

東部南極大陸, リュツォ・ホルム湾東岸の土壌から分離された 嫌気性菌 (*Clostridia*)

三 和 敏 夫*

Clostridia Isolated from the Soil in the East Coast of Lützow-Holm
Bay, East Antarctica

Toshio MIWA*

Abstract: From the soil (permafrost, moraine, penguins' rookery, lake, coast, etc.) collected in the area around Syowa Station, the Antarctica during 1972-1973, 150 strains of *Clostridium* were isolated and identified according to the VPI manual.

1) *C. perfringens* (28%), *C. sordellii* (22%), *C. bifermentans* (23%), *C. sporogenes* (4%), *C. plagarum* (3%), *C. parafringens* (2%), *C. septicum* (1%) and *C. tertium* (1%) were the principal species found, but 17% of strains remained unidentified.

2) Soil samples from places where contamination by men and animals is scarce were found to contain *Clostridia*.

3) Strains of *C. sordellii* were isolated from samples of many places. Eighty-five percent (85%) of them were obtained from the same soil samples from which strains of *C. bifermentans* were isolated also.

4) Biological properties of *C. sordellii* isolated agreed almost completely with those of *C. bifermentans* except the urease reaction.

5) All strains of *Clostridia* were isolated from the Antarctic soil could not survive the heating at 80°C for 10 minutes.

1. 緒 言

著者は第13次日本南極地域観測隊(1972年1月~1973年1月)に医学研究担当として参加し、南極大陸の昭和基地で1年間越冬観測する機会を得た。

この厳寒な南極地域では、生物にとっても大変生活し難く特殊な生態系を営んでいる。動物は一般に定住できず、夏季(12月~翌年1月)にペンギン、アザラシや海鳥類などが大陸沿岸に出没するのみである。一方、植物では島や岬が夏季にのみ露出するわずかな砂地、湿

* 岐阜大学医学部微生物学教室. Department of Bacteriology, Gifu University, School of Medicine, Tsukasa-machi 40, Gifu-shi 500.

地帯に苔，地衣類や酵母，真菌類などが生育している．南極地域における微生物の分布に関する研究は，EKELÖF(1908)が糸状菌を，DARLING & SIPLE(1941)が細菌 (*Bacillus mesentericus*, *B. subtilis* など) を各々最初に分離，報告した．国際地球観測年 (1957～8) 以後，南極地域に関するわが国の微生物の研究も徐々に着手され，昭和基地周辺の土壌から曾根田 (1961) が酵母菌を，椿 (1961) が糸状菌を各々最初に分離した．その後，各種の検討が加えられ，飯塚らは泥から約 20°C 付近に適温の細菌を分離した．

以上の様に南極大陸の土壌や海泥などから糸状菌，酵母，細菌などが分離されたが，これらの分離菌の多くはいずれも他の大陸から気流に乗って運ばれたのであろうと考えられた．従来から一般に無菌的であると称せられてきた南極地域の空中，あるいは土壌中に如何なる病原菌が存在しているのかまだ明確にされていない．しかも南極大陸の土壌中の嫌気性菌 (*Clostridia*) の分布についての検討はまだなされていない．よって著者は，南極大陸の昭和基地周辺の土壌中の嫌気性菌の分布を研究するにあたって，分離が比較的容易であり，かつ生存に強い有芽胞偏性嫌気性桿菌 (*Clostridia*) を対象とした．研究対象とした土壌については，人や動物などによる汚染がない，あるいは汚染が少ないと考えられる場所，および汚染が当然考えられる場所の土壌などを熟考して検討した．

2. 材料と実験方法

2.1. 検体の採取とその保存法

南極大陸の昭和基地周辺やプリンスハラルド海岸地域の各地から採取し，最近までに隊員達の踏み込みや海鳥類等による汚染が少ないと考えられる場所 (例えば氷の張った湖底土，氷河堆積土) をも含め，約30カ所の土壌を採取した (図 1a および b)．

土壌採取方法は，地表部から約10～20cm 下方の土壌を滅菌シャーレ等に入れ，約-20°C で冷凍保存した．材料の運搬は，常に -20°C を維持し，現在は -80°C の大型冷凍庫に保存中である．

現在までに検査済みの31検体のうち，南極の特殊な自然状況，鳥類の生態，さらに南極観測の初期時代から現在までの日本隊の行動範囲等種々の条件を考慮し，その検体地域の汚染頻度を次の様に3区分した．

①群：隊員の踏み込みが多く，夏季にはペンギン，海鳥類のルッカリー地域があるため比較的汚染されやすいと考えられる地域から14検体採取した．

②群：ペンギン，海鳥類の生息地ではないが夏季には海鳥の飛来や時には隊員の戸外調査

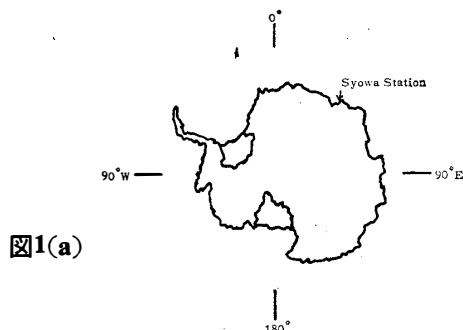


図1(a)

図1(a) 南極大陸

(b) 昭和基地周辺の採集地域。夏季のみ地表が露出する地帯は、黒くぬりつぶしてあり、点で示した地域は常に氷でおおわれている。

Fig. 1(a). The location of the Syowa Station (Japan), in the Antarctica.

(b). Places for sampling in the area around the Syowa Station in the Antarctica. Soil grounds exposed during summer season only are shown in black and other places covered with thick ice layer all the year round in dotted white.

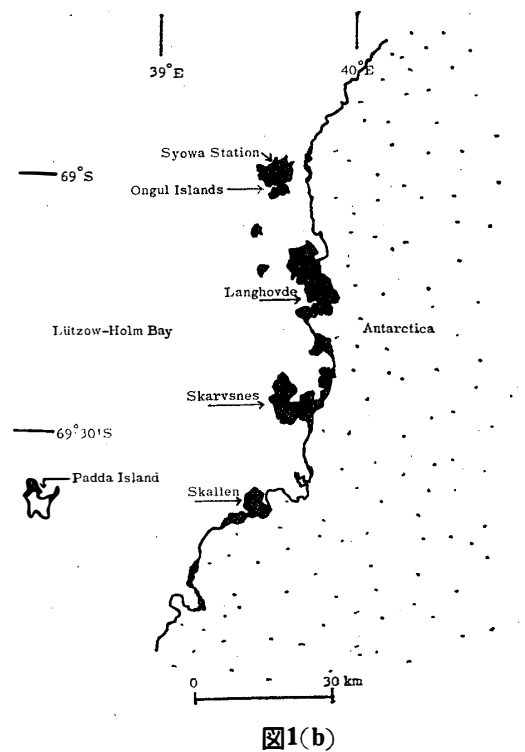


図1(b)

などがあり、そのために汚染されと考えられる地域から9検体採取した。

◎群：大陸氷の下底土が氷河によって運搬・堆積された土砂（モレーン）、あるいは氷の張った湖をボーリングして湖底土を採取した検体などが含まれ、隊員や海鳥類による汚染が極めて少ない、いわゆる処女地とも考えられる様な地域から8検体採取した。

得られた実験成績は、疫学的処理として菌が分離された採取検体数/汚染頻度別総採取検体数の百分率で示した。

2.2. 土壌から *Clostridium* 属の分離方針

検体は、室温で解凍後約2gの土壌を無菌的に高層培地に分注し、表1のごとく分離を行った。分離された偏性嫌気性菌はGAM半流動高層培地で増菌継代培養を続ける一方、変異を防止するために10%スキムミルク中で -80°C の大型冷凍庫に保存している。

2.3. 同定方針

分離された偏性嫌気性菌は、表2のごとく同定を行った。生物学的性状検査の判定は、主として当教室常法とVPI manualに従った。

表 1 *Clostridia* 分離の方針
Table 1. Guideline for isolation of *Clostridia*

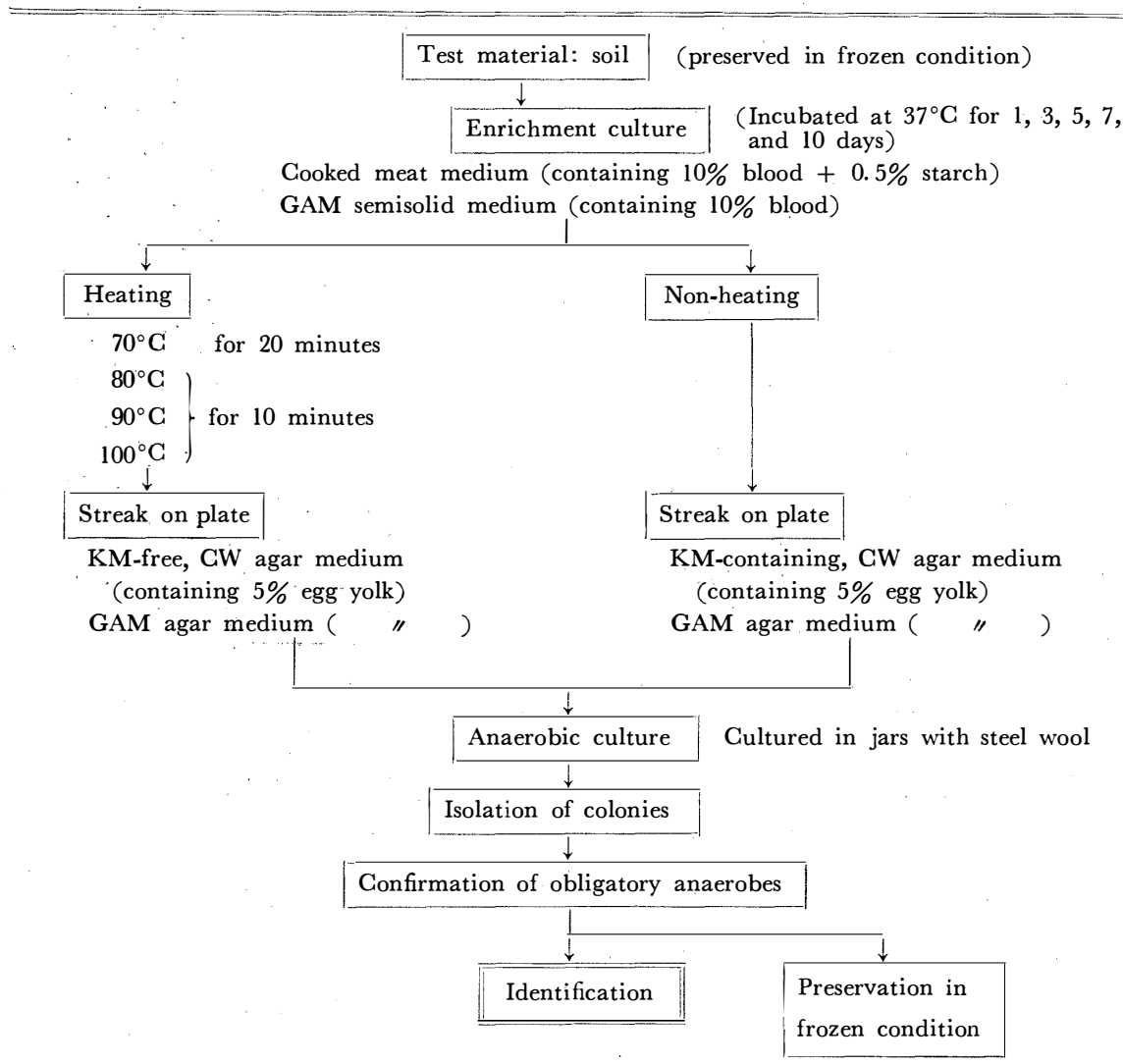
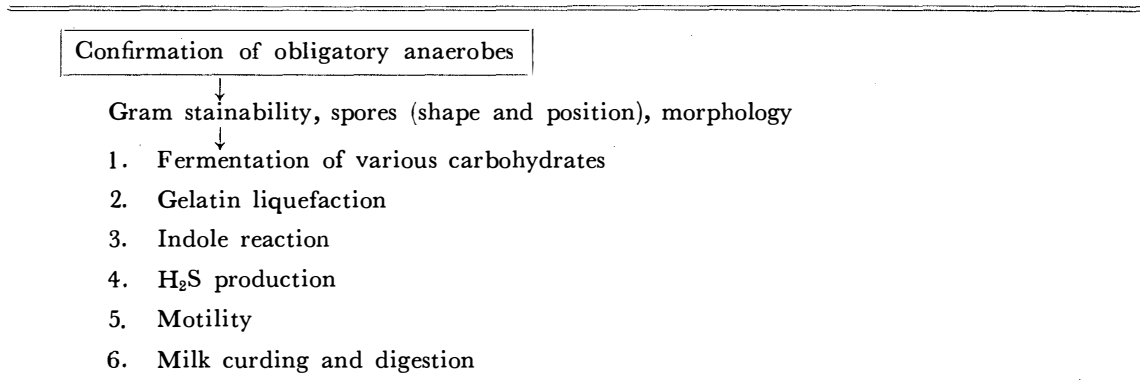


表 2 *Clostridia* 同定の方針
Table 2. Guideline for identification of *Clostridia*



7. Findings on egg yolk-agar medium (lecithinase reaction and lipase reaction)
8. Test of neutralizing lecithinase reaction with anti- α toxin serum
9. Findings on blood-agar medium (green coloration of colony, hemolyzed zone)
10. Analysis of volatile fatty acids and fixed fatty acids (gas chromatography)
11. Lethal toxicity and pathogenicity to mice
12. Urease reaction
13. Thermostability test
14. Other properties were also examined when necessary

3. 実験成績

表3に示すごとく南極由来の土壌から *Clostridia* が高頻度に分離出来た。現在までに同定された菌種は8菌種であった。分離された *Clostridia* のうち *C. sordellii* 以外の菌種は全て④地域から高率に分離されたが、*C. sordellii* では③地域に最も多く分離された。*C. perfringens* は④地域のみならず、③および⑤地域にも比較的多く分離された。人や動物などによる汚染が考えられない様な⑤地域の土壌からも *Clostridia* が検出された。

分離された *Clostridia* の分布は表4に示した。*C. perfringens* (全分離菌株総数の28%) (図2), *C. sordellii* (22%) (図3), *C. bifermentans* (23%) が各地の土壌から多く分離された。その他の菌種は極めて少なく *C. sporogenes* (4%) (図4), *C. plagarum* (3%), *C. paraperfringens* (2%), *C. septicum* (1%), *C. tertium* (1%) が検出された。

これら南極由来の8菌種の *Clostridia* のうち特に *C. sordellii* および *C. paraperfringens*

表3 南極大陸の土壌から分離された *Clostridia*
Table 3. Isolation of *Clostridia* from the Antarctic soil.

Degree of contamination of sampling places by men and animals		④ group Sometimes	③ group Seldom	⑤ group Almost nothing
Number of soil samples		14	9	8
Species isolated	<i>C. perfringens</i>	79%*	67%	50%
	<i>C. sordellii</i>	43	56	25
	<i>C. bifermentans</i>	71	56	38
	<i>C. sporogenes</i>	8	10	13
	<i>C. paraperfringens</i>	8	10	10
	<i>C. plagarum</i>	15	7	0
	<i>C. septicum</i>	0	10	0
	<i>C. tertium</i>	8	0	0
	Unidentified strains	57	78	63

**C. perfringens* were isolated from 11 of 14 (79%) soil samples.

Table 4. Distribution of Clostridia isolated from the Antarctic soil (*Provisional name).

Species	Sampling places	
<i>C. perforans</i>	East Ongul Island	+
<i>C. sordidii</i>	West Ongul Island	+
<i>C. bifurcata</i>	Rumapa Island	+
<i>C. sporogenes</i>	Padda Island	+
<i>C. paraperforans</i>	Ongulkalven Island	+
<i>C. plagarum</i>	Continental coast	+
<i>C. septuaginta</i>	Langhove	+
<i>C. tertium</i>	Skarvsnes	+
Unidentified strains	Skallen	+

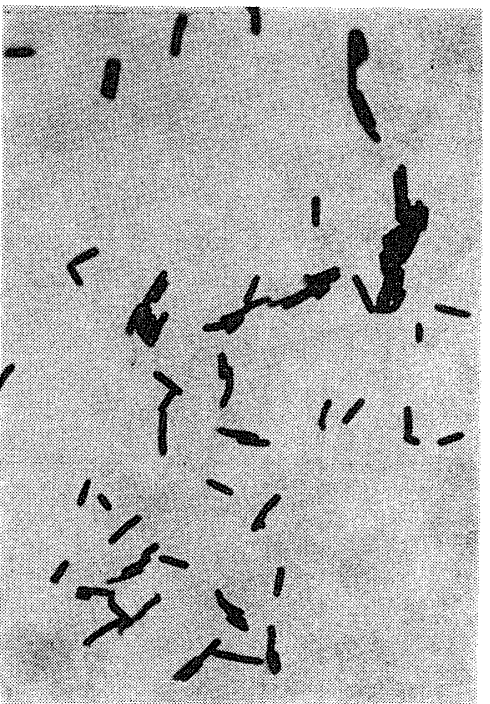


図 2 *C. perfringens* (JAM*-314-a) が壊疽をひき起こす *C. perfringens* (JAM*-314-a).



図 3 日本の土壌からは分離されていない南極土壌由来の *C. sordellii* (JAM-20).

Fig. 3. C. sordellii (JAM-20) isolated from the Antarctic soil. It has not been isolated from the Japanese soil.



図 4 南極土壌から分離された *C. sporogenes* (JAM-239). 偏在位の芽胞をもったグラム陽性の桿菌を示す.

Fig. 4. C. sporogenes (JAM-239) isolated from the Antarctic soil. Gram-stain shows large Gram-positive bacilli, some with subterminal spores.

は、現在までに日本の土壌は勿論自然界の土壌検体から分離された報告例はまだない。また一般に自然界から分離し難いとされている。しかし、著者が、*C. sordellii* を南極由来の土壌から多く分離したことは注目すべきことである。またこの *C. sordellii* は urease 反応を除いて生物学的性状は、*C. bifermentans* とほとんど一致した。

同定困難な *Clostridia* は全分離菌株総数の約17%を占め、各地の土壌検体から検出された。

これらの菌株の中には、*C. oceanicum*, *C. felsineum*, *C. butyricum*, *C. difficile* によく似た菌株が含まれていたが、VPI manual の生物学的性状に満足せず今後の検討を必要とするので菌種未同定菌株として一括した。

南極由来の土壌から分離された *Clostridia* の耐熱性について検討した結果、土壌検体を非加熱で分離した場合には、土壌 1g 中に 3～4 種の菌種が分離出来た。ところがこの検体を 80°C10 分間の加熱処理後では、平板培地上に集落形成がほとんど認められなかった。すなわち、南極由来株の *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. bifermentans* など主たる菌種はいずれも 80°C10 分間以上の耐熱性菌株はみられなかった。

分離された *Clostridia* のうち病原性が疑われる菌種についてマウスを用いて検討した。*C. perfringens* と *C. septicum* のみがほぼ24時間内にマウスを全例へい死させた。*C. sordellii* や *C. bifermentans* ではマウスに対する病原性は認められなかった。*C. perfringens* によるへい死直後のマウスは、剖検所見で腹腔内に悪臭ある腐敗ガス貯溜、肝臓は軽度軟化状で弾力性貧、接種部位の大腿部筋肉は融解および壊死に陥り、これらの所見はガス壊疽菌群による所見と全く一致した。

4. 考 察

南極由来の土壌から分離された細菌については、*Bacillus* の分離報告があるのみで嫌気性菌 (*Clostridia*) の分布の報告は未だない。

一方、日本を始め諸外国において、自然界の一般土壌中の *Clostridia* の分布に関する研究は、ある特定の *Clostridia* (*C. perfringens*, *C. tetani*, *C. novyi*, *C. bifermentans* など) の分離を目的にした報告例が主である。

著者は南極由来の土壌中の *Clostridia* の分布を検討した所、南極の土壌中にも *Clostridia* が多く分布していた。その分離された菌種の中で日本の土壌から全く分離されていない *C. sordellii* が、南極由来の土壌から多数検出されたことは興味深い。しかも分離された *C. sordellii* の85%は、*C. bifermentans* と同一土壌検体から同時に検出された。このことはこの両菌種の異同について古来から論争されて来た分類学的な問題に関心をひくことである。

他方、日本の土壌中に多く分布している *C. sporogenes* は、南極由来の土壌からわずか4%しか分離されず、この点についても在来の報告とは著しく異なる。また日本の土壌中に最も広汎に且つ高頻度に分布している *C. perfringens* は、南極由来の土壌にも最も多く分離された。このことは *C. perfringens* が人や動物の腸管内常在菌の一種であることからペンギン

その他の動物による新しい汚染，または他の大陸から気流に乗って飛来汚染をも全く否定することは出来ない．しかし，採取方法および採取場所の状況判断から，すなわち，少なくとも動物などによる汚染が全く考えられない様な場所の土壌からも分離されたので，本菌らの由来を直ちに動物などによって新しく汚染されたと結びつけることはできない．著者はむしろはるかに古い時代からその土壌中に存在していたものと考えたい．その理由としては次に記す如く多くあげることが出来る．南極由来の *C. perfringens*, *C. sordellii*, および *C. bifermentans* の諸性状（耐熱性，芽胞形成性，炭水化物分解能試験，化学療法剤に対する感受性など）が，保育菌株および岐阜市周辺由来の土壌から分離された菌株と明らかに異なることもこれを裏付けるものであろう．

また南極由来の土壌からは 80°C10分間以上の耐熱性の *Clostridia* は，著者の今回の実験では検出できなかった．盛永（1962a, b）は人などの汚染が少ない地域の土壌，あるいは年代が古い土壌から分離された *C. perfringens* には，耐熱性菌株がないと報告している．今回の著者の成績と盛永の報告と類似していることは興味あることである．

さらに分離された南極由来の *Clostridia* の生物学的性状をみると，各菌種の変異菌株と考えられるものが多数検出された．これらの変異菌株が南極地域の特有な自然環境で変異を起こしたのか，あるいは菌自体の original な性状が南極由来株のそれであって現在われわれが人，動物および一般土壌などから分離している菌株がむしろ変異菌株であるのかもしれない．

今回，著者が検査した南極由来の土壌中にガス壊疽菌が検出されたり，日本の土壌などから分離できない菌種が検出されたこと，さらにこれらの分離菌株が従来臨床検体や一般土壌などから分離された *Clostridia* と大変異なった性状が認められたことは，病原菌の分類学や遺伝学的検討に示唆するものが多く極めて重要な成績である．

5. 結 論

南極大陸の昭和基地周辺地域から採取した土壌検体（凍土，モレーン，ペンギンルッカリー附近，湖底泥など）から有芽胞偏性嫌気性桿菌（*Clostridia*）を計 150 株分離し，そのうち 124 株を同定した．

1) *C. perfringens* 42 株 (28%), *C. sordellii* 33 株 (22%), *C. bifermentans* 35 株 (23%) が多く分離され，次いで *C. sporogenes* 6 株 (4%), *C. plagarum* 5 株 (3%), *C. parapernfringens* 3 株 (2%), *C. septicum* 1 株 (1%), *C. tertium* 1 株 (1%) であった．

- 2) 人や動物などによる汚染が考えられない様な場所の土壌からも *Clostridia* が分離された。
- 3) *C. sordellii* は各地の土壌から多数分離され、その85%に *C. bifermentans* と同一土壌検体から検出された。
- 4) *C. sordellii* と *C. bifermentans* の生物学的性状は urease 反応を除いて他の性状はほぼ一致した。これら両菌種は本来同一菌種であろうと提起される成績が得られた。
- 5) 分離された *Clostridia* では、80°C10分間以上の耐熱性菌株は検出されなかった。

謝 辞

終始ご懇篤なるご指導とご校閲を戴いた鈴木祥一郎教授、上野一恵助教授に深謝致します。また本研究の機会を与えて下さった吉村寿人兵庫医大教授、今西錦司前岐阜大学学長、本学の広野巖教授に深く謝意を表します。さらに南極で土壌検体採取に際し、深いご理解とご協力を仰いだ川口貞男第13次越冬隊長ほか隊員諸兄に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は昭和48年11月第10回日本細菌学会中部支部会および昭和49年4月第47回日本細菌学会総会において発表した。

文 献

- DARLING, C. A. and P. A. SIPLE (1941): Bacteria of Antarctica. J. Bacteriol., **42**, 83-98.
- EKELÖF, E. (1908): Bacteriologiske studien während der schwedischen Südpolar-Expedition. Stockholm Wiss. Ergeb. schwed. Südpolar-Exped. 1901-1903, **7**, 120.
- GOTO, S., J. SUGIYAMA and H. IIZUKA (1969): A taxonomic study of Antarctic yeasts. Mycologia, **61**, 748-774.
- HOLDEMAN, L. V. and W. E. C. MOORE (1972): Anaerobic Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, 67-89.
- IIZUKA, H., H. OKAZAKI and N. SETO (1969): A new sulfate-reducing bacterium isolated from Antarctica. J. Gen. Appl. Microbiol., **15**, 11-18.
- 小酒井望・鈴木祥一郎 (1968): 嫌気性菌と嫌気性菌症. 医学書院, 東京, 19-135.
- 松田達郎 (1964): 南極東オングル島におけるセン類群落の微気象について. 南極資料, **21**, 12-24.
- 三和敏夫 (1973): 医学. 日本南極地域観測隊第13次隊報告 (1971~1973), 南極地域観測統合推進本部編, 118-120.
- 三和敏夫・渡辺邦友・望月 皐・二宮敬宇・上野一恵・鈴木祥一郎 (1974a): 南極・昭和基地周辺地域の土壌中の嫌気性菌 (*Clostridium* 属) の分布. 第4回嫌気性菌感染症研究会講演記録, エーザイ, 東京, 50-52.
- 三和敏夫・渡辺邦友・望月 皐・二宮敬宇・上野一恵・鈴木祥一郎 (1974b): 南極地域の土壌から分離された嫌気性菌の薬剤感受性の比較検討. 日本化学療法学会第22回総会誌, **69**.

- MIWA, T. (1975) : *Clostridia* in soil of the Antarctic. Japan J. Med. Science and Biology (in print).
- 盛永五作・吉沢潤 (1962a) : 黒部川流域ウェルシュ菌の検索. 日本災害医学誌, **10**, 158-162.
- 盛永五作・吉沢潤 (1962b) : *C. welchii* の熱抵抗問題について. 日本細菌学雑誌, **17**, 899-902.
- NISHIDA, S. and M. NAKAGAWARA (1964) : Isolation of toxigenic strains of *C. novyi*. J. Bacteriol., **88**, 1636-1640.
- NISHIDA, S., K. TAMAI and T. YAMAGISHI (1964) : Taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. J. Bacteriol., **88**, 1641-1646.
- 納富亨 (1959) : 土壌内嫌気性菌の分布検索追加. 長崎医学会雑誌, **34**, 513-515.
- SANADA, I. and S. NISHIDA (1965) : Isolation of *C. tetani* from soil. J. Bacteriol., **89**, 626-629.
- SONEDA, M. (1961) : On some yeasts from the Antarctica region. Jap. Antarct. Res. Exp. **15**, 10.
- 杉山純多・杉山佳子・飯塚広 (1967) : 南極 Victoria Land の Dry Valley 調査報告. III. 南極の菌類に関する研究. 南極資料, **28**, 15-22.
- 高木哲郎 (1960) : 土壌中の *Clostridium* の研究. 岐阜医紀要, **8**, 1763-1772.
- TUBAKI, K. (1961) : On some fungi isolated from the Antarctic materials. Jap. Antarct. Res. Exp., **14**, 9.
- 上野一恵 (1964) : 国産スチール・ウール (steel・wool) による嫌気性培養法の実際. メディヤサークル, **57**, 1-7.
- YAMAGISHI, T., S. ISHIDA and S. NISHIDA (1964) : Isolation of toxigenic strains of *C. perfringens*. J. Bacteriol., **88**, 646-652.

(1975年1月8日受理, 4月11日改訂稿受理)