

沖縄における嫌気性芽胞形成桿菌の分布調査

琉球衛生研究所 細菌部 新城長重

緒 言

嫌気性芽胞形成桿菌すなわち Clostridium 属に属する細菌には悪性水腫、ガス壊疽、壊疽性腸炎及び破傷風等の感染症の原因菌をはじめ、ボツリヌス菌 Cl. botulinum 及びウェルチ菌 Cl. welchii 等食中毒の起因菌となるものが含まれている。しかし嫌気性菌の検索は好気性菌に比較して一般にその培養方法が複雑であり手間を要する場合が多いので、これまで当地ではほとんど省みられておらず Clostridium 属の菌種別分布及び地理的分布も未知の状態にあり、本菌属の菌によつて発生する諸種の感染症の予測も不可能である。

従つて本調査は沖縄各地の主として土壌を調査対象として嫌気性菌の分離、同定を試み、Clostridium 属の菌の菌種別分布を調べ、本菌属の菌によつて起る諸種感染症の予防に対する参考資料とすることを目的としたものである。

尚、本稿においてはこれまでに同定し得た 196 菌株の菌種名とその分布率についてのみ報告し、地理的分布及び地質学的事項等との関連については何れ別の機会に述べてみたい。

材料及び方法

1) 土 壤

分離原として用いた土壌は昨 1962 年 10 月から本 1963 年 1 月まで、約 12 週間にわたつて著者又は当研究所細菌部職員が沖縄本島、久米島、宮古島及び石垣島の各地 182 箇所から採集してきたものである。

ii) 分離培養法

菌の分離に当つては、まず土壌 1g を中試験管に分注した普通ブイヨン約 5 ml に加えて充分混和し、15 分間静置後その上澄液 1 ml を肝々ブイヨンに移植し、滅菌流動パラフィンを重ねて 70~75°C 30 分間加熱後急冷し、37°C の孵卵器に納めて 10 日間培養を行い、これを原培養液とした。

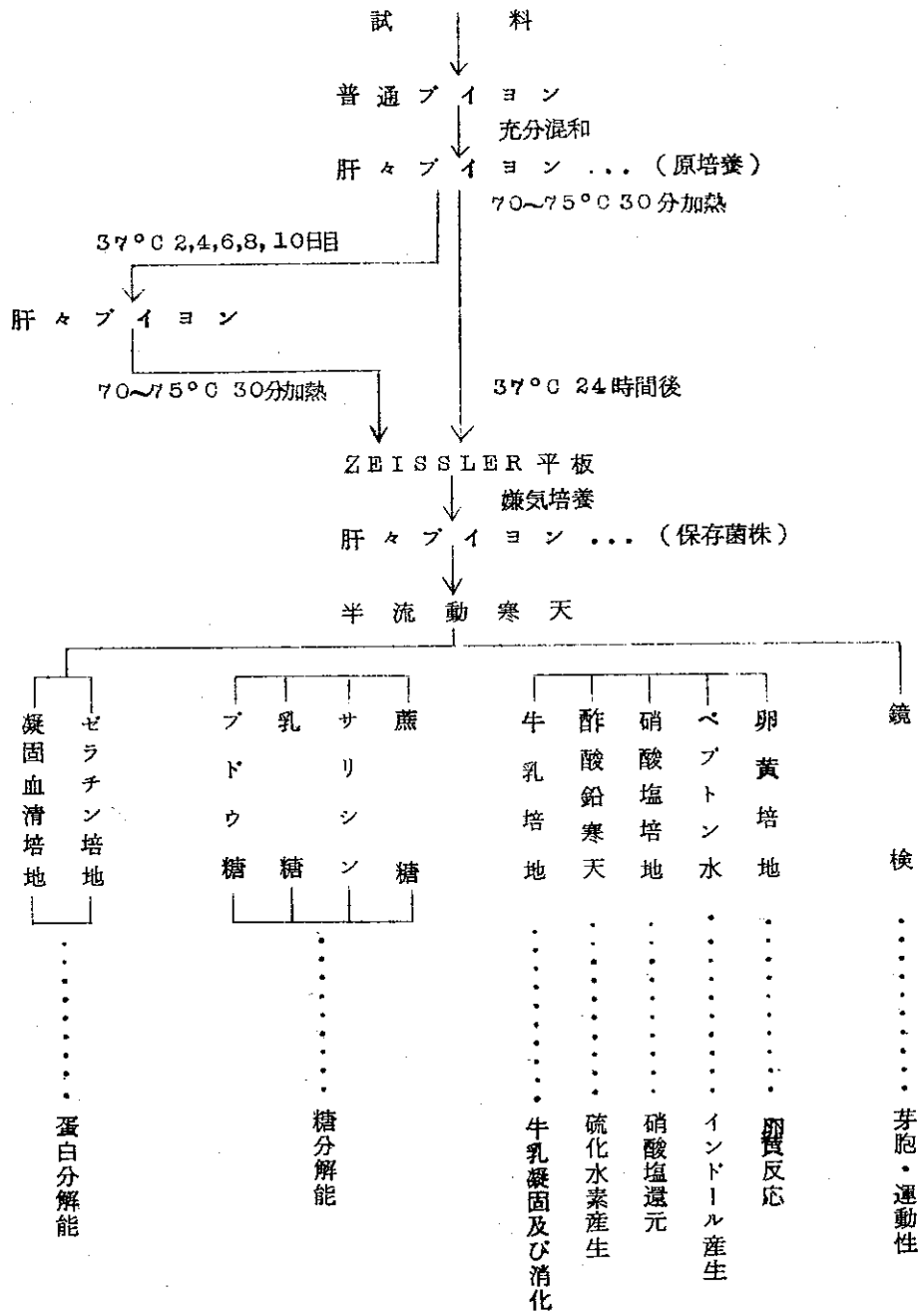
試料移植後 24 時間目に原培養液 1 金耳を Zeissler 平板に塗抹して嫌気培養槽に納め水素ガス置換法又はドライアイス法を用いて 37°C 24 時間嫌気培養を行い、平板上に発育した独立集落の性状を観察し、これを更に肝々ブイヨンに移して保存菌株とした。又、試料移植後 2 日目、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目に原培養液 0.5 ml 宛を別の肝々ブイヨンに移植し、滅菌流動パラフィンを重ねて 70~75°C 30 分間加熱処理し、37°C 48 時間培養後、これより Zeissler 平板に塗抹して上記の如く保存菌株を得た。

iii) 菌種同定

菌の同定に当つては、まず保存菌株から半流動寒天(組成後記)に菌を移植し 37°C 48 時間培養したものについて凝固血清液化、ゼラチン液化、糖分解(ブドウ糖、乳糖、サリシン、蔗糖)、硫化水素産生、硝酸塩還元、インドール産生、卵黄反応、牛乳凝固及び消化、運動性及び芽胞の有無を調べ菌種の同定を行つた。以上の過程を第 1 図に要約する。

第1図

分離、同定方法



iv) 培地組成

伝染病研究所学友会編 細菌学実習提要(全訂改版)に記載のないもの又は培地成分が異なるもののみを掲げる。

半流動培地

ブドウ糖	10 g
寒天	2 g
チオグリコール酸ナトリウム	1 g
普通ブイヨン	1,000 ml

牛乳培地

脱脂乳	1,000 ml
還元鉄	1 g
	PH 6.8

糖分解用基礎培地

プロテオーゼペプトン	20 g
塩化ナトリウム	5 g
チオグリコール酸ナトリウム	1 g
寒天	1 g
0.2% B.T.B. 溶液	1.2 ml
所要の糖	10 g
水	1,000 ml

ゼラチン培地

ゼラチン	200 g
ペプトン	10 g
第二磷酸ナトリウム	2 g
ブドウ糖	1 g
チオグリコール酸ナトリウム	1 g
水	1,000 ml

酢酸鉛寒天

プロテオーゼペプトン	20 g
磷酸水素ナトリウム	2 g
ブドウ糖	1 g
寒天	2 g
水	1,000 ml

PH 7.6 とし

酢酸鉛	0.2 g
-----	-------

硝酸塩培地

ペプトン	20 g
第二磷酸ナトリウム	2 g
ブドウ糖	1 g
寒天	1 g
硝酸カリウム	1 g
水	1,000 ml

ペプトン水

ペプトン	20 g
第二磷酸ナトリウム	2 g
寒天	1 g
チオグリコール酸ナトリウム	1 g
	1,000 ml

卵黄培地

普通寒天を加熱溶解させ45~50°Cに保温し、卵黄、生理食塩水等量混合液を10%の割合に無菌的に加えて混釈しシャーレに分注して平板とする。

成績

182試料の中2試料からは目的とする菌の発育が認められなかつた。分離同定し得た菌株は、同一試料から分離された株の菌種名が重複するものを除いて196株である。

菌種別の分離菌株数は *Cl. welchii* が115株で58.7%を示し、他菌種より非常に分離率が高い。又、*Cl. septicum* と *Cl. tetani* が夫々15株で7.7%、以下 *Cl. sporogenes* 12株(6.1%) *Cl. bif fermentans* 11株(5.6%)、*Cl. haemolyticum* 6株(3.1%)、*Cl. histolyticum* と *Cl. tertium* が夫々5株(2.6%)、*Cl. cochlearium* 3株(1.5%)、*Cl. tetanomorphum* が夫々2株(1.0%)、又、*Cl. aerofetidum*、*Cl. butylicum*、*Cl. fallax*、*Cl. novyi*、*Cl. putrificum* が夫々1株(0.5%)で最も低率である。

以上の16菌種196株の分離菌株数及び分離率を下表に示す。

嫌気性芽胞形成菌の菌種別分離菌株数

及びその分離率

菌種名	菌株数	分離率
1) <i>Cl. welchii</i>	115	(58.7%)
2) <i>Cl. septicum</i>	15	(7.7%)
3) <i>Cl. tetani</i>	15	(7.7%)
4) <i>Cl. sporogenes</i>	12	(6.1%)
5) <i>Cl. bifermentans</i>	11	(5.6%)
6) <i>Cl. haemolyticum</i>	6	(3.1%)
7) <i>Cl. histolyticum</i>	5	(2.6%)
8) <i>Cl. tertium</i>	5	(2.6%)
9) <i>Cl. cochlearium</i>	3	(1.5%)
10) <i>Cl. multifermentans</i>	2	(1.0%)
11) <i>Cl. tetanomorphum</i>	2	(1.0%)
12) <i>Cl. aerofetidum</i>	1	(0.5%)
13) <i>Cl. butylicum</i>	1	(0.5%)
14) <i>Cl. fallax</i>	1	(0.5%)
15) <i>Cl. novyi</i>	1	(0.5%)
16) <i>Cl. putrificum</i>	1	(0.5%)
計	196	

考察並びに総括

沖縄本島、久米島、宮古島及び石垣島の各地182箇所から採集してきた土壌について嫌気性芽胞形成菌の分離、同定を試み、16菌種196株を得た。これら16菌種の中 *Cl. welchii* が全部分離菌株の半数以上(58.7%)を占め、他菌種より遙かに分離率が高い。

前報において破傷風菌 *Cl. tetani* の分離を試み16.2%という結果を得た。これを今回の成績(7.7%)と比較すると非常に差が認められるが、これは前報においては破傷風患者発生地区を主体として調査したのに対し、今回は各地区とも無作為的に試料採集を行ったためではないかと思われる。

今回の調査に当つて初期8週間は水素ガス置換法とドライアイス法の二つの嫌気培養法を同時に行つてみたが、水素ガス置換法の方が種々菌の発育によいように思われた。しかしドライアイス法は水素ガス置換法に比較して種々な器材や複雑な操作を必要としない点捨て難いものがある。当地ではドライアイスが冬期間は入手難となるので、9週以後はもつばら水素ガス置換法を用いて嫌気培養した。

主要参考文献

- 1) 林薫、三舟求真人、新城長重 : 長崎大学風土病紀要、4(3):157~165、1962。
- 2) 農林省家畜衛生試験場 技術者集談会編 : 家畜伝染病診断学 総論、70~77、1955。
- 3) 村田良介 : モダンメディア、3(11)、:329~333、1957
- 4) 村田良介 : モダンメディア、3(6):161~167、1957。
- 5) ROBERT S. BREED, et al. : Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 7th ed, 634~693 1957。
- 6) 新城長重 : 琉球衛生研究所報、第1号、7~9、1960。