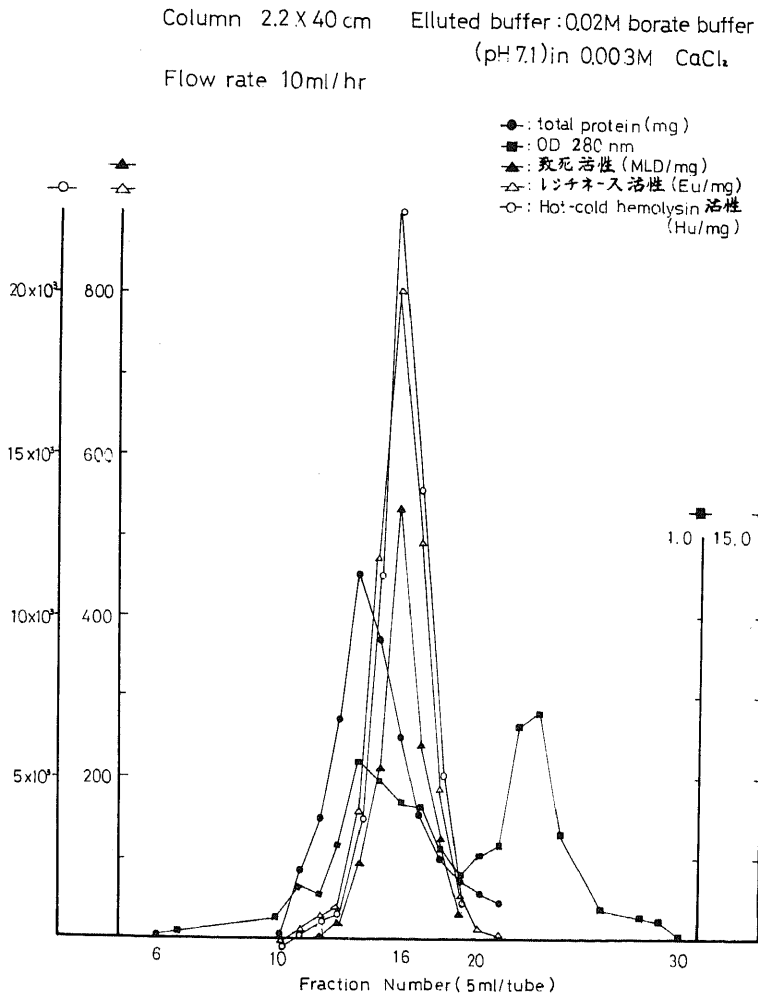


図 5 Sephadex G-100 Gel Filtration of PPT-7

表4 C. absonum HA 7103 の毒素の精製

Fraction*	Hot-cold 溶血活性		レシチネース活性		致死活性	
	HU/mg	比活性	EU/mg	比活性	MLD/mg	比活性
Starting material	6.0	1	0.24	1	0.16	1
PPT-1	260.0	63	11.7	48	6.3	40
PPT-3	545.5	90	24.0	100	11.4	73
PPT-5	1,290.0	215	60.0	250	30.8	200
PPT-7	5,208.0	766	231.6	965	122.6	786
Sephadex G-100						
Fr. NO. 16	22,400.0	3,733	800.0	3,333	534.0	3,423

* Fraction: 図4 参照

表5 C. absonum と C. perfringens と C. paraperfringens の生化学的性状の相違点

生化学的性状	陽 性 株 数		
	C. paraperfringens (10株) #	C. perfringens (20株) #	C. absonum (21株) #
サ リ シ ン	10	4*	21
セロビオース	10	3*	21
ラフィノース	0	20	0
イノシトール	0	20	0
メリビオース	7	19	0
ス タ ー チ	7	20	0
トレハロース	0	16	20
ゼラチン液化能			
2%	0	20	21
10%	0	20	5
10% (VPI)	0	20	21
ミルクのStormy fermentation	0	19	16

: 使用株数

* : 遅延分解

この操作で若干混在していた oxygen-labile hemolysin は完全に除去された。この PPT7 を 4 ml の生食水に溶解しゲル濾過を先と同様の条件で行った。結果は図5に示した。先の結果と同様にレシチネース活性, Hot-cold hemolysin 活性, MLD のピークは完全に一致した。即ち, 16番に3者のピークがあり, それぞれ比活性は3,733倍, 3,333倍, 3,423倍となった。又, 表4に示す如く各段階における3者の比活性が平行してい

る事からも併わせ考え C. absonum の毒素は C. perfringens の α 毒素の如く, 極めて分離し難く同一分子に3つの作用を有すると思われる。

6. C. absonum, C. perfringens, C. paraperfringens の生化学的性状の再検討, 前述の C. absonum の新分離法で分離された中から21株を選び, C. perfringens 20株, C. paraperfringens 10株を使用し生化学的性状を比較検討した。結果は表5に示した。表に示す如く C. absonum がラフ

ィノース、イノジトール、メリビオース、スターチ分解陰性及びサリシン、セロビオース分解陽性の6点が *C. paraperfringens* との鑑別に有用であり、*C. absonum* がトレハロース分解、ゼラチン液化能、ミルクの stormy fermentation 陽性及びメリビオース、スターチの分解陰性の5点が *C. paraperfringens* との鑑別に有用である事が確められた。

考 察

C. absonum が土壤材料に約50%も分離されるほど広く分布する菌群であること、かつ、この菌は *C. paraperfringens* と極めて似ているが、その毒性が *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清によって中和され難いことから実際の臨床ケースに際しては *C. paraperfringens* との鑑別に慎重をきすことが望ましい。最近、近藤ら⁹⁾ はエンテロトキシン血症の牛の十二指腸内容物より *C. paraperfringens* に似て、そのA型抗毒素血清に殆んど中和され難く毒性をもった菌の分離を報告しているが、その後この菌が *C. absonum* であることが判った¹⁰⁾。次に *C. absonum* の同定に際しては *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清2国際単位/mlを加えたナグラー平板上で、そのレシチネース反応が中和され難いことを重視すべきと述べた。しかし、in vivo では過剰の抗毒素血清の投与でマウスの死を防ぐことができるというやや矛盾したような結果を得た。これは全く *C. absonum* のレシチネース活性と *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清の量的な問題であると考えている。即ち、*C. absonum* はナグラー平板上に含まれる抗毒素血清量が2国際単位/ml程度では、そのレシチネース反応が抑制され難い菌種であるがもっと多量の抗毒素血清をナグラー平板中に含ませればそのレシチネース反応は結局抑制されうる菌種であると思われる。次にこの *C. absonum* と *C. paraperfringens* 及び *C. paraperfringens* の生化学的性状の相違点を述べたが、Nishida ら¹¹⁾ は *C. paraperfringens* を土壤や人糞便等の試料から分離する際、種々の条件で試料を加熱するとその加熱条件によって生化学的性状に相違点を認めると述べた。又 Nakamura ら¹²⁾ も *C. paraperfringens* のサリシン、セロビオース、イノジトール等の糖分解性状が試料から *C. paraperfringens* の分離の際の加熱条件で異なると述べた。従ってこれらの糖分解性状は鑑別点としてすすめられない。この点を考え3種の菌群の鑑別点としては *C. absonum* がナグラー平板上でそのレシチネース反応が *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清で抑制され難いこと、ゼラチン液化能陽性、ミルクの stormy fermentation 陽性、ラフィノース分解陰性、メリビオース分解陰性、トレハロース分解陽性、ス

ターチ分解陰性の7点が有用である。又 *C. paraperfringens* は Bergey's manual 第8版¹³⁾に Genus *Clostridium* の group I の 5 *Clostridium paraperfringens* Nakamura, Tamai and Nishida 1970 として記載されているが *C. absonum* は記載されなかった。これは *C. paraperfringens* の原著¹⁴⁾は医学と生物学の1970年の80巻3号で Bergey's manual 第8版の出版に間に合い *C. absonum* の原著は Internat. J. Syst. Bacteriol. の1973年23巻で Bergey's manual 第8版の出版に間に合わなかったことによる。

結 論

C. absonum の新分離法を考案し、この方法により土壤135試料から67株を分離したが、人糞便からは全く分離しえなかった。この *C. absonum* のレシチネースはマウスに毒性を示し *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清により中和されるが、その毒素抗毒素の親和性が低いことがわかった。*C. absonum* と他の2菌種との生化学的性状の鑑別点としては *C. absonum* がナグラー平板における *C. paraperfringens* のA型抗毒素血清によりレシチネース反応が抑制され難いこと、ラフィノース分解陰性、メリビオース分解陰性、スターチ分解陰性の4点が *C. paraperfringens* との鑑別に有用であり、又 *C. absonum* がゼラチン液化能陽性、ミルクの stormy fermentation 陽性、スターチ分解陰性、トレハロース分解陽性の4点が *C. paraperfringens* との鑑別に有用である。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を戴いた西田尚紀教授並びに御助力を得た中村信一、三井詔子、玉井健三の諸先生をはじめ微生物学教員各位に深く感謝の意を表します。貴重な標品を分与下さいました国立予防衛生研究所、村田良介博士、富山大学薬学部三井健一郎博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayase, M. & Nishida, S.: Internat. J. Syst. Bacteriol., 23, 419 (1973).
- 2) Sterne, M. & van Heyningen, W.E.: Bacterial and mycotic infections of man, 4th. ed., p545, Philadelphia, Lippincott. (1965).
- 3) Holdeman, L.V. & Moore, W.E.C.: Anaerobe laboratory manual, p109, Blacksburg, Southern printing co., (1973).
- 4) Nishida, S., Murakami, M. & Yamagishi, T.: Jap. J. Microbiol., 6, 33 (1962).

- 5) van Heyningen, W.E., : Biochem. J., 35, 1246 (1945).
- 6) Mitsui, K., Mitsui, N. & Hase, J. : Jap. J. Exp. Med. 45, 33 (1973).
- 7) Florence, B.R. & Pillemer, L., : J. Immunol. 70, 533 (1953).
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.J. & Randall, R.J., : J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 9) 近藤房生, 尾形学 : 感染症学雑誌, 47, 326 (1973).
- 10) 近藤房生 : 日本細菌学雑誌, 29, 833 (1974).
- 11) Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M., : Appl. Microbiol., 6, 303 (1969).
- 12) Nakamura, S. & Nishida, S., : J. Med. Microbiol., 7, 451 (1974).
- 13) Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., : Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th. ed., p553, Baltimore, The Williams and Wilkins company, (1974).
- 14) 中村信一, 玉井健三, 西田尚紀, : 医学と生物学, 80, 137 (1970).

A b s t r a c t

A new procedure for isolation of *Clostridium absonum* was devised. Sixty-seven strains of *C. absonum* were isolated from soil samples, but no strain of *C. absonum* could be obtained from human fecal samples. The lecithinase, hemolysin, and lethal toxin in the culture filtrates of this species exhibited low avidity for *C. perfringens* type A antitoxin and the three activities were inseparable by the present method of fractionation. A reinvestigation of biochemical properties revealed that incomplete suppression of lecithinase reaction by *C. perfringens* type A antitoxin and no fermentation of raffinose, melibiose, and starch are useful criteria to differentiate *C. absonum* from *C. perfringens*, and that positive, although weak, gelatin liquefaction and fermentation of trehalose are useful to differentiate it from *C. paraperfringens*.
