

[原 著]

嫌気性グラム陰性桿菌として見過ごされやすいフットボール型
Clostridium の同定に関する検討大門康志¹⁾・田中香お里²⁾・渡邊邦友²⁾¹⁾ 京都府立与謝の海病院臨床検査科²⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター・嫌気性菌研究分野

(平成 21 年 6 月 19 日受付, 平成 21 年 11 月 2 日受理)

通常芽胞が見られないうえグラム陰性に染色されるフットボール型の細胞形態をもつ *Clostridium* について, その生化学性状についての検討を行い簡易同定に有用な鑑別性状を抽出した。形態的特徴, 終末代謝産物分析および 16S ribosomal RNA 遺伝子配列に基づいて同定された *Clostridium hathewayi*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium citroniae*, *Clostridium aldenense*, *Clostridium symbiosum* の 6 菌種は, 市販の同定キット (API 20 A, Rapid ID32A) を利用した生化学性状および酵素反応により次のように鑑別された。Indole 産生菌種は *C. citroniae* と *C. aldenense* であり, この 2 菌種の鑑別性状としては, rhamnose, β -glucuronidase, β -galactocidase が適していた。Indole 非産生の 4 菌種のうち *C. symbiosum* のみが α -galactocidase 陰性であった。*C. hathewayi* は, cellobiose 陽性, α -arabinosidase および β -N-acetylglucosaminidase 陽性により鑑別可能であった。*C. clostridioforme* と *C. bolteae* の鑑別については, 性状が類似しており鑑別はやや困難であった。また, *C. symbiosum* は酵素反応を用いなくても集落形態から鑑別可能であった。

Key words: *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium citroniae*, *Clostridium aldenense*

序 文

フットボール型あるいは葉巻型といわれるユニークな形態のグラム陰性桿菌として観察される *Clostridium clostridioforme* は, 欧米では临床上重要な *Clostridium* 属の菌群の一つとされており¹⁾, 薬剤耐性が見られること²⁾や臨床材料からの分離数が *Clostridium* 属において 2 番目に多いこと³⁾が報告されている。本邦においては, これまで特に検討されていないが, 以前のわれわれの検討⁴⁾でも, フットボール型の *Clostridium* は血液や嫌気性菌の分離意義の高い感染症から分離され, 薬剤耐性傾向も示した。

フットボール型の *Clostridium* には, *C. clostridioforme* と形態からは *C. clostridioforme* との鑑別が困難

な *Clostridium symbiosum*^{5~8)}がある。しかしながら, *C. clostridioforme* とされてきた菌種は, 元来多様な性状を含む菌群で, 近年 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子の配列解析による分子生物学的手法や生化学的性状の相違から再検討され, 先に *C. clostridioforme*, *Clostridium bolteae*⁹⁾, *Clostridium hathewayi*^{10~14)}の 3 菌種に再分類されていたが¹⁾, 最近, さらにインドール産生株が新菌種 *Clostridium citroniae*¹⁵⁾および *Clostridium aldenense*¹⁵⁾として独立した。これら 5 菌種は *C. clostridioforme* group と総称される^{1, 16)}。したがって, グラム陰性桿菌と誤同定されるフットボール型の *Clostridium* には *C. symbiosum* を含めて 6 菌種が存在することになる。

C. clostridioforme はこのように再分類されたが, 各々薬剤感受性や病原性の点で異なり^{2, 4, 17)}, これらを同定する意義があると考えられる。また, 経験的治療に対してより有用な情報を提供するという観点から, 一般的な臨床検査室でも可能な菌種別あるいはある程度の菌種レベルまでの同定法が確立できれば理想

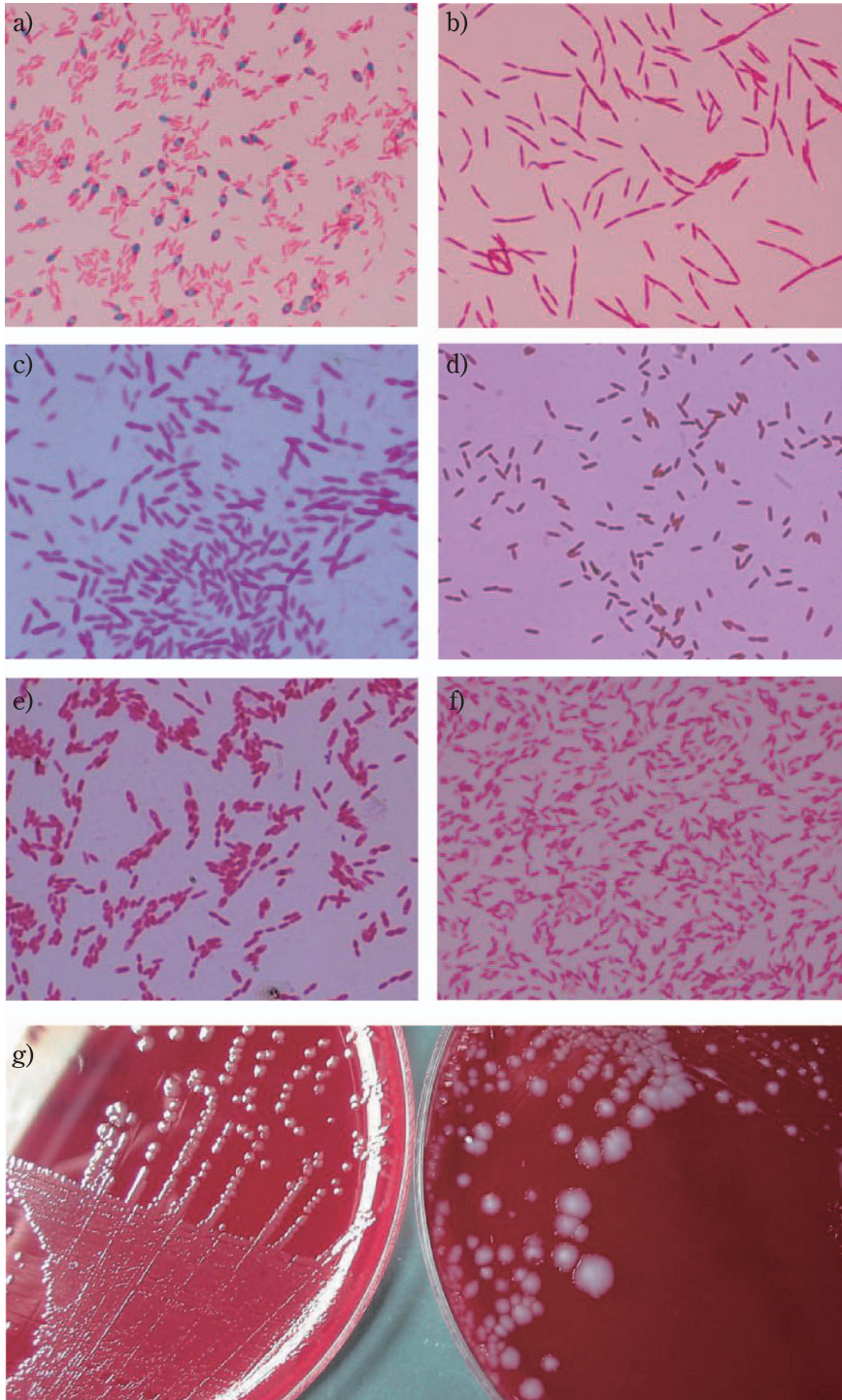
著者連絡先: (〒629-2261) 京都府与謝郡与謝野町男山 481

京都府立与謝の海病院臨床検査科

大門康志

TEL: 0772-46-3371 (内線 3150)

FAX: 0772-46-3371



的である。

そこで、今回、分子生物学的手法などにより同定されたこれらの各菌種について、グラム染色性にかかわらず同定可能な市販同定キットである API 20A および Rapid ID32A を利用した同定が可能か検討した。

対象と方法

1. 被検菌株

2004年11月から2006年9月の23カ月間に当院検査室に提出された膿、腹水、血液、胸水、膈分泌物、便などの臨床材料から分離され、形態の特徴、短鎖脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる終末代謝産物分析および16S ribosomal RNA 塩基配列(1,486~1,489 bp)の相同性検索に基づいて同定された *C. hathewayi* 16株、*C. clostridioforme* 10株、*C. bolteae* 11株、*C. citroniae* 6株、*C. aldenense* 5株、*C. symbiosum* 12株の計60株を用いた。

2. 集落およびグラム染色所見

分離菌については、アネロコロンビアウサギ血液寒天培地(AC培地、日本ベクトン・ディッキンソン)での初代培養時(3日間培養)のグラム染色における染色性、形態および芽胞の有無を観察した。また、被検菌株をAC培地に嫌気環境下で継代培養し、24時間、48時間、72時間培養後の集落性状(大きさ、形態など)を確認した。

3. 同定キットによる同定および生化学的性状の検討

主に糖の発酵能を試験項目とした同定キット API 20A (20A; 日本ビオメリュー)と酵素反応を主要な試験項目とした Rapid ID32A (32A; 同)を用い、同定菌名および生化学性状を得るため添付文書に従って実施した。判定はいずれも目視で行い、プロファイル番号とともに結果を記録した。32Aについては、 α -galactosidase (α -GAL)、 β -galactosidase (β -GAL)、 β -galactosidase-6-phosphate (β -GP)、 α -glucosidase (α -GLU)、 β -glucosidase (β -GLU)、 α -arabinosidase (α -ARA)、 β -glucuronidase (β -GUR)、 β -N-acetylgluco-

saminidase (β -NAG)の8項目は微弱な反応も陽性とした。また、20Aについては培養時間を72時間とした。また、同定キットには再分類される以前の *C. clostridioforme* のみ記載されているが、再分類後の各菌種が、同定キットにより *C. clostridioforme* と同定される確率について検討した。

結 果

1. 集落およびグラム染色所見 (Fig. 1)

初代分離培養菌のグラム染色における形態は、すべての菌種でフットボール型あるいは葉巻型のグラム陰性桿菌であり菌種による形態の明らかな相違は認めなかった。芽胞を認めた株は26株(43%)であった。菌種別では、*C. hathewayi* (63%)や*C. citroniae* (67%)で芽胞形成率が高かったが、*C. aldenense* (20%)や*C. symbiosum* (17%)では低かった(Table 2)。60株すべてにおいて、これらの分離菌をAC培地で嫌気環境下に24時間、48時間、72時間培養した集落を比較した。その結果、集落が大きくなる株と小さな株が存在し、72時間培養では、48株は直径3~5mmの集落を、残り12株は、2mm以下の明らかに小さな集落を形成して鑑別が可能となった。これら小さな集落を形成した株は、すべて*C. symbiosum*であった。形態の特徴は、どちらの群も24時間の培養では辺縁の滑らかな円形、中心がやや隆起した集落で、大きめの集落群は大きさ、外観とも *Bacteroides* に類似していたが、72時間以上の培養では、しだいに辺縁が不規則となった(Fig. 1)。色調は、いずれも白色あるいはやや褐色で不透明であった。*C. symbiosum* 以外の5菌種については集落形態に相違を認めなかった。

2. フットボール型の Clostridium の同定キットによる同定および各菌種のプロファイルの特徴

今回検討した全菌株の同定キット 32A および 20A により得られた菌種名を Table 1 に示した。

C. hathewayi 16株の20Aにおける同定確率は36.4~98.5%、32Aはすべて99.9%と高い同定確率

Fig. 1. Cellular morphologies and colonies of *C. clostridioforme* group and *C. symbiosum*

- Spore stain of *C. hathewayi*
- Gram stain of *C. clostridioforme*
- Gram stain of *C. bolteae*
- Gram stain of *C. citroniae*
- Gram stain of *C. aldenense*
- Gram stain of *C. symbiosum*
- C. clostridioforme* group and *C. symbiosum* on Anaero-Columbia agar with rabbit blood after 72 h of incubation. Colonies of *C. clostridioforme* group (right) are circular with slight irregular edges and attained a diameter of 3-5 mm. In comparison, *C. symbiosum* (left) forms small colony.

Table 1. Identification by use of API 20A and Rapid ID 32A

Species (No. of isolates)	API 20A		Rapid ID32A		No. of isolates
	Profile No.	Species and % ID obtained by API 20A	Profile No.	Species and % ID obtained by Rapid ID32A	
<i>C. hathewayi</i> (16)	46746301	<i>C. clostridioforme</i> 56.0	1	4571040000 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	1
	46756330	<i>C. clostridioforme</i> 49.2	2	4575044000 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	1
	46756331	<i>C. clostridioforme</i> 98.5	2	4577040000 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	5
	46756730	<i>C. clostridioforme</i> 36.4	4	4577044000 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	6
	46756731	<i>C. clostridioforme</i> 62.8	7	4577044020 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	3
	<i>C. clostridioforme</i> (10)	00100020	<i>P. propionicus/avidum</i> 58.0	1	4150000000 <i>C. baratii</i> 49.8, <i>C. clostridioforme</i> 32.6
00604000		<i>Fusobacterium mortiferum</i> 86.1	1	4550000000 <i>C. clostridioforme</i> 56.3, <i>C. beijerinckii/butyricum</i> 27.9	5
40044231		<i>C. clostridioforme</i>	1	4550040000 <i>C. clostridioforme</i> 99.9	2
42144231		<i>C. clostridioforme</i> , <i>B. distasonis</i>	1		
42644030		<i>B. distasonis</i>	1		
44044230		<i>Fusobacterium mortiferum</i> 65.6	1		
44704020		<i>Fusobacterium mortiferum</i> 98.9	1		
46754010		<i>B. distasonis</i> 27.9	1		
46754031		<i>C. clostridioforme</i> 89.0	1		
46754230		<i>C. clostridioforme</i> 11.7	1		
<i>C. bolleae</i> (11)	00000000	—	4	4500000000 <i>C. beijerinckii/butyricum</i> 89.4	3
	00000001	<i>C. histolyticum</i> 51.3	3	4540000000 <i>C. beijerinckii/butyricum</i> 52.0, <i>C. fallax</i> 18.2, <i>C. clostridioforme</i> 16.2	7
	04514331	<i>C. clostridioforme</i> 99.9	1	4750000000 <i>C. tertium</i> 36.6, <i>C. beijerinckii/butyricum</i> 35.4, <i>C. baratii</i> 23.2	1
	20010020	<i>B. ureolyticus</i>	1		
	44104331	<i>C. clostridioforme</i>	1		
	44754031	<i>C. clostridioforme</i> 97.5	1		
	10000010	<i>F. necrophorum/nucleatum</i> 95.9	1	0040200000 <i>F. necrophorum</i> 91.1	1
10100031	<i>C. botulinum/sporogenes</i>	1	0040600000 <i>F. necrophorum</i> 99.8	4	
54104030	<i>P. intermedia/disitens</i> 97.0	1	4040200000 <i>F. necrophorum</i> 84.6	1	
54144031	<i>C. clostridioforme</i>	1			
54554031	<i>C. clostridioforme</i>	1			
54556031	<i>C. clostridioforme</i>	1			
<i>C. aldenense</i> (5)	10000000	<i>F. necrophorum/nucleatum</i> 68.0	1	4100200000 <i>C. clostridioforme</i> 87.7	1
	10454200	<i>B. stercoris/eggerthii</i> 99.9	1	4120200000 <i>C. clostridioforme</i> 96.3	2
	14510201	<i>C. clostridioforme</i>	1	4120600000 <i>C. clostridioforme</i>	2
	50554220	<i>B. stercoris/eggerthii</i>	2		
<i>C. symbiosum</i> (12)	00000000	—	6	0000000000 —	1
	00100000	<i>P. intermedia/disitens</i>	1	0100000000 <i>C. septicum</i> 44.3, <i>C. fallax</i> 26.1, <i>C. botulinum</i> 13.9	11
	40010001	<i>C. cadaveris</i>	1		
	41000000	<i>E. limosum</i> 97.6	2		
	41010001	<i>C. cadaveris</i>	1		
	41014000	<i>P. propionicus/avidum</i> 50.0	1		

Table 2. (Continued)

Species (number of isolates)	Strain No.	API 20A profile No.	IND	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	ESC	CEL	MNE	MLZ	RAF	SRO	RHA	TRE	Spore	Rapid ID 32A profile No.	α -GAL	β -GAL	α -GLU	β -GLU	α -ARA	β -GUR	β -NAG	MNE	RAF	IND	PAL	LGA	PyrA		
<i>C. citroniae</i> (6)	10	54554031	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	0040600000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	11	54556031	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	0040600000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	34	54144031	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	0040200000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	42	10000010	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	0040600000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	45	54104030	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	0040600000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
51	10100031	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	4040200000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>C. aldenense</i> (5)	3	10454200	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	4100200000	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	50554220	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	4120200000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15	14510201	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	4130600000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	10000000	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	4120200000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	50554220	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	4120600000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. symbiosum</i> (12)	1	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	41000000	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	13	41000000	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	40010001	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0000000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	53	00000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	55	41010001	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	59	00100000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	41014000	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0100000000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: IND, indole production; GLU, glucose; MAN, mannitol; LAC, lactose; SAC, sucrose; MAL, maltose; SAL, salicin; XYL, xylose; ARA, arabinose; ESC, esculine hydrolysis; CEL, cellobiose; MNE, mannose; MLZ, melzitose; RAF, raffinose; SOR, sorbitol; RHA, rhamnose; TRE, trehalose; α -GAL, α -galactosidase; β -GAL, β -galactosidase; α -GLU, α -glucosidase; β -GLU, β -glucosidase; α -ARA, α -arabinosidase; β -GUR, β -glucuronidase; β -NAG, β -N-acetylglucosaminidase; PAL, alkaline phosphatase; LGA, leucyl-glycine arylamidase; PyrA, pyroglutamic acid arylamidase; +, positive reaction to biochemical; -, negative reaction.

で *C. clostridioforme* と同定された。 *C. clostridioforme* 10 株は、20A は 4 株で *C. clostridioforme* が得られたが、1 株のみ高い同定確率であり、ほかは *Fusobacterium mortiferum* などのグラム陰性菌に誤同定される傾向が強かった。32A はすべて *C. clostridioforme* の菌名が得られたが、同定確率は 32.6~99.9% でやや低かった。 *C. bolteae* 11 株は 20A で 2 株のみ 97.5~99.9% であったが、ほかは反応性が乏しく同定不能または他菌種に誤同定された。32A は、7 株で *C. clostridioforme* が得られたが同定確率は 16.2% と低く、ほかの *Clostridium* species へと誤同定された。 *C. citroniae* および *C. aldenense* についても 20A では同定確率は極めて低く、他菌種と同定される傾向であった。32A では、 *C. citroniae* は、すべて *Fusobacterium necrophorum* に高い確率で同定されたが、 *C. aldenense* は *C. clostridioforme* と同定される確率が高かった。 *C. symbiosum* は、いずれのキットにおいても *C. clostridioforme* と同定される株はなかった。

次に、各同定キットの主なプロファイルを表 2 に図示した。また、表 3 に文献から引用した鑑別項目について今回の結果と比較した。 *C. symbiosum* 12 株は群として比較的均一なプロファイルを示し、同定キット 32A で β -GAL のみ陽性あるいはすべての反応が陰性、すなわち profile No. が 0100000000 あるいは 0000000000 であり、 *C. clostridioforme* group との鑑別が容易であった。また、インドール非産生菌種の中で *C. symbiosum* のみが α -GAL 陰性であった。20A でも反応性に乏しいが、一貫性がないため *C. bolteae* などとの鑑別はやや困難であった。

C. clostridioforme group のうち、 *C. hathewayi*, *C. citroniae*, *C. aldenense* の 3 菌種については同定キットでの生化学性状が文献 5), 9), 10), 15) に記載された生化学性状 (Table 3) とほぼ一致した。

すなわち、 *C. hathewayi* では、20A における lactose (LAC), salicin (SAL), melezitose (MLZ), raffinose (RAF), cellobiose (CEL), 32A での β -GAL, α -GAL, β -NAG, α -ARA などの陽性率が 100% であった。しかし、ほかの菌種との鑑別に最も有用な項目は、CEL, β -NAG, α -ARA であり、インドール非産生のほかの菌種では、これらの項目はすべて陰性であった。 *C. citroniae*, *C. aldenense* は、すべてインドールを産生したがほかの菌種は非産生であった。これら 2 菌種の最も有用な鑑別項目は rhamnase (RHA) と β -GUR, β -GAL であり、前者が各々、陽性、陽性、陰性、後者が各々、陰性、陰性、陽性であった。

一方、 *C. clostridioforme* と *C. bolteae* については、

20A ではプロファイルが多様であり同一菌種内で共通した反応性を示す項目が少なく、また、両菌種を確実に鑑別可能な性状はなかったが、32A では β -GLU が *C. clostridioforme* ですべて陽性、 *C. bolteae* で 1 株を除いて陰性であった。

考 察

以前のわれわれの検討⁴⁾では、 *C. clostridioforme* group と *C. symbiosum* は、いずれも嫌気性菌の分離意義の高い感染症や材料、すなわち術後感染や虫垂炎に関連した感染症、褥瘡感染、バルトリン腺膿瘍、フルニエ壊疽、子宮瘤膿腫、血液などから高頻度に分離され、分離症例の 60.4% を消化器外科術後の二次感染が占めていた。また *C. hathewayi* は薬剤耐性傾向を示したことや、 *C. clostridioforme* や *C. symbiosum* は血液培養から分離される菌種であることから、これらフットボール型の *Clostridium* は外科領域などの感染症において重要な嫌気性菌と考えられた。

ところが、わが国においては、 *C. clostridioforme* group に対する認識が欧米に比べて極めて低く、形態上の特性から同定不能のグラム陰性桿菌として見過ごされたり、同定キットにより *Bacteroides* や *Fusobacterium* などと誤同定されたりすることが多い。

これらの形態の *Clostridium* は、一般に芽胞はまれにしか形成されないとされるが、今回の検討では、市販の嫌気性菌用血液寒天培地である AC 培地において、この菌群の 43% はコロニーのグラム染色で芽胞の観察が可能であり、特に、 *C. hathewayi* では、62% で芽胞を認めた。したがって、注意深く観察することである程度誤同定を防ぐことが可能であると考えられた。また、芽胞が観察できない場合においても、アルコールによる芽胞選択試験¹⁸⁾、Ryu の試験¹⁸⁾、バンコマイシン (VCM) 感受性、類似の紡錘型 *Fusobacterium* や *Bacteroides* を除外するための変法 FM 培地やバクテロイデス胆汁エスクリン (BBE) 培地での発育試験などを実施すれば推定可能であると考えられた。

C. clostridioforme は前述のように再分類されたが、これらの菌群の構成菌種名のほとんどは市販同定キットのデータベースには収載されていない。また、データベースに収載されている *C. clostridioforme* についても元来多様性のある菌群であるため同定精度が低く、一般微生物検査室での同定は困難であった。そこで、今回、分子生物学的手法などにより同定されたこれらの各菌種について、市販同定キットを利用した生化学性状による簡易な同定法および文献に記載された

Table 3. Comparison of phenotypic characteristics of five species in the *C. clostridioforme* group and *C. symbiosum* between the our isolates and references^{5, 9, 10, 15)}

Phenotypic characteristics	Result for species (No. of strains tested) ^{a)}											
	<i>C. hathewayi</i>		<i>C. clostridioforme</i>		<i>C. bolleae</i>		<i>C. citromitiae</i>		<i>C. aldenense</i>		<i>C. symbiosum</i>	
	Isolates (n=16)	Reference	Isolates (n=10)	Reference	Isolates (n=11)	Reference	Isolates (n=6)	Reference	Isolates (n=5)	Reference	Isolates (n=12)	Reference
Gram stain appearance	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR	GNR
Spores	63		30		55		67		20		17	
Esculine hydrolysis ^{b)}	100	+	70	+	9	-	50		60		0	-
Indole production ^{b)}	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	-
Fermentation of ^{b)} :												
Lactose	100		50	100	27	17	0	1	0	77	0	-
Salicin	100	97	60	100	9	16	0	0	0	8	0	-
Melezitose	100	98	0	0	18	83	0	0	0	0	0	-
Sorbitol	69	+	0	-	0	+	0	0	0	0	0	-
Raffinose	100	96	40	100	18	70	0	0	80	100	0	-
Rhamnose	94	69	70	100	27	71	100	100	0	0	0	-
Glucose	100	+	80		18		67		40		42	
Mannitol	0		0		0		0		0		33	
Sucrose	100		60		27		67		20		0	
Maltose	100	+	60		27		83		60		8	
Xylose	100	+	60		18		33		80		0	
Arabinose	94	+	30		27		33		80		25	
Cellobiose	100	+	0		0		17		0		0	
Mannose	100	+	90		27		67		60		8	
Trehalose	94	+	80		36		83		40		0	
Enzyme reaction ^{c)}												
β -Glucuronidase	100	+	100	+	73	-	100		0		0	
β -Galactosidase	100	100	100	50	100	100	0	0	100	100	92	
α -Galactosidase	100	100	100	50	100	100	17	0	100	100	0	
β -N-Acetylglucosaminidase	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α -Arabinosidase	100	100	0	0	0	0	0	0	80	92	0	
α -Glucosidase	100		70		100		0		0		0	
β -Glucosidase	100		100		9		0		20		0	
Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0	0	67	100	40	92	0	
Leucyl-glycine arylamidase	100		20		0		0		0		0	
Pyroglutamic acid arylamidase	63		0		0		0		0		0	
Gas liquid chromatography												
Butyric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

^{a)} Numbers represent percentages of positive result. +, positive reaction to biochemical; -, negative reaction. ^{b)} Tested by API 20A. ^{c)} Tested by Rapid ID 32A.

性状との比較検討を行った。

まず、同定キットによる同定では、*C. clostridioforme* groupの再分類された菌名は収載されていないが、*C. hathewayi*は、今回のいずれのキットを使用しても*C. clostridioforme*と同定されており問題なかった。しかし、そのほかの*C. clostridioforme* groupの菌種においては、32Aで*C. clostridioforme*と*C. aldenense*が比較的良好に*C. clostridioforme*と同定できるのを除き、全般的に同定確率が低いか、ほかの菌種に誤同定された。*C. clostridioforme* groupと形態的に区別が困難な*C. symbiosum*は、培養時間を72時間に延長することで、コロニーの大きさによる鑑別が可能であり、また、同定キットでの反応の乏しさからも同定が容易であった。

次に、文献で示された鑑別に有用な生化学性状に基づいた同定を試みたところ、*C. hathewayi*、*C. citroinae*、*C. aldenense*については、Warrenらの報告した生化学性状¹⁵⁾、特にLAC、SAL、MLZ、RAF、RHAなどの糖分解やインドール産生を指標にして、同定キット20Aや32Aでの反応を利用した推定同定が可能であった。しかし、*C. bolteae*と*C. clostridioforme*については、生化学性状では鑑別困難であり確実な同定には分子生物学的同定が必要と考えられた。Songらは、*C. clostridioforme*と*C. bolteae*の16S rRNA塩基配列は約3%の相違であるが、2菌種の鑑別は、生化学性状で鑑別可能であり、前者は、sorbitol (SOR)、MLZ陰性、LAC、SAL、esculin (ESC)、 β -GLU陽性、後者は、SOR、MLZ陽性、LAC、SAL、ESC陰性であると述べている⁹⁾。しかし、今回の検討では、これに合致しない株が少なくなかった。すなわち、*C. clostridioforme*については、われわれが分子生物学的手法で同定した株ではLAC、SAL、ESCが陰性の株も少なくなかった。また*C. bolteae*では、SOR、MLZが陰性の株が多かった(Table 3)。Warrenらも、*C. clostridioforme*の反応パターンはLACに対する反応が多様でLACを指標とした*C. clostridioforme*と*C. bolteae*の鑑別は困難だったと述べているが¹⁵⁾、今回の検討でもLACについては結果が多様で、これら2菌種間の鑑別指標とするのは不相当と考えられた。また、インドール陰性の3菌種のうち、*C. hathewayi*が同定キットの多くの試験項目に陽性を示すのに対して、*C. clostridioforme*と*C. bolteae*の2菌種は何れも陽性を示す項目が少なく、*C. hathewayi*と後者2菌種との間に同定キットのプロファイルパターンのはっきりとした差が見られたことについても、今回のわれわれの結果とWarrenらの検討結果は同じであった。Warrenら

は、このようにプロファイルパターンが分かれることに関して、*C. clostridioforme*と*C. bolteae*の2菌種が系統発生的に近い位置関係にあるのに対して*C. hathewayi*が離れた位置にある点について言及している¹⁵⁾。Finegoldらは、*C. hathewayi*、*C. clostridioforme*、*C. bolteae*の3菌種を同定するためのPCR法を報告しているが¹⁶⁾、*C. clostridioforme*、*C. bolteae*の2菌種は薬剤感受性も類似しており⁴⁾、一般の臨床検査室レベルでPCRを行ってこの2菌種を鑑別する意義は低いと考えられる。したがって、インドール非産生の*C. clostridioforme* groupの菌群については、簡易同定キットで容易に鑑別できる反応性の高い*C. hathewayi*と反応性の低い*C. clostridioforme/bolteae*の鑑別でとどめるのが適当と考えられた。インドール陽性の2菌種は、Finegoldらの以前の報告¹⁾では記載されておらず、*C. clostridioforme* groupは3菌種のみに分類されていた。しかし、Warrenらによりインドール産生株はインドール非産生の先の3菌種と表現形が異なること、16S rRNAの塩基配列一致率が、既存の3菌種と96~98%であることから、新菌種として提案された。今回、われわれもこれら2菌種を含めた分離菌の同定を行ったが、インドール陽性のこれら2菌種間は今回の市販同定キットによる検討においても、Warrenが示したようにRAFとRHAの反応などで容易に鑑別でき、これらの鑑別性状で16S rRNAの塩基配列解析による同定とほぼ一致した(Table 2)。

今回試みたように、これらの菌群については分離菌の観察と同定キットの反応を利用することで主だった菌種の推定同定は可能であり、意識して分離同定を心がければ比較的容易に把握可能である。すなわち、3日間の嫌気培養で*Bacteroides*に類似の大きさでややラフな集落が発育した場合は、グラム染色を実施し紡錘状のグラム陰性桿菌であった場合に本菌群の可能性を考える。そしてRyuの試験やVCMによりグラム陽性菌であることを確認して同定キットを利用すれば、再分類された菌種についても同定可能である。特に本菌群の同定は血液から分離された場合には極めて重要である。血液培養のボトルからのグラム染色所見では、*Bacteroides*など嫌気性グラム陰性桿菌の染色性が弱いのに対し、腸内細菌に類似した形態と染色性であるため、多剤耐性菌が含まれる本菌群との鑑別は極めて重要であり、*E. coli*などとの誤解による治療失敗の危険性もある⁴⁾。したがって、これらの菌群は上記のような背景からも今後注意して動向を把握していくべき菌群と考えられた。

文 献

- 1) Finegold, S. M. 2004. Changes in taxonomy, anaerobes associated with humans, 2001–2004. *Anaerobe* 10: 309–312.
- 2) Finegold, S. M., S. S. John, A. W. Vu, et al. 2004. *In vitro* activity of ramoplanin and comparator drugs against anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora. *Anaerobe* 10: 205–211.
- 3) Allen, S. D., C. L. Emery, D. M. Lyerly. 2003. *Clostridium*. p. 835–856. In: Manual of clinical microbiology, 8th ed. (P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, et al. ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 4) 大門康志, 田中香お里, 渡邊邦友. 2008. 本邦で認知度が低い *Clostridium* の臨床材料からの分離状況と薬剤感受性. *感染症学雑誌* 82: 205–212.
- 5) Kaneuchi, C., K. Watanabe, A. Terada, et al. 1976. Taxonomic study of *Bacteroides clostridiiformis* subsp. *clostridiiformis* (Burri and Ankersmit) Holdeman and Moore and of related organisms: Proposal of *Clostridium clostridiiforme* (Burri and Ankersmit) comb. nov. and *Clostridium symbiosum* (Stevens) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 195–204.
- 6) Elsayed, S., K. Zhang. 2004. Bacteremia caused by *Clostridium symbiosum*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4390–4392.
- 7) 荒木光二, 田中香お里, 岡崎充宏, 他. 1996. カルチャーボトルからの分離とその同定に難渋した嫌気性菌血症の1症例. *日本臨床微生物学雑誌* 6: 56–60.
- 8) Decousser, J. W., C. Bartizel, M. Zamni, et al. 2007. *Clostridium symbiosum* as a cause of bloodstream infection in an immunocompetent patient. *Anaerobe* 13: 166–169.
- 9) Song, Y., C. Liu, D. R. Molitoris, et al. 2003. *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 84–89.
- 10) Steer, T., M. D. Collins, G. R. Gibson, et al. 2001. *Clostridium hathewayi* sp. nov., from human faeces. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 353–357.
- 11) Woo, P. C., S. K. Lau, G. K. Woo, et al. 2004. Bacteremia due to *Clostridium hathewayi* in a patient with acute appendicitis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5947–5949.
- 12) Elsayed, S., K. Zhang. 2004. Human infection caused by *Clostridium hathewayi*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1950–1952.
- 13) Linscott A. J., R. B. Flamholtz, D. Shukla, et al. 2004. Fatal septicemia due to *Clostridium hathewayi* and *Campylobacter hominis*. *Anaerobe* 11: 97–98.
- 14) Ramlachan, N., R. C. Anderson, K. Andrews, et al. 2007. Characterization of an antibiotic resistant *Clostridium hathewayi* strain from a continuous-flow exclusion chemostat culture derived from the cecal contents of a feral pig. *Anaerobe* 13: 153–160.
- 15) Warren, Y. A., K. L. Tyrell, D. M. Citron, et al. 2006. *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2416–2422.
- 16) Song, Y., C. Liu, S. M. Finegold. 2005. Multiplex PCR for rapid differentiation of three species in the “*Clostridium clostridioforme* group.” *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 391–395.
- 17) Finegold, S. M., Y. Song, C. Liu, et al. 2005. *Clostridium clostridioforme*: A mixture of three clinically important species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24: 319–324.
- 18) 上野一恵 監修. 1997. 臨床嫌気性菌検査法 '97. 同定検査法. *日臨微誌* 7(S-1): 91–106.

Morphological and Biochemical Identification of Cigar-Shaped Clostridia

Yasushi Daimon,¹⁾ Kaori Tanaka,²⁾ Kunitomo Watanabe²⁾¹⁾ Clinical Laboratory, Kyoto Prefectural Yosanoumi Hospital²⁾ Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

Clostridium clostridioforme has been known to be phenotypically heterogeneous species with cigar-shaped morphology. Recent taxonomic studies have shown that *C. clostridioforme* represents five distinct species in the *C. clostridioforme* group: *Clostridium hathewayi*, *C. clostridioforme*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium citroniae*, and *Clostridium aldenense*. A total of 60 strains isolated in our laboratory as the cigar-shaped clostridia were identified through end-product analysis and 16S rRNA sequencing as follows: *C. hathewayi* (16 strains), *C. clostridioforme* (10), *C. bolteae* (11), *C. citroniae* (6), *C. aldenense* (5), and *C. symbiosum* (12). Biochemical characteristics for those isolates were investigated using commercially available identification kits. *C. citroniae* and *C. aldenense* were distinguished from each other by the results for rhamnose, β -glucuronidase, β -galactosidase (*C. citroniae* : +, +, -, *C. aldenense* : -, -, +, respectively), although both of them were indole positive. *C. hathewayi* was differentiated from other species in *C. clostridioforme* group by the positive reaction of cellobiose, α -arabinosidase, *N*-acetylglucosaminidase. It was difficult to distinguish between *C. clostridioforme* and *C. bolteae* by phenotypic characteristics. *C. symbiosum* was distinguishable from *C. clostridioforme* group in colonial size.