

## Clostridium perfringens 類似菌群に関する分類学的研究

特に Clostridium paraperfringens Nakamura, Tamai, and Nishida  
1969 について

金沢大学大学院医学研究科微生物学講座(主任 西田尚紀教授)

中 村 信 一

(昭和47年9月6日受付)

Willisら<sup>1)</sup>が述べた Nagler 培地上のレチシネース反応と、その抗血清による Clostridium perfringens 判定法は広く一般の C. perfringens 食中毒検索に用いられているものであり、我国でも微生物検査必携<sup>2)</sup>として一般に用いられている。しかるに著者の研究室ではヒト腸管内あるいはガスエソ患者材料を検討するうち、溶血反応弱陽性で、生物性状が C. perfringens に酷似し、Nagler 培地上のレチシネース反応陽性、しかもそのレチシネースが600単位/mlのウェルシュ菌抗血清により抑制される性状を持つC. perfringensに極めて類似した菌群が分離され、著者はこれについて検討し、C. paraperfringens Nakamura, Tamai, and Nishida 1969<sup>3)</sup>(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版の clostridia の項のNo. 5として登録される旨、この項の著者の一人 L. D.S. Smith 博士より通知をうけている。)を提議した。その後さらに著者の研究室で土壤材料を検討している際、生物性状が C. perfringens, C. paraperfringens の中間様性状を示し、かつウェルシュ菌抗血清によって抑え切れないレチシネースを産生する菌群が分離された。著者は本研究でこれらの C. perfringens 類似菌の分類学的位置を明らかにするため数値分類(Numerical taxonomy)<sup>4,5)</sup>およびDNA-DNA 相同性実験(DNA-DNA homology experiment)<sup>6,7)</sup>を行った結果について述べたい。Clostridia の数値分類については他に報告がないので外にも広く saccharolytic clostridia を集めて検討を行った。

## 実 験 方 法

## I. 数値分類

使用菌株：表1に示した64株を使用した。C. perfringens 類似菌は Yamagishi ら<sup>8)</sup>の C. perfringens 分離方法によって C. perfringens を分離している最中に分離されたものを用いた。

被験性状：おのおのの菌株について表2に示した74の characters (feature としては159になる。後述)について調べた。

コロニー性状および細胞形態：McIntosh & Fildes の嫌気ジャーで48時間培養した1%グルコース加血液寒天平板上のコロニーについて、コロニー形態を観察し、同一コロニーについてグラム染色を行い、顕微鏡下で細胞形態を観察した。孢子；Roberts<sup>9)</sup>が記載したクックトミートブローで5日間培養し Wirtz<sup>10)</sup>の孢子染色を行った。糖による増殖促進度：2%ポリペプトン(大五、大阪)、0.5%酵母エキス(大五、大阪)、0.5%食塩、0.1%チオグリコール酸ナトリウム、pH7.2を基礎培地とし、小試(10×105mm)に3.5mlあて分注、滅菌後、滅菌該糖を1%の割に加え、肝片加肝ブイオンで前培養した菌液0.15mlを植菌し、37°C1週間培養後光電比色計(島津スペクトロニック・20)を用い波長600mμにおける吸光度の測定により濁度を求め、吸光度の値が糖を含まない対照培地に比べ2倍以上を示した時、増殖促進度陽性と判定した。嫌気性；上記血液寒天平板上に植菌し、嫌気、好気性培養を行った。溶血性；上記血液寒天平板を使用した。荚膜形式；Keppie ら<sup>11)</sup>

Taxonomic studies on Clostridium perfringens-like strains, particularly concerning Clostridium paraperfringens Nakamura, Tamai, and Nishida 1969. **Shinichi Nakamura**, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

表 1 数値分類に使用された菌株由来

- C. perfringens*  
 type A ; PB6K (National Institute of Health, Tokyo, Japan) S002-3, S16550, S1610, S16102 ; Strains isolated from soil in Kanazawa, Japan.  
 type B ; 4964 (National Collection of Type Cultures, London, England)  
 type C ; 3182 (National Collection of Type Cultures, London, England)  
 type D ; L9 (Leeds University, Leeds, England)  
 type E ; 411 (L. A. Tarashevich State Control Institute for Med. Biological Preparation, Moscow, USSR)  
 type F ; 398 and 410 (L. A. Tarashevich State Control Institute for Med. Biological Preparation, Moscow, USSR)
- C. tertium*  
 2C1-1, 4C-2 ; Strains isolated from soil in Kanazawa, Japan.
- C. multifermentans*  
 17795 (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.)  
 2C-2 ; Strain isolated from soil in Kanazawa, Japan.
- C. butyricum*  
 3847, 3858 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan)
- C. acetobutyricum*  
 3346, 3859 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan)
- C. septicum*  
 5, 8, C-61, 94 (National Institute of Health, Tokyo, Japan)  
 7281, 616 ; Strains isolated from soil in Kanazawa, Japan.
- C. chauvoei*  
 Holland, Frankrig, Mørkov, AA-11 (State Veterinary Serum Laboratory, Copenhagen, Denmark)  
 C-59 (National Collection of Type Cultures, London, England)  
 C6H (Leeds University, Leeds, England)  
 11\* (National Institute of Health, Tokyo, Japan)
- C. paraputrificum*  
 17864 (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.)
- C. innocuum*  
 14501 (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.)
- C. botulinum* type E E-59 (Institute of Health of Akita, Akita, Japan)
- C. sphenoides* 3560 (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.)
- C. bifermentans* 315 ; Strain isolated from soil in Kanazawa, Japan.
- C. sordellii* 4708 (Wellcome Research Laboratory Collection, England)
- C. sporogenes* 80011 ; Strain isolated from soil in Kanazawa, Japan.
- C. difficile*  
 17857, 9689 (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.)
- C. fallax* A33H (Pasteur Institute, Paris, France)
- I. barati* 2227, 7606 (Pasteur Institute, Paris, France)
- I. lacustris* 12/ 16B, 12/ 16C (Pasteur Institute, Paris, France)
- I. sanguicole* 1278A, 1259 (Pasteur Institute, Paris, France)
- I. talis* 1231 (Pasteur Institute, Paris, France)
- P. pseudo-tetanicum* 965 (Pasteur Institute, Paris, France)

- C. paraperfringens* ; Starins isolated in Kanazawa.  
 FIS-1W, FIS-5, 9, 3-3, 3-1 ; strains isolated from human feces.  
 G, H ; Starins isolated from gas gangrene.  
 unidentified strains ; Strains isolated in Kanazawa.  
 SO6-4 (from soil), TFI (from buccal phlegmon), HA-7103 (from soil),  
 HA-7107 (from soil), HA-9103 (from soil).  
*C. tetani* PO5 ; Strain isolated from soil in Kanazawa, Japan.  
*C. tetanomorphum* 288 (National Collection of Type Cultures, London, England)  
 \* labelled as *C. septicum*

表 2 検査項目

Characters	Features scored
Colonies on 1% glucose added blood agar	
Growth	Swarming or localized
Edge	Entire, uneven or irregular
Surface	Smooth or rough
Colour	Non-coloured, white or green
Mucosity	Mucous or not
Morphology of cell	
Gram reaction	Negative or positive
Shape of cells	Strict rods or curved rods
Arrangement	Occuring singly or clustered
	Filamentous or not
Width	Slender ( $0.5\mu <$ ) or stout ( $0.5\mu >$ )
Spore	Terminal or not terminal
	Oval or spherical
	Swelling the rods or not
Capsule	Capsulated or not
Anaerobiosis	Anaerobic or microaerophilic
Haemolysis	Negative, incomplete, or complete haemolysis
Growth in PYG broth	
at 18 C	Negative or positive
at 50 C	Negative or positive
Growth stimulation by sugars	
Glucose, maltose, lactose, sucrose, galactose, fructose, xylose, mannitol, arabinose, salicin, mannose, raffinose, inulin, sorbitol, adonitol, dulcitol, glycerin	Negative or positive
Biological tests	
Indol production, nitrate reduction, coagulated egg white digestion	Negative or positive
Gelatinolysis	Negative, weakly positive or strongly positive
Casein digestion	Negative, incomplete, or complete digestion.

Characters	Features scored
Hydrogen sulfide production	Negative or positive
Enzymic activity	
Lecithinase, urease, RNase, DNase, phosphatase, collagenase, lipase	Negative or positive
Sensitivity to antibiotics	
Chloramphenicol, tetracycline, penicillin, erythromycin, streptomycin, colistin, Kanamycin, fradiomycin	Sensitive or resistant
Toxicogenicity to mouse	Lethal or not
Alcohol and fatty acid production in PYG medium	
Butanol, isobutanol, isoamyl alcohol, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid, isocaproic acid, caproic acid	Negative or positive
A main product (isoamyl alcohol, acetic acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid or isocaproic acid)	Negative or positive
Utilization of nitrogen compounds as a sole nitrogen and carbon sources	
L-glutamate	
L-histidine	Negative or positive
Deamination from	
Aspartate, histidine, glutamate, methionine, and serine	Negative or positive
Gas from glucose	Negative or positive

の法により1%グルコース加10%血清ブイオンを用いた。ゼラチン液化能、凝固卵白消化、インドール産生、硝酸塩還元：Sterneら<sup>12)</sup>の記載にしたがって行った。硫化水素産生：SIM培地（栄研，東京）を使用した。カゼイン消化：Grob<sup>13)</sup>の方法によった。レチシネース反応：Willisら<sup>14)</sup>の使用したNagler培地上の所見からレチシネースの有無を判定した。ウレアーゼ：Brooksら<sup>14)</sup>の方法によった。トリブチリン消化：ブレインハートインフュージョン寒天培地（栄研，東京）に1%の割にトリブチリン（和光，東京）を加えたものを使用した。リボ核酸分解酵素：ハートインフュージョン（栄研，東京）2.5%，塩化カルシウム0.045%，酵母エキス0.5%，寒天1.5%，pH7.2を基礎培地とし，別に滅菌したリボ核酸（Sigma, U.S.A）を0.2%の割に加えたものを平板にし，菌を画線塗抹し，37°C48時間培養後1.5N塩酸を加え集落のまわりに透明帯を形成したものを

陽性とした。デスオキシリボ核酸分解酵素：DNA培地（栄研，東京）を使用した。フォスファテース：2.0%プロテオースペプトン（Difco, U.S.A.），0.5%酵母エキス，1.0%グルコース，0.5%食塩，0.5%リン酸カルシウム，1.5%寒天pH7.2を基礎培地とし，0.5%フェノールフタレイン・2 磷酸塩溶液（栄研，東京）を3%の割に加えた平板に菌を画線塗抹し37°C48時間培養後集落をアンモニアガスにさらに集落の赤変をもって陽性とした。コラゲネース：細粉ハイドパウダー（Baird & Tatlock, London）0.4%加寒天平板（寒天濃度2%）にパンチホールを作り，クックトミートブローズ24時間培養液0.5mlを入れ37°C24時間培養し周囲の透明帯の有無を調べた。グルコースからのガス産生：2%プロテオースペプトン（Difco, U.S.A.），0.5%酵母エキス，0.5%食塩，1%グルコース，0.5%寒天，pH7.2の培地を使用した。マウスに対する致死活性：Nishidaら<sup>15)</sup>の方法

により培地を作製した。代謝脂肪酸およびアルコール：Mooreら<sup>16)</sup>の方法により、島津ガスクロマトグラフィ-GC-4A(島津製作所, 京都)を使用し、ガスクロマトグラフィを行った。内径4mm長さ2mのステンレスカラムを用い、充てん剤としてResoflex Lac-1-R-296(西尾工業, 東京)を使用した。キャリアガスは窒素ガスを用い、ガス流量60ml/min, カラム温度120°Cの条件下でガスクロマトグラフィを行った。表2に示した代謝脂肪酸, およびアルコールの存否を features として検索したが特に代謝産物のうち最大ピークを示したものを主代謝産物とし feature を設定した。脱アミノ反応: 細胞浮遊液(1mgN/ml) 1mlに, 0.1Mアミノ酸溶液0.4ml, 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2) 1.0mlを加え, 37°C 4時間嫌気振とう培養後, ネスラー法によりアンモニアを検出した。抗生物質に対する感受性: ディスク法によった。アミノ酸による発育: 0.03%酵母エキス, 0.02%リン酸1カリウム, 0.01%硫酸マグネシウム, pH7.2を基礎培地とし, 0.75%の割合にアミノ酸を加え, 小試(10×105mm)に3.5mlあて分注, 滅菌後, 肝片加肝ブイオンで前培養した菌液0.15mlを植菌し, 37°C48時間嫌気培養後, 濁度を測定した。18°C, 50°Cにおける発育: 2%プロテオースペプトン(Difco, U.S.A.), 0.5%酵母エキス, 0.5%食塩, 1%グルコース, pH7.2の培地を使用し, 18°C, 50°Cの湯浴を用い培養した。上述の全ての検査結果は(+), あるいは(-)で表示した。

相似値(Similarity value, 以下S-値と略)の算出: Beersら<sup>17)</sup>の第Ⅲ法によりコーディング(coding)し, S-値を算出した。例えば溶血性, インドール産生をコーディングすると下記の如くなる。

features		features	
溶血性陰性	+ -	インドール(+)	+ -
不完全溶血	nc* + -	インドール(-)	nc +
完全溶血	nc nc +		

nc\*; not considered.

S値の算出は, 比較する2種の菌種がいずれも"+, "の features の数をNsとし, いずれか一方の菌種が"+, "で他方の菌種が"-, "又はその逆の場合の features の数をNdとすると, S-値 = Ns / (Ns + Nd) として算出した。S-値は Sneath<sup>1)</sup>の方法によりシングル・リンケージ(single linkage)によりソーティング(sorting)したものを一定のS-値で群別し Sneathら<sup>3)</sup>の命名法によりフェノン

(Phenon, 数値分類群)とした。各フェノン内およびフェノン相互間平均相似値(Mean similarity value, MSV)は下記の式により求めた。

フェノン内平均相似値 =

$$\frac{2 \times (\text{フェノン内S-値の総和})}{(\text{フェノン内菌株数}) \times (\text{フェノン内菌株数} - 1)}$$

フェノンA, B間平均相似値 =

$$\frac{\text{フェノン間S-値の総和}}{(\text{フェノン}^n\text{A}_n\text{の菌株数}) \times (\text{フェノン}^n\text{B}_n\text{の菌株数})}$$

電子計算機は NEAC 2230(日本電気, 東京)を使用した。

## II. DNA-DNA相同性実験

細菌の培養および集菌: 2%プロテオースペプトン(Difco, U.S.A.), 0.5%酵母エキス, 0.5%食塩, 1%グルコース, 0.1%チオグリコール酸ナトリウム(pH7.2)を含む培地を使用し, <sup>32</sup>P-DNA調整には, 0.1mci carrier free <sup>32</sup>P(日本放射性同位元素協会, 東京)を上述の培地100mlに加えた。菌の培養は37°Cで行い, 対数増殖期に遠心集菌した。

DNA調整法: DNA調整は Marmur<sup>18)</sup>の方法によった。即ち菌体をエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)生食水溶液(0.15M NaCl + 0.1M EDTA)に懸濁し, リゾチーム(Boehringer Mannheim, 東京)を1mg/mlになる様加え, 37°C20分処理した後, SLS(Sodium lauryl sulfate)を加え, 60°Cの湯浴で10分間加熱し溶菌した。冷却後3%(V/V)の割合にn-オクチルアルコールを含むクロロホルムで除蛋白を繰返した。除蛋白の後, DNA溶液に50μg/mlになる様RNase(Worthington, U.S.A.)を加えRNAを分解除去した。ラベルした<sup>32</sup>P-DNAはフレンチプレッサーセル(大岳, 東京)を通すことにより shearing を行った。

DNA-寒天の調整およびDNA-寒天反応: Boltonら<sup>6)</sup>の方法により変性DNAをIonagar No. 2(Oxoid, London)に固定した。60°Cの2×SSC(SSC=0.15M NaCl + 0.015M ケン酸ソーダ)で充分洗浄後, 寒天に固定されたDNA量を260mμの吸光度により測定した。DNA-DNAハイブリッド形成は McCarthy<sup>1)</sup>, Hanaoka<sup>19)</sup>らの方法にしたが行った。即ち1g中に100μg~300μgのDNAを含む寒天0.1gにその1/10量の変性<sup>32</sup>P-labeled DNAフラグメント(1~3μg), 及び蒸留水を加えて0.08mlとし, これに0.02mlの5×SSCを加えて, 総量が0.1ml, かつ1×SSCになる様調整し, 60°C14時間培養した。培養後ハイブリッドを形成しなかったDNAフラグメントは寒天を60°Cの2×SSC溶液中で洗浄す

ることにより除去した。寒天中のDNAとハイブリッドを形成したDNAフラグメントは寒天を70°Cの0.01×SSC溶液中で洗浄することにより寒天から分離した。各々の洗浄液について放射能を液体シンチレーションカウンター Unilex I-A (Nuclear-Chicago, U.S.A.) により測定した。ハイブリッド形成DNAの割合は (bound counts/total counts) × 100 として計算した。おのおのの試料につき2回行い、必要な場合には追加実験を行った。

### Ⅲ. *C. perfringens* α毒素の測定

α毒素産生用培地としては Nishidaら<sup>15)</sup> のクックトミートブローを調整し使用した。α毒素の測定は、van Heyningen<sup>20)</sup> の方法により Egg Unit (EU) を求め、同時に Evans<sup>21)</sup> の方法に従い、毒素1mlを中和するのに要する抗血清の力価(抗毒素結合量, Antitoxin Equivalent, 以下AEと略す)を求めた。ウェルシュ菌抗α血清は千葉血清研究所の製品を使用した。

### 実験結果

先に著者らはヒト腸管内あるいはガスエソ患者から *C. perfringens* に類した菌を分離し、これらの菌を *C. paraperfringens* Nakamura, Tamai,

and Nishida 1969<sup>2)</sup> として提議し、これらの菌が Pasteur 研究所から分与された *Inflabilis barati* 2227, 7606, *I. lacustris* 12/16B と同一であることを述べた。その後更に *C. perfringens*, *C. paraperfringens* に類似した別の一群と思われる菌を土壌から分離した。これら新分離菌株は *C. paraperfringens* とは細胞幅、レチシネースの強さが異なる様に思われた。

先ず *C. paraperfringens*, ついで新分離 *C. perfringens* 類似菌の性状を詳細に再検討した結果について述べる。

#### I. *C. perfringens* 類似菌の性状

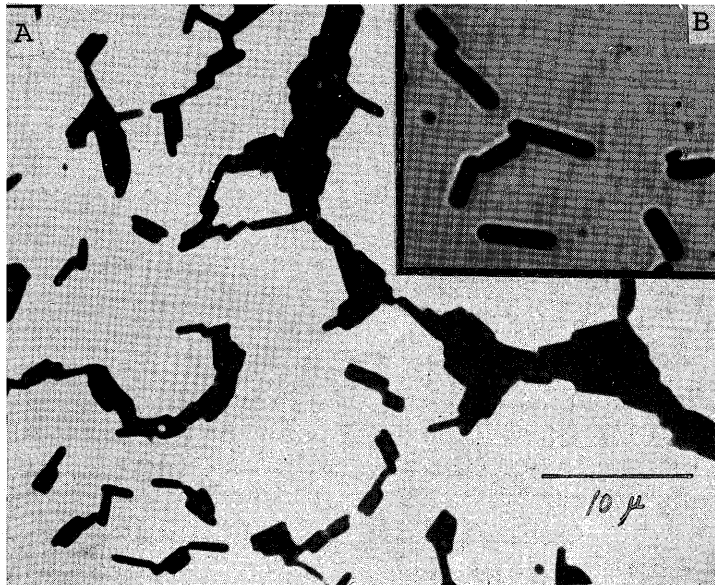
##### 1. *C. paraperfringens* の性状

コロニーの形態: 1%グルコース加血液寒天平板上のコロニー形態は、大きさが *C. perfringens* よりやや小さく、正円形に近く、表面やや粗で、辺縁鋸歯状であった。コロニーの著しい緑化傾向は認めることは出来なかった。

菌形態: グラム陽性桿菌。菌幅0.5~0.6μで *C. perfringens* に比し決定的に細い。おのおのの細胞は群をなす傾向がみられた(図1)。荚膜は薄いが確認された。運動性陰性。

生物性状: グルコース、マルトース、ラクトース、

図1 *C. paraperfringens* *C. perfringens*



A; *C. paraperfringens*, B; *C. perfringens*  
1%グルコース加血液寒天平板上に発育した菌をグラム染色した。(×2,000)

シュクロース、サリシン、フラクトース、ガラクトース、マンノース、セロビオースからの酸の産生全て陽性。ラフィノース、アラビノース、ザイロース、イノシット、ズルシトール、ソルビトール、マニトール、イヌリン分解陰性。ゼラチン消化、凝固卵白消化、インドール産生陰性。硝酸塩還元陽性。

代謝脂肪酸およびアルコール：酢酸、酪酸を産生するがブタノールを産生しなかった。

脱アミノ反応：アスパラギン酸、ヒスチジン、グルタミン酸、メチオニンを脱アミノしなかった。

至適発育温度：30°~40°C。50°Cでは発育を認めなかった。

レチシネース：Nagler 平板上のレチシネース反応は *C. perfringens* のレチシネースに較べてはるかに弱い。Willisら<sup>1)</sup>の法にしたがって平板の片側に600単位/mlのウェルシュ菌抗α血清をなすと *C. perfringens* のレチシネースは当然抑えられ、*C. paraperfringens* についてもほとんどの場合完全に抑えられた。しかるに60単位/mlのウェルシュ菌抗α血清をなすと、*C. perfringens* の示す総てのレチシネースはほとんど完全に、あるいは完全に抑えられるのに対し、*C. paraperfringens* の弱いレチシネースはやや抑えられたにすぎなかった。また Nagler 平板上の *C. perfringens* 菌は培地中に含まれているラクトースを分解し、存在する中性紅を還元し、コロニー周辺に赤色帯を形成するのに対し、同じラクトース分解菌である *C. paraperfringens* は赤色帯を形成しなかった。先述の Nagler 平板上のレチシネースとウェルシュ菌抗α血清との反応は *C. paraperfringens* の出ずレチシネースとウェルシュ菌抗α血清との親和性が異なることを暗示したので更にクックトミートブローズ培養濾液を用い検討した(表3)。van Heyningen<sup>20)</sup>の方法によりEUを測定した結果、全株共1EU/ml以下と極めて低い値を示した。しかしながら Evans<sup>21)</sup>の法によりAEを求めた結果、1時間値は10株全て0.1AE以下であったが、室温に24時間放置すると10株中3株が各々1.0, 2.0, 2.0AEと高い値を示してくることが判った。従来すべての *C. perfringens* で普通発見される0.2~0.3AE程度のもものでは24時間室温放置することによって1時間値よりも0.4AE以上の誤差を生ずることはあり得ないこと、また上述の3株のAE値は *C. perfringens* におけるEUに対するAEの比から算出されるAE値に較べ極めて高い値であることから、(通常 *C. perfringens* においてはAE/EUは0.07位である。)これらのレチシネースはウ

ルシュ菌抗α血清に対し親和性が弱く一旦抑えられつつも時間と共に解離するものと推定された。

## 2. 新分離 *C. perfringens* 類似菌の性状

コロニー形態：1%グルコース加血液寒天平板上のコロニー形態は、*C. perfringens* とほとんど同一で、正円、表面滑、のコロニーを形成し、コロニーの緑化傾向は *C. perfringens* に比べ弱かった。溶血陽性。

菌形態：グラム陽性桿菌。菌幅0.9~1.0μと *C. perfringens* との差を認めることは出来なかった。莢膜は狭いが存在した。運動性陰性。

生物性状：グルコース、マルトース、ラクトース、シュクロース、サリシン、フラクトース、ガラクトース、マンノース、セロビオース分解陽性。ラフィノース、アラビノース、ザイロース、イノシット、ソルビトール、マニトール、イヌリン分解陰性。凝固卵白消化、インドール産生陰性。ゼラチン消化弱陽性。硝酸塩還元陽性。

代謝脂肪酸およびアルコール：酢酸、酪酸を産生するが、ブタノールを産生しなかった。

脱アミノ反応：被験アミノ酸を脱アミノしなかった。

至適発育温度：30°~40°C。50°Cでは発育を認めなかった。

レチシネース：Nagler 平板上のレチシネース反応の強さは、*C. perfringens* と同一程度であった。しかしながらこのレチシネース反応は600単位/mlのウェルシュ菌抗α血清によっていくらか抑えられる傾向を示したがほとんど抑えられなかった。クックトミートブローズ培養濾液中のレチシネースは2.2~6.7 EU/mlを示した。しかし大量のウェルシュ菌抗α血清を用いてもこのレチシネースを中和することは出来なかった。これら新分離 *C. perfringens* 類似菌4株のうち、1株CPP-8はマウスに對に常に致死活性を示した。残り3株、HA-7103, HA-7107, HA-9103のマウスに対する致死活性は実験により変動を示した。

## II. 数値分類

1. 上述の菌について電子計算機を使用して数値分類の原則に従って分類した。細菌の分類については古くから形態学的所見を重視した分類、生物学所見を重視した分類等、医学微生物については分類に際し病原性が重視されて来た傾向がある。数値分類は“分類に際しては全ての性質が等しく評価されなければならない。”との Adanson<sup>22)</sup>の哲学的思索を1957年 Sneath<sup>4)23)</sup>が細菌の分類に適用した分類方法である。

表3 Clostridium perfringens-like strains のレチシネース活性

Strains	$\alpha$ -Antitoxin equivalents (AE) /ml	Egg Units (EU) /ml	Lethal toxicity	Lecithinase reaction on half- antitoxin agar containing $\alpha$ - antitoxin of 60 units, 600 units.	
<i>I. barati</i> 2227	0.1 >	1.0 >	—	+*	—*
<i>I. barati</i> 7606	0.1 >	1.0 >	—	+	—
<i>I. lacustris</i> 12/16 B	0.1 >	1.0 >	—	+	—
<i>C. paraperfringens</i>					
G	0.1 >	1.0 >	—	+	—
H	0.1 >	1.0 >	—	+	—
3-3	0.1 >	1.0 >	—	+	—
9	0.1 >	1.0 >	—	+	—
FIS-5	1.0	1.0 >	—	+	—
FIS-1W	2.0	1.0 >	—	+	—
3-1	2.0	1.0 >	—	+	—
Unidentified strains					
HA-7103	5.0 <	4.9	+, —	+	±*
HA-7107	5.0 <	5.2	+, —	+	±
HA-9103	5.0 <	2.2	+, —	+	±
CPP-8	5.0 <	6.7	+	+	±
<i>C. perfringens</i>					
PB6K	0.2	2.6	+	—	—

\* + : lecithinase reaction not suppressed

± : lecithinase reaction slightly suppressed

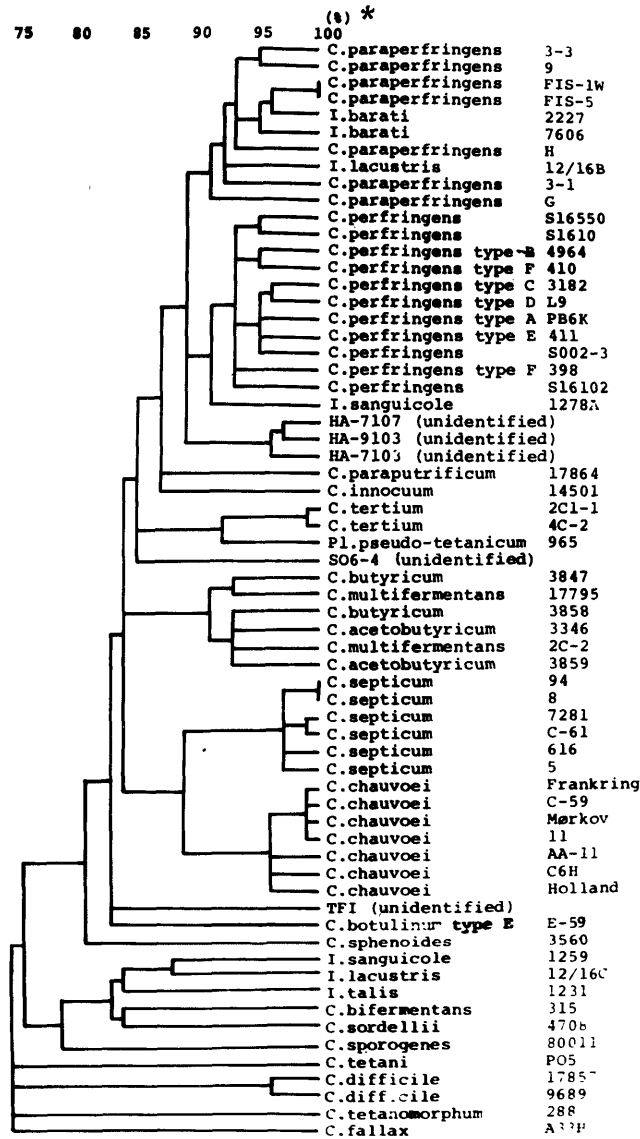
— : lecithinase reaction suppressed

これは細菌の持つ全ての性状を等価とし、総合的に扱い、実験方法の項で述べた如く数学的処理により、微生物相互の相似性を数学的に表現したものである。上述の *C. perfringens* 類似菌と *C. perfringens* を中心とした saccharolytic clostridia との分類学的関係を数値分類により検討した結果をデンドログラム (図2) として示した。計算されたS-値をシングル・リンケージ法により分けると被験64株中53株は81%のS-値で連った (81-フェノン)。これら81-フェノンを形成する53株は saccharolytic but non-proteolytic な菌群であり、残り11株の多くは saccharolytic and proteolytic な菌、および

non-saccharolytic and non-proteolytic な菌であった。81-フェノンに含まれる菌種は *C. perfringens* type A, B, C, D, E, and F, *C. tertium*, *C. multifementans*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. paraputrificum*, *C. innocuum*, *C. botulinum* type E, *C. sphenoides*, Genus *Inflabilis* 数株, *C. perfringens* 類似菌全株, 未同定株 So6-4, *C. carnis* 類似菌TFIであった。これら81-フェノンを90%以上のS-値でシングル・リンケージするもの (90-フェノン) によって分けると7グループに分かれた。おのおののグループをそれぞれフェノンI,



図2 Sacharolytic clostridia および対照株のデンドログラム



(%)\* : similarity value

II, III, IV, V, VI, VIIとした。64株中残り11株のうち2株が91%のS-値で連なり、グループを形成したので、このグループをフェノンⅧとした。次いでおのおのフェノン内、およびフェノン間の平均相似値を算出し、フェノンの均一性、ならびにフェノン間の関係を検討した(表4)。各フェノン内平均相似値は90~96%と高い値を示し、フェノンの均一性が高いことを示した。フェノン間平均相似値をみると、フェノンIとフェノンⅢの間、フェノンⅥとⅦの間は85%と高い

平均相似値を示し、これらのフェノンは他に比べお互に類似性が高いことを示した。以下各フェノンについて述べる。おのおの菌株について属するフェノンの他菌株に対するS-値の平均値を求め、その値が最も高い菌株を、そのフェノンの代表株とした。

フェノンI. 代表株 : *Inflabilis barati* 2227.  
このフェノンに含まれた菌は、*I. barati* 2227, 7606, *I. lacustris* 12/16B, *C. paraperfringens* 3-3, 9, FIS-1W, FIS-5, H, 3-1, G の10株であ

表4 フェノン内およびフェノン間平均相似値 (mean similarity values)

phenon	No. of strains	Mean similarity values							
I	10	90*	—	—	—	—	—	—	—
II	12	81	90	—	—	—	—	—	—
III	3	85	81	96	—	—	—	—	—
IV	3	80	72	73	94	—	—	—	—
V	6	75	72	71	77	90	—	—	—
VI	6	74	75	79	76	70	96	—	—
VII	7	78	76	78	78	68	86	95	—
VIII	2	68	63	62	62	64	68	65	96

\* 数値は mean similarity value (%) を示す。

った。フェノン内菌株相互間S-値の変異域は83~100%であり、各菌株の他の菌株に対するS-値の平均値は86~93%であった。このフェノンは後述の *C. perfringens* からなるフェノンIIとは、フェノンIに属する *C. paraperfringens* 3-3 とフェノンIIに属する *I. sanguicole* 1278A を通じ89%のS-値で連った。*C. paraperfringens* 3-3 のフェノンI, II に対する平均相似値はおおの91%, 82%であり、フェノンI に対しては高く、フェノンII には低い値を示したが、*I. sanguicole* 1278A はフェノンI, II に対し、それぞれ84%, 85%の平均相似値を示し、数値的には両フェノンに対し中間的な態度を示した。ただしフェノンI 内でのフェノン内平均相似値は90%、フェノンII では90%とそれぞれ高いのに、両フェノン間のフェノン間平均相似値は81%を示し、両群は別種とさるべきことを示した。即ち両群は類似しているが別種とすべきことが確認された。

フェノンII. 代表株: *C. perfringens* type D L9.

このフェノンは *C. perfringens* 11株, *I. sanguicole* 1278A の12株により構成された。フェノン内菌株相互間S-値の変異域は81~96%であった。各菌株の他の菌株に対するS-値の平均値は85~92%であり、*I. sanguicole* 1278A が最も低い値を示した。この株は *C. perfringens* S16102 と91%のS-値でもって連り、このフェノンに属したのだが、前述した様にフェノンI とも89%の高いS-値で連り数値的には両フェノンの中間的位置を占めた。しかしながらこの菌の Nagler 平板上のレチシネース反応はウェルシュ菌抗α血清により完全に抑制され、菌幅とも *C. perfringens* と同一の態度を示した。

フェノンIII. 代表株: 未同定株 HA-7103, HA-7107.

このフェノンは新分離の未同定 *C. perfringens* 類似菌 HA-7103, HA-7107, HA-9103 の3株からなり、3株相互の平均相似値は96%と高い値を示した。このフェノンのフェノンI, III に対するフェノン間平均相似値はそれぞれ85%, 81%であり、フェノンI に対し、より高い類似性を示した。HA-7103, HA-9103 はフェノンI に属する *I. lacustris* 12/16B と89%のS-値で連ったが、フェノンI に対する平均相似値は両菌共に85%であり両群は別種とさるべきことを示した。これらの菌はマウスに対し、微弱ながら致死活性を示した。表3中の CPP-8 はこの数値分類には用いなかったが、形態学的所見ならびに生物性状所見からこの群に分類した。

フェノンIV. 代表株: *C. tertium* 4C-2.

*C. tertium* 2C-1, 4C-2, *Plectridium pseudo-tetanicum* 965 の3株からなり、フェノン内の他菌との平均相似値はそれぞれ95, 96, 92%を示した。*P. pseudo-tetanicum* 965 は Pasteur 研究所から送付された菌株で誤って同定されているものと思われる。

フェノンV. 代表株: *C. butyricum* 3858

*C. multifementans* 17795, 9689, *C. butyricum* 3858, 3859, *C. acetobutyricum* 3346 の5株からなり、全株共に93%でシングル・リンケージが見られ、フェノン内の他菌との平均相似値はそれぞれ88, 89, 92, 90, 90%であった。

フェノンVI. 代表株: *C. septicum* 7281.

このフェノンは6株により構成され、全株 *C.*

septicum であった。フェノン内菌株相互間S-値の変異域は91~100%であり、相互に高いS-値で連り、各菌株の他の菌株に対するS-値の平均値は94~97%であった。

フェノンⅦ。代表株：C. chauvoei C-59.

このフェノンは C. chauvoei 7株により構成された。フェノン内菌株相互間S-値の変異域は92~99%であり、各菌株の他の菌株に対するS-値の平均値は94~97%であった。フェノンⅥとフェノンⅦのフェノン間平均相似値は85%とかなり高く、両フェノンは分類学的には近い関係にあることを示した。しかしながら両フェノンのフェノン内平均相似値は共に95%の高値を示し、両群は類似しているが別種とすべきである。

フェノンⅧ。代表株：C. difficile 17857, 9689.

C. difficile 17857, 9689 の2株からなり互に96%のS-値で連った。後に Pasteur 研究所から分与された。I. setiensis 2866 は C. difficile 17857, 9689 とおのおの95, 96%のS-値で連ったが、これに

については考察の項で述べる。

さらに用いられた菌のどれとも90%以下のS-値を示すものをここに集めた。

C. paraputrificum 17864, C. innocuum 14501, 未同定株 So-6-4, C. carnis 類似未同定株 TFI, C. botulinum type E E-59, C. sphenoides 3560, I. sanguicole 1259, I. lacustris 12/16C, I. talis 1231, C. bifermentans 315, C. sordellii 4708, C. sporogenes 80011, C. tetani PO5, C. tetanomorphum 288, C. fallax Hの計15株。典型的な糖非分解菌である C. tetani PO5 は C. perfringens を中心とした糖分解菌に75%でシングル・リンケージするにすぎなかった。

## 2. 各フェノンの鑑別性状。

被験培養性状に基づき、フェノンⅠ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ, Ⅶ, の鑑別性状を検討した(表5, 6)。表5から、フェノンⅠ, Ⅱ, ⅢをフェノンⅣ, Ⅴ, Ⅵ, Ⅶから鑑別するのに最も有効な鑑別点はレチシネース産生であることが判る。即ちフェノンⅠ, Ⅱ, Ⅲはレ

表5 フェノンⅠ~Ⅶの相異点

フェノン 性 状	Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ (25*)	Ⅳ (3)	Ⅴ (6)	Ⅵ (6)	Ⅶ (7)
コロニー, 性 状	スムーズ, ラフ 緑色, 無色	スムーズ 無 色	スムーズ 白 色	ラ フ 無 色	ラ フ 無 色
好 気 性	strictly anaerobic	micro aerophilic	strictly anaerobic	strictly anaerobic	strictly anaerobic
莢 膜	+, -	-	-	-	+
糖 分 解					
シュクロース	+	+	+	-	+
サリシン	+, -	+	+	+	-
ザイロース	-	+	+	-	-
マニトール	-	+	+	-	-
アラビノース	-	-	+	-	-
ゲラチン消化	+, -	-	-	+	+
レチシネース産生	+	-	-	-	-
ブタノール産生	+, -	+	+, -	+	+
50℃での発育	+, -	-	-	+	+
フォスファターゼ産生	+	-	-	+	-

※数値は各々のフェノンに含まれる菌株数

表6 C. perfringens と C. perfringens-like strains の相異点

フェノン		フェノンI	フェノンII	フェノンIII
性状		C. paraperfringens	C. perfringens	?
菌	幅	0.5 ~ 0.6 $\mu$	1.0 ~ 1.5 $\mu$	0.9 ~ 1.0 $\mu$
コロニー	性状	辺縁鋸歯状 ラフ, 緑化 傾向なし	釘状 スムーズ 緑化する	釘状 スムーズ 緑化傾向少しあり
溶	血	-, (稀に+)	+	+
糖分解				
	ラフィノース	-	+	-
	イノシット	-	+(稀に-)	-
	サリシン	即時分解	陰性か遅延分解	即時分解
ゼラチン消化				
	2%ゼラチン	-	+	+
	10%ゼラチン	-	+	-
莢膜形成		狭	広	狭
ブタノール産生		-	+	-
レチシネース反応	60単位	+*	-	+
(抗血清に対し)	600単位	-, 土	-	+

※+: 抑制されない, 土: ほとんど抑制される, -: 完全に抑制される.

チシネース陽性, IV, V, VI, VIIはレチシネース陰性の性状を示した. フェノンIV, V, VI, VIIは糖分解性状, およびゼラチン消化能により簡単にお互に鑑別することができる. フェノンI C. paraperfringens, フェノンII C. perfringens, フェノンIIIの鑑別点を表6に示した. C. paraperfringens, フェノンIIIはイノシット, ラフィノース分解陰性, サリシン即時分解の諸性状から比較的簡単に C. perfringens から鑑別可能である. C. paraperfringens, フェノンIIIの両群は相互に非常に類した菌群であり, 被験性状の中で顕著な相違を示したものはゼラチン消化ならびに細菌幅であった. 即ち C. paraperfringens は2%ゼラチン消化陰性, 菌幅0.5~0.6 $\mu$ を示し, フェノンIIIは2%ゼラチン消化陽性, 菌幅0.9~1.0 $\mu$ であった. しかし実際的には前述した両群のレチシネース反応により容易に両者を区別することが出来た.

### III. DNA-DNA相同性実験

上述のフェノンI, II, IIIを区別すべきであるとす

る数値分類の成績をさらに検討するためDNA-DNA相同性実験を行った. フェノンI, II, IIIについてそれぞれ I. barati 2227, C. perfringens PB6K, HA-7103を基準株とし, DNAを寒天に固定した. DNAの相同性は相同菌株間を100%とする相対値で表わした(表7). これらのDNA-DNA相同性の値から三者はそれぞれ区別される菌群であるが, フェノンIとフェノンIIIは28~43%の相同値を示し遺伝学的に近い関係にあるのに対し, 一方フェノンIIはフェノンI, IIIとは遺伝学的にも明らかに異なるものであることを示し, 数値分類の成績が確認された. Reciprocal hybridizationにより, えられた相同性の信頼性をチェックした. I. barati 2227に対する C. perfringens PB6Kの相同性は13%, 逆に C. perfringens PB6Kに対する I. barati 2227の相同性は17%, 同様に I. barati 2227とHA-7103の組合せは35%と28%, C. perfringens PB6KとHA-7103の組合せは10%と14%であり, えられた測定値に高い信頼性があるものと考えられ

表7 DNA-DNAハイブリダイゼーション

Agar DNA Labeled-DNA	Phenon- I <i>I. barati</i> 2227	Phenon- II <i>C. perfringens</i> PB6K	Phenon- III unidentified HA-7103
Phenon- I			2
<i>I. barati</i> . 2227	100*	17	28
<i>C. paraperf.</i> 3-3	67	12	29
<i>C. paraperf.</i> 9	75	14	42
<i>C. paraperf.</i> G	95	14	43
Phenon- II			
<i>C. perf.</i> type A PB6K	13	100	14
<i>C. perf.</i> type A S002-3	16	78	17
<i>C. perf.</i> type A S16102		76	
<i>C. perf.</i> type B 4964		65	
<i>C. perf.</i> type C 3182		74	
<i>C. perf.</i> type E 411E	13	92	15
<i>C. perf.</i> type F 410F	12	66	11
<i>I. sanguicole</i> 1278A	12	76	17
Phenon- III			
HA-7103	35	10	100
HA-7107	38	10	100
HA-9103	34	13	95
Reference strains			
<i>C. tertium</i> 2C1-1	14	10	14
<i>C. butyricum</i> 3858	11	9	13
<i>C. septicum</i> 7281	14	12	16

\* 数値は相同菌株間DNA-DNAハイブリッド形成を100とした相対値

る。対照株として用いた *C. tertium* 4C-2, *C. butyricum* 3858, *C. septicum* 7281 は上述の基準3株に対し、それぞれ11~14%, 9~12%, 13~16%の相同性を示したにすぎなかった。

形態、生物性状、レチシネースの性状、数値分類、およびDNA-DNA相同性の相違により、フェノンIの *C. perfringens* 類似菌群は前報<sup>3)</sup>で述べた新種 *C. paraperfringens* として分類されるべきであることが確認された。フェノンIは *I. barati* 2株、*I. lacustris* 1株を含んでいるが、考察の項で述べる理由によりこれらの名称を用いることは不適当

と思われた。フェノンIIIの *C. perfringens* 類似菌群に関しては考察の項で述べる理由により命名しなかった。

#### 考 察

本研究は2群の *C. perfringens* 類似菌群、即ち *C. paraperfringens* Nakamura, Tamai and Nishida<sup>3)</sup>、および別の未同定 *C. perfringens* 類似菌株の *C. perfringens* に対する分類学的関係を明らかにするために行われたものである。その結果、著者らの *C. paraperfringens* は Pasteur

研究所の *I. barati* 2227, 7606, *I. lacustris* 12/16B と同一であることが判った。しかしながら如上の *I. barati* (Tissier) Prévot, 1938 の2株の生物性状は *La Bacille de Barat* に関する Tissier<sup>21)</sup> の原著記載とは著しく異ったものであった。Tissier は *La Bacille de Barat* について、①円形孢子を形成する。②カレイ状の形(恐らくはいわゆる Blähform か)を取りやすい。③ヨードで染まる顆粒が菌体内に存在する。④マニトールを分解し酸を生ずる。⑤糖のない所でもすみやかに、かつ大量に増殖する。⑥醋酸を作らぬ。と述べている。しかし本研究においてフェノンIに属した Pasteur 研究所の3株、および我々の分離株の7株共に上述の①~⑥の性状において *La Bacille de Barat* とは一致しなかった。Tissier が記載した *La Bacille de Barat* について、Tissier 自身 *C. butyricum* でないかと述べているが著者も同意見である。フェノンIはまた別の既命名株 *I. lacustris* 12/16B を含んでいるが、著者は Pasteur 研究所からこの *I. lacustris* 12/16B および *I. lacustris* 12/16C の分与を受け、数値分類に加え検討したところ、これら2株は76%の相似値を持つにすぎず、別種とさるべきと考えるに至った。したがっていずれの株が *I. lacustris* に相当するのかを検討した結果 *I. lacustris* 12/16C は形態学的、培養性状、生物性状共に原著記載<sup>21)</sup>に一致したのに、*I. lacustris* 12/16B はインドール産生陰性、かつ細胞幅も0.5 $\mu$ と細く原著記載とは異ったものであった。また Genus 名 *Inflabilis* に関してもその特徴として Prévot は荚膜を持たぬと述べているが、*I. barati* 2227, 7606, *I. lacustris* 12/16B 共に、1%グルコース加血清ブイオンを用い培養した時、*C. perfringens* より決定的に狭いが確実に荚膜形成がみられた。細菌の命名に関し国際細菌命名規約原則10に「細菌学者は事実の一層深い知識に基づくか、またはこの命名規約の規則に違反している名を廃棄する必要に基づくかの重大な動機がない限り、みだりに Taxon の名を変更してはならない。」<sup>26)</sup>と記載されている。しかしながら上に述べた如く *I. barati* 2227, 7606, *I. lacustris* 12/16B はそれぞれ原著記載とは異なるものであり誤って名付けられており、したがって著者はこれらを新しく *C. paraperfringens* と命名した。

DNA 相同性実験の結果、*C. paraperfringens* は *C. perfringens* PB6K に対し、12~19%と低い値を示し、両者は明らかに異なるものであることが確

認された。一方フェノンIIIの HA-7103 に対し28~43%と比較的高い値を示し、両者は系統発生的に近い関係にあることを暗示した。

Bergey's Manual<sup>27)</sup>には *C. perfringens* の生物性状について、ゼラチン消化陽性、凝固卵白消化陰性、グルコース、フラクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、シュクロース、ザイロース、トレハロース、ラフィノース、澱粉、グリコーゲン、イノシット分解陽性、サリシンについては稀に分解するとされているが、数値分類に使用した *C. perfringens* 11株ならびに教室保存の百株余の *C. perfringens* の糖分解性状を検討した結果、ザイロース分解株は全くなく、グルコース、フラクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、シュクロース、ラフィノース、イノシット、ガラクトースはほとんど全ての菌株が分解陽性の性状を示し、サリシン分解菌は少なかった。*C. paraperfringens* の糖分解については、グルコース、フラクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、シュクロース、ガラクトース、サリシン分解陽性、イノシット、ラフィノース分解陰性で、サリシン、イノシット、ラフィノース分解性の相違、ならびにゼラチン分解陰性の性状により、*C. paraperfringens* と *C. perfringens* の鑑別は簡単な様に思われた。*C. perfringens* のサリシン分解については Bergey's Manual<sup>27)</sup>には稀に分解すると記載されているが、Mansson<sup>28)</sup>は高蛋白食を与えたブタから分離した *C. perfringens* はサリシン分解陽性であり、同時にカゼインあるいは凝固アルブミン消化陽性であると述べ、Nishida<sup>29)</sup>は分離時の加熱条件により耐熱性が強い程サリシン分解株が多いと述べた。著者はサリシン分解様式を検討した結果 *C. perfringens* は遅延分解の性状を示すのに対し、*C. paraperfringens* は即時分解の性状を示し、サリシン分解陽性といえども、両者の分解様式は異なるものであった。中川<sup>30)</sup>は非加熱分離 *C. perfringens* 33株中2株のラフィノース分解陰性株を報告しているが、著者は100株余の *C. perfringens* を検討したが、ラフィノース分解陰性株は一株もみられなかった。*C. perfringens* のイノシット分解について従来分解陽性と記載されているが、最近著者は100°C10分以上の加熱により分離された *C. perfringens* はイノシット分解陰性の性状を示すことを明らかにした。(未発表)ゼラチン消化に関して Nishida<sup>29)</sup>は耐熱性 *C. perfringens* の60%がゼラチン消化陰性であると述べたが、著者らはその後10%ゼラチンの他に

2%ゼラチンを用いゼラチン消化を判定した結果、弱いが確実にゼラチン消化陽性であることが判った。実際的には *C. paraperfringens* はそのレチシネース反応がウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清により抑制されにくいこと、菌幅が $0.5\mu$ と *C. perfringens* に比べ決定的に細いことにより簡単に *C. perfringens* と区別することが出来る。フェノンⅢの菌群に関しては、そのレチシネース反応がウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清によりほとんど抑制されないこと、ラフィノース、イノシット分解陰性、サリシン即時分解の性状により *C. perfringens* とは区別される。またフェノンⅢと *C. perfringens* の DNA-DNA 相同性も10~13%と低く明らかに両者は別種とさるべきである。フェノンⅢと *C. paraperfringens* はコロニー形態、菌幅、溶血性、ゼラチン消化の諸点で異なるのみで、分類学的に近接した菌群と思われたがDNA-DNA相同性を調べた結果からも両者は近接した領域の菌であることが判った。ただ29~43%のDNA-DNA相同性から同一種としてとりあつかい難いことを示したが、このフェノンⅢの菌群は無毒のフェノンⅠの *C. paraperfringens* と異り毒性を持つこと、かつそのレチシネースがウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清によって中和されないなどの重要な性質をもつ点にかんがみ、更に多数の菌株を分離し、如上の所見あるいは稍困難な上記菌種との鑑別性状について更に検討した上で *Sp. nov.* の設定を考慮したいと考え、ここでは命名をさしひかえた。

Prévot's Manual<sup>31)</sup> の *I. setiensis*<sup>32)</sup> は Bergey's Manual 第7版に *C. setiense* (Prévot and Raynaud) McClung and McCoyと記載されているが、著者は Pasteur 研究所から *I. setiensis* 2866, 3131 の分与を受け検討した結果、両者とも Prévot の記載とは著しく異ったものであった。即ち *I. setiensis* 2866 は saccharolytic な菌性状を示し、*C. difficile* 17857, 9689 と数値分類上のおおの95, 96%の高い相似値を示し、*I. setiensis* 3131 は全く糖を分解しない菌であった。Pasteur 研究所から分与されたその他の Genus *Inflabilis* に属する菌株についても新種として設定するには更に検討が必要な様に思われた。また著者の数値分類の結果では、*C. multifementans*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum* は同一種である可能性を示したが、最近 Cumminsら<sup>33)</sup> は細胞壁糖構成、栄養要求性、DNA相同性により、*C. butyricum* を2つのグループに分け、一方のグループには *C. butyricum*, 他方には *C. beijerinckii* の名称

を提議し、従来の *C. multifementans* は独立したグループを形成することなく、*C. butyricum* あるいは *C. beijerinckii* に属し、*C. acetobutyricum* は両者のいずれに対してもDNA-DNA相同性は低かったと述べている。

分類上問題のある *C. septicum*, *C. chauvoei*<sup>34)35)</sup> については数値分類の結果、両者は類似しているが別種であるとする現行の分け方を支持する方が妥当の様に思われる。他の問題菌群の *C. sordellii* と *C. bifermentans*<sup>34)36)~38)</sup> については他日更に多くの菌株を用い検討したい。

## 結 論

レチシネースを産生し、生物性状が *C. perfringens* に類似した *C. perfringens* 類似菌に関し、分類学的関係を明らかにすべく数値分類、DNA相同性実験を行った結果、*C. perfringens* 類似菌群は2群に分かれ一群は先に提唱した *C. paraperfringens* Nakamura, Tamai, and Nishida 1969 であり、この群は数値分類上でも、DNA相同性においても *C. perfringens* と区別さるべきことが確認された。数値分類上フェノンⅢを形成した別の一群はDNA相同性においても *C. perfringens*, *C. paraperfringens* とは区別さるべきであると思われたが、この群は毒性を持つこと、かつそのレチシネースがウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清によって中和されないなどの重要な性質を持つ点にかんがみ、更に多数の菌株を分離し、如上の所見あるいはやや困難な上記菌種との鑑別性状について更に検討した上で新種の設定を考慮したいと考え、ここでは命名を差し控えた。*C. paraperfringens* の *C. perfringens* との鑑別点は1%グルコース加血液寒天、ならびに Nagler 平板上のコロニー形態、ウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清と低い親和性を持つレチシネースの産生、菌幅 ( $0.5\mu$ )、イノシット、ラフィノース分解陰性、サリシン即時分解陽性、ゼラチン消化陰性、ブタノール産生陰性などであった。他の一群、フェノンⅢはイノシット、ラフィノース分解陰性、サリシン即時分解、ブタノール産生陰性で *C. perfringens* とは異り、ゼラチン消化弱陽性、マウスに対する致死活性陽性の性状で *C. paraperfringens* とは異ったものであった。実際的には Nagler 平板上のレチシネースと、ウェルシュ菌抗 $\alpha$ 血清との反応により如上3者の区別は容易に行われた。

またおのおの別種とされている *C. multifementans*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum* は

同一の90-フェノンに属した。その他同時に用いた数種の菌株について検討を加えた。

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ならびに御助力を得た微生物学教室員各位に深く感謝の意を表します。また電子計算機操作に御助力を得た金沢大学計算機センター車古正樹氏、菌株分与に御協力を得た ATCC (U.S.A.) C. Mills 博士、NCTC (England) S. Lapage 博士、L. A. Tarashevich State Control Institute (USSR) B. D. Bychenko 博士、the State Veterinary Serum Laboratory (Denmark) I. Høgh 博士、国立予防衛生研究所村田良介博士、秋田県衛生科学研究所児玉栄一郎博士、Pasteur Institute (France) に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Willis, A. T. & Hobbs, G. : J. Pathol. Bacteriol., **75**, 299 (1958).
- 2) 厚生省監修：微生物検査必携，201頁，東京，日本公衆衛生協会，1966.
- 3) 中村信一・玉井健三・西田尚紀：医学と生物，**81**，137 (1970).
- 4) Sneath, P. H. A. : J. Gen. Microbiol., **117**, 201 (1957).
- 5) Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. : Nature (London) **193**, 855 (1962).
- 6) Bolton, E. T. & McCarthy, B. J. : Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., **48**, 1390 (1962).
- 7) McCarthy, B. J. & Bolton, E. T. : Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., **50**, 156 (1963).
- 8) Yamagishi, T., Ishida, S., & Nishida, S. : J. Bacteriol., **88**, 646 (1964).
- 9) Roberts, T. A. : J. Appl. Bacteriol., **30**, 430 (1967).
- 10) Wirtz, K. : Zblt. Bakt. I. Abt. Orig., **46**, 727 (1908).
- 11) Keppie, J., & Robertson, M. : J. Bacteriol. Pathol., **56**, 123 (1944).
- 12) Sterne, M. & van Heyningen, W. E. : Bacterial and mycotic infection of man, 4th Ed., p. 545, Philadelphia, Lippincott, 1965.
- 13) Grob, D. : J. Gen. Physiol., **29**, 219 (1964).
- 14) Brooks, M. E & Epps, H. B. G. : J. Gen. Microbiol., **21**, 144 (1959).
- 15) Nishida, S., Murakami, M. & Yamagishi, T. : Jap. J. Microbiol., **6**, 33 (1962).
- 16) Moore, W. E. C., Cato, E. P. & Holdeman, L. V. : Internat. J. Syst. Bacteriol., **16**, 383 (1966).
- 17) Beers, R. J., Fisher, J., Magraw, B. S. & Lockhart, W. R. : J. Gen. Microbiol., **28**, 641 (1965).
- 18) Marmur, J. : J. Mol. Biol., **3**, 208 (1961).
- 19) Hanaoka, M., Kato, Y. & Amano, T. : Biken J., **12**, 181 (1969).
- 20) van Heyningen, W. E. : Biochem. J., **35**, 1246 (1941).
- 21) Evans, D. G. : J. Pathol. Bacteriol., **57**, 75 (1945).
- 22) Adanson, M. : Familis des Plantes, vol. 1, Preface pp. cliv, et seg., P. clxiv. Paris, Vincent (1763).
- 23) Sneath, P. H. A. : J. Gen. Microbiol., **17**, 184 (1957).
- 24) Tissier, H. : Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris), **81**, 426 (1918).
- 25) Prévot, A. R., Thouvenot, H., Patricella, M. & Silloc, R. : Ann. Inst. Past., **91**, 50 (1956).
- 26) International committee of Nomenclature of Bacteria : Internat. J. Syst. Bacteriol., **19**, 3 (1969).
- 27) Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., p. 666, Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
- 28) Mansson, I. & Smith, L. DS. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., **55**, 342 (1962).
- 29) Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M. : Appl. Microbiol., **17**, 303 (1969).
- 30) 中川正明：十全医会誌，**79**，35 (1970).
- 31) Prévot, A. R. : Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria, 1st American Ed., p. 218, Philadelphia, Lee & Febiger, 1966.
- 32) Prévot, A. R. & Raynaud, M. : Ann. Inst. Past., **70**, 50 (1944).
- 33) Cummins, C. S. & Johnson, J. L. : J. Gen. Microbiol., **67**, 33 (1971).
- 34) Moussa, R. S. : J. Pathol. Bacteriol., **77**, 341 (1959).



- 35) Willis, A. T. : Anaerobic Bacteriology in clinical Medicine, p. 73, London, Butterworth & Co., 1960.
- 36) Nishida, S., Tamai, K. & Yamagishi, T. : J. Bacteriol., 88, 1941 (1964).
- 37) Tamai, K. & Nishida, S. : J. Bacteriol., 88, 1647 (1964).
- 38) Novotony, P. : J. Med. Microbiol., 2, 81 (1969).

## Abstract

*Clostridium perfringens*-like strains, the taxonomic position of which cannot be found in the present Bergey's Manual, were reexamined in detail as to their cultural properties. Lecithinase of these strains exhibited less avidity to alpha-antitoxin of *C. perfringens* than *C. perfringens* lecithinase. As a result of computation to elucidate the taxonomic position of these strains in clostridia, the *C. perfringens*-like strains were grouped into two phenons, I and III, distinctly separable from *C. perfringens* group (phenon-II). The strains which were designated by us as *Clostridium paraperfringens* sp. nov. in the previous short communication belonged to phenon I, whilst strains of phenon-III were left unnamed in the present papers, although they seemed to be close to phenon-I strains taxonomically. The main criteria differentiating *C. paraperfringens* from *C. perfringens* were as follows ; colonial morphology on 1% glucose blood agar and on Nagler's plate production of lecithinase which exhibited low avidity to *C. perfringens* alpha-antitoxin, width of cells (0.5 $\mu$ ), negative reaction in inositor and raffinose fermentation, gelatinolysis, and butanol production. Phenon-III strains differed from *C. perfringens* in the properties of negative reaction of inositol and raffinose fermentation, and positive reaction of salicin fermentation, and differed from *C. paraperfringens* in the properties of positive gelationolysis and lethal toxicity to mouse. Further analysis of DNA-DNA homology of phenon-I, II, and III confirmed the validity of the above-mentioned computing.

---