

ハチミツのボツリヌス検査において検出された *Clostridium limosum* の同定報告

河野喜美子・吉野修司・大浦裕子・山田 亨・深江弘恵・堀田 剛・山本正悟
見理 剛*¹・高橋元秀*¹

Report on the identification of *Clostridium limosum* detected in the honey

Kimiko KAWANO, Shuji YOSHINO, Yuko OURA, Toru YAMADA, Hiroe FUKAE,
Takeshi HORITA, Seigo YAMAMOTO, Tsuyoshi KENRI*¹, Motohide TAKAHASHI*¹

Abstract

The examination for *Clostridium botulinus* (*C.botulinus*) in a honey was carried out in March, 2010. One experimental mouse died after the supernatant of CMGS medium culture had been injected. Therefore, we examined whether this depended on *C.botulinus* or not. The Symptom in the mouse was different from a symptom with *C.botulinus*, and this symptom was defended by none of antitoxin of A,B,C,D,E,F toxin types of *C.botulinus* and antitoxin of *Clostridium perfringens*. In addition, PCR was performed for bacteria in culture using primers for genes of A,B,C,D,E,F,G toxin types of *C. botulinus*, and none of these genes were detected. From these results, we found that the cause which killed mouse was not *C.botulinus*, because both of *C.botulinus* toxins and their genes were not detected from cultures.

Then, in order to identify the causative agent which killed mice, the cultures were inoculated in blood agar and incubated anaerobically at 37 °C. Consequently two type colonies of hemolytic and non-hemolytic were obtained. When supernatants of CMGS cultures of these colonies were injected into mice, cultures of hemolytic colony caused symptoms in mice, but cultures of non-hemolytic colonies caused no symptoms. In addition, the hemolytic colony was identified as *Clostridium limosum* by nucleotide sequence analysis of 16S r RNA gene. These results indicated that the cause of lethality in mice was *Clostridium limosum*. In addition, by literatures, enzymes produced by *Clostridium limosum* (such as collagenase and lecithinase), were supposed to be the causative agents which showed lethality to mice.

Key words : *Clostridium botulinus*, *Clostridium limosum*, honey

はじめに

ハチミツにはボツリヌス芽胞が含まれることがあり、これを乳児が摂取すると、芽胞は乳児の体内で発芽・増殖し、ボツリヌス毒素を作り、乳児ボツリヌス症¹⁾を引き起こす。これは、乳児の場合、腸管内の微生物叢がまだ不安定で、ボツリヌス菌の定着と増殖が起りやすいため

と考えられている。そのため、1歳未満の乳児には、ハチミツを与えないように指導することが厚生労働省から通知されている(昭和62年)。

宮崎県では、毎年1回、ハチミツのボツリヌス菌検査を実施している。平成22年3月に搬入されたハチミツ1検体中に、マウスに致死性を示す物質が認められ、ボツリヌス毒素の存在が疑われた。そのため、当検体について、ボツリ

*1 国立感染症研究所 細菌第2部

ヌス毒素の検査およびその他のマウス致死性物質の検査を行ったので、その経過と結果および検査上の問題点を報告する。なお、マウスの死亡原因がボツリヌス毒素か否かの確定、およびマウス致死毒産生菌の分離・同定については、国立感染症研究所（国立感染研）に依頼し結果を得たものである。

材料と方法

1. 材料

宮崎県内で、平成22年3月に収去されたハチミツ1検体を材料とした。

2. 検査方法

食品のボツリヌス検査では、毒素の検査が菌検索に優先することから、毒素の検出を中心に検査を実施した（図1）。またボツリヌス陰性時のマウス致死性物質の検出方法も併せて示した。

1) マウス毒性試験

ボツリヌス毒素の検出は、阪口の方法²⁾に準じ、図1に示した方法で行った。

すなわち、ハチミツ20gを滅菌水100mlと混合し、遠心後の沈渣を2mlに懸濁したものを試料原液とした。試料は、原液のほか、10倍希釈液、100倍希釈液を作成し、各希釈試料をCMGS培地（ブドウ糖・可溶性デンプン添加クックドミート培地）2本ずつに接種し、2希釈系列の試料接種培地を作成した。2系列のうち、1系列は非加熱のまま、他の1系列は80℃15分加熱後、30℃で1週間、嫌気培養した。菌の発育（濁り）が見られた培地の培養液の遠心上清をトリプシン処理した後に5倍希釈し、マウス2匹に0.5mlずつ接種した。マウスの症状および生死を4日間観察し、ボツリヌス毒素の有無を判定した。

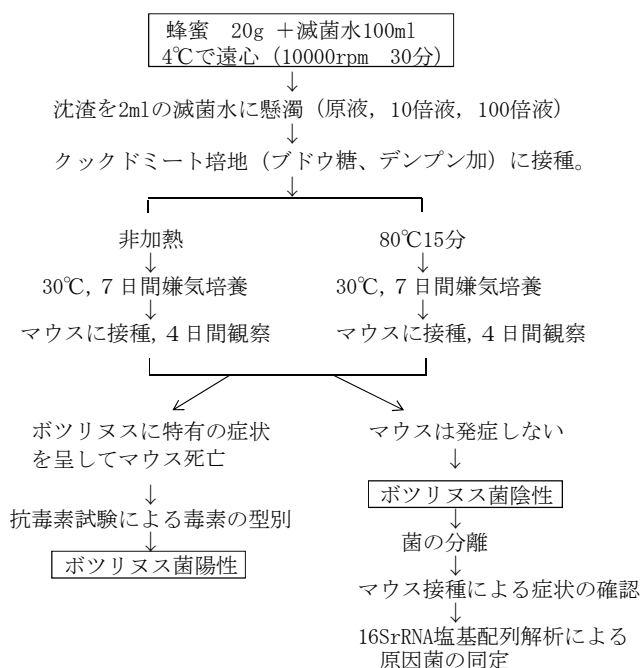
*マウスのボツリヌス様症状：腹壁の振動、腹壁の陥凹が見られ、脚弱、全身まひが起り、呼吸困難によって斃死する。ふつう、6～24時間以内に斃死するが、毒素量が多いほど斃死時間が短い。臨床症状無しにマウスが斃死した場合は、ボツリヌス毒素が存在する証拠にはなら

ない。

2) 抗毒素試験

マウス毒性試験において、ボツリヌス様の症状を呈してマウスが死亡した場合は、ボツリヌス毒素の確定および型別のため、検査試料を用いて抗毒素血清による中和試験を実施する。すなわち、あらかじめ各型の抗毒素血清0.2ml（各抗毒素接種群、抗A、抗B、抗C、抗D、抗E、抗F）をマウスへ接種し、その直後～30分以内に検査試料0.5mlを接種して、マウスの症状お

図1 ハチミツのボツリヌス菌検査法
（陰性の際の、他の致死性物質検査法も含む）



および生死を観察し、ボツリヌス毒素を防御できる抗毒素の型を調べた。抗毒素で防御された毒素の型をボツリヌスの型と決定する。対照として、検査試料を、無処理のまま0.5ml（無処理群）、および100℃10分の加熱処理後に0.5ml（100℃加熱群）マウスへ接種し観察した。なお、抗毒素血清は、冷凍保存されていた診断用抗毒素（平成13年千葉県血清研究所から購入）を使用書に従って使用した。

3) PCR

検体試料のCMGS培養菌およびGAM卵黄寒天培養菌について、ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRを実施した。当所（宮崎県衛環研）では、市販のプライマー（ボツリヌス毒素検出用

Primer Set, TAKARA) を用い使用書に従い実施した。国立感染研では、武士らにより報告された方法に従って実施した。

4) マウスが死亡した培養液からの菌の分離および分離菌のマウス致死性の確認 (国立感染研実施)

検体試料の CMGS 培地培養菌を血液寒天に塗布し、37°Cで嫌気培養して菌の分離を行った。分離菌は、マウス接種によってマウスへの致死性を確認した。

5) 16S rRNA 遺伝子配列解析による分離菌の同定 (国立感染研実施)

分離菌の同定のため 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析³⁾を行った。3種類のプライマーセット A,B,C を用いて 16S rRNA 遺伝子の増幅を行い、良好な増幅産物について塩基配列解析実施後、データベース検索により菌種の同定を行った。

結 果

1 ハチミツ中のボツリヌス毒素および毒素遺伝子の検出

1) マウス毒性試験およびボツリヌス抗毒素試験によるボツリヌス毒素の検出結果

検体の CMGS 培地培養上清を 1/5 希釈しマウスに接種した結果は表 1 に示すとおりである。最初の試験では、接種 3 日後までは全マウスが生存していたが、4 日後に、80°C15 分加熱検体原液の培養液を接種した 2 匹中 1 匹が死亡した。死亡時および死亡直前の症状を観察することができなかったため、当該検体 (No.1)のみを再度 6 匹のマウスに接種したところ、5 匹は検体接種後 2 日～7 日で発症・死亡、他の 1 匹は無症状のまま生存した。症状は、腹部が少しへこんだ感じがあり腹部に異常があるように見えた。発症後は元気がなくなりじっとしていることが多くそのまま衰弱して死亡した(図 3)。

マウスの発症にバラツキがあり、症状も典型的なボツリヌス症状ではなかったが、上記試験結果のみでは、マウスの死亡原因がボツリヌス毒素であるか否かを判断できなかった。そこで、ボツリヌス毒素の存在を確認するため、ボツリ

ヌス抗毒素試験を実施した。培養上清の 1/5 希釈液を用いた試験の結果は表 2 のとおりである。各群の抗毒素を接種したマウスは、すべての群で 2 匹中 1-2 匹死亡(ただし、抗 C1 接種マウスは、3 月 11 日の試験で 2 匹とも死亡せず、再試験を実施したところ、2 匹中 1 匹が死亡した)し、すべての抗毒素でマウスの死亡を防御できなかった。しかし、マウスの発症・死亡の不確かさのため試験に再現性が得られず、上記試験結果からは、ボツリヌス毒素を完全には否定することができなかった。

そこで、上記培養液 (No1) およびその継代培養液 (No.2) を国立感染研へ送付し、培養液中のボツリヌス菌および毒素の確認検査を依頼した。感染研では、これらの送付培養液を、さらに CMGS 培地で 37°C3 日間嫌気条件で増菌培養し、培養液上清を 0.4 μm メンブランフィルターで濾過後に、その原液および 10 倍希釈液についてマウス毒性試験を実施した。結果は表 3 のとおりである。培養上清を原液でマウスの腹腔内に注射すると、約 2 時間後には症状が出現した。見た目は腹部が弛緩して少しへこんでいるように見え、ボツリヌス毒素による症状とやや似ていた。しかし、マウスに触れてみると、腹部をさわられることに過敏になっており、かなり痛みを感じているように見えた(ボツリヌス毒素による場合はこのような反応は見られない)。接種マウスは、すべて、約 5 時間～翌日までに死亡した。死亡マウスを解剖すると、腹部皮下組織および腹腔内に出血が見られた。しかし、培養液上清を 10 倍希釈してマウスに接種すると、上記症状はほとんど現れなかった(図 3)。ボツリヌス毒素では、数時間でマウスに致死性を示す毒素量を 10 倍希釈しただけで、マウスに症状を起こさなくなるようなことはないと考えられる。

さらに、培養上清原液を用い抗毒素試験を実施した結果、表 3 に示すように、マウスの発症は、A,B,C,D,E,F 型ボツリヌス抗毒素、*Clostridium perfringens* 抗毒素のいずれでも防御できなかった。

以上から、今回検出されたマウス致死性物質は、ボツリヌス毒素(A～F)あるいは C

perfringens 毒素ではないと判定された。

2) 培養菌のボツリヌス毒素遺伝子検出 (PCR)

検体の CMGS 培地培養菌および GAM 卵黄培地培養菌について、ボツリヌス A,B,C,D,E,F,G 型毒素遺伝子を標的にした PCR を実施したがこれらの遺伝子はすべて検出されなかった

(図 2)。

1), 2) の結果より、検体の CMGS 培地培養液から、ボツリヌス毒素およびボツリヌス毒素遺伝子は検出されず、今回マウスが死亡した原因はボツリヌス毒素(A~G)ではないと判明した。

2 マウス致死性物質を産生する菌の分離および分離菌の同定結果 (国立感染研実施)

1) 菌の分離

CMGS 培養液中に存在する菌を分離するため、培養液を血液寒天に接種したところ、溶血性のコロニーと非溶血性コロニーの 2 種類が得られた (図 4)。これらのコロニーを再度 CMGS 培地で培養しその培養上清をマウスへ接種したところ、溶血性コロニーの培養菌でマウスが発症し、非溶血性コロニーの培養菌ではマウスは発症しなかった (表 4)。従って、溶血性コロニーがマウス致死毒を産生する菌であると判明した。

2) 16S r RNA 遺伝子解析による菌の同定

血液寒天の溶血性コロニーおよび非溶血性コロニーについて、16S r RNA 遺伝子増幅用の 3 種類のユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、その増幅産物の塩基配列を決定しデータベース解析したところ、溶血性コロニーは、*Clostridium limosum* (*C.limosum*)、非溶血性コロニーは *Bacillus thermoamylovorans* と同定された (図 5)。

1)2)の結果から、マウスに致死性を示したのは *C.limosum* であり、文献検索により、*C.limosum* が産生する酵素類がマウスへ致死性を示したものと推定された。

なお、*C.limosum* は、臨床検体から時々分離されることはあるが、ヒトの病気の原因となった報告はない。

考 察

ボツリヌスの検査法として、最も信頼性が高く、世界的に実施されている方法は、マウス腹腔内注射法によるマウス毒性試験である。この方法で 10~100 pg/ml のボツリヌス毒素を検出することができる。また、ボツリヌス症が疑われる場合、ボツリヌス毒素の検索とともに通常ボツリヌス菌の分離を行うが、菌の分離はしばしば成功しないことがある。PCR については、ボツリヌス菌には、サイレント遺伝子 (毒素遺伝子が存在するが、毒素産生が確認されない) の存在が知られていること等から、PCR 法単独ではボツリヌス毒素産生能の有無を決定できず、最終的にはマウス毒性試験によって毒素産生性の有無を決定している。しかし、PCR 法は、培養液中の菌の存在や、大量の分離株の毒素産生性をスクリーニングする場合に有効である。このように、ボツリヌス検査においては、現在のところマウス毒性試験が必須である。しかし、今回のようにマウスはボツリヌス菌以外の原因で死亡することがあり、その場合、その後の検査が煩雑になり、判定に時間を費やす。また、緊急検査の場合は、マウスの確保がネックになる。これらのことから、マウス毒性試験法に匹敵する感度や精度を有し、マウスを使用しない方法の開発が切望される。

食品のボツリヌス検査についての当所の標準作業手順書 (SOP) は、典型的なマウスの症状を呈するボツリヌス菌を想定して作られている。すなわち、ボツリヌスの同定は、①マウスがボツリヌス特有の症状を呈して死亡すること (マウス毒性試験)、②ボツリヌス毒素の型に対応した抗毒素で発症が防げること (抗毒素試験) の 2 方法で実施してきた。逆に、ボツリヌスを否定する場合は、この 2 つの点を否定することが必要である。ところが、今回は、マウス毒性試験も抗毒素試験も「マウスの発症および死亡」という指標がばらつき、試験に再現性が得られなかった。そのため、ボツリヌス毒素の存在を否定するために、多くの時間を費やしてしまうことになった。確定検査を実施した国立感染研では、濃い濃度の培養液をマウスに接種し、マウスの発症が確実になり、かつ発症時間も短縮され、症状の観察および抗毒素試

験がスムーズに実施された。今後は、SOPの中に、ボツリヌス菌を確実に確定(否定)できる方法(再試験時のマウスへの接種濃度、PCRの有効活用など)を取り入れることを検討したい。

まとめ

平成22年3月に搬入されたハチミツのボツリヌス菌検査において、ハチミツをCMGS培地で嫌気培養した培養液の上清をマウスに接種したところ、1検体においてマウスが死亡した。これがボツリヌス菌を原因とするものであるか否かを検討した。発症したマウスの症状は、ボツリヌス症状とは異なっており、また、この症状は、A,B,C,D,E,F型ボツリヌス抗毒素および*Clostridium perfringens*抗毒素のいずれでも防御できなかった。また、培養菌について、ボツリヌスA,B,C,D,E,F,G型毒素遺伝子を標的にしたPCRを実施したがこれらの遺伝子はすべて検出されなかった。以上のように、検体の培養液からボツリヌス毒素およびボツリヌス毒素遺伝子は検出されず、今回マウスが死亡した原因はボツリヌス菌でないことが判明した。

そこで、マウスを死亡させた原因物質を特定するために、培養液を血液寒天に接種し、37℃で嫌気培養したところ、溶血性のコロニーと非溶血性コロニーの2種類が得られた。これらのコロニーのCMGS培地培養上清をマウスへ接種したところ、溶血性コロニーの培養菌でマウスが発症し、非溶血性コロニーの培養菌では発

症しなかった。また、この溶血性コロニーは、16S r RNA 遺伝子の塩基配列解析により *C. limosum* と同定された。これらの結果から、マウスに致死性を示した原因は *C. limosum* であると判明し、*C. limosum* が産生する酵素類がマウスへ致死性を示した原因物質であると推定された⁴⁾。

謝 辞

ボツリヌス菌の分離培養法についてご教授いただいた、日本分析センターの浅尾努博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：ボツリヌス症 2008年1月現在, IASR, 29(2), 35-36, (2008)
- 2) 阪口玄二：蜂蜜中のボツリヌス検査法, 地研NEWS, 67, 35-36, (1987)
- 3) 佐々木次雄 他：新GMP微生物試験法, 128-137, じほう(東京都), (2008)
- 4) Cato EP, Cummins CS, Smith LDS: *Clostridium Limosum* andre in Prevot 1948, 165 Amended description and pathogenic characteristics, International Journal of Systematic Bacteriology, 20(3), 305-316, (1970)

表1. マウス毒性試験結果

マウス接種日	マウス番号	注射部位	検体	検体接種量	検体を接種したマウスの症状 (日後)						
					1	2	3	4	5	6	7
2010. 3. 4 (1回目試験)	1	腹腔	非加熱検体 原液培養液	1/5希釈液 0.5ml	-	-	-	-			
	2				-	-	-	-			
	3		加熱処理検体 原液培養液 (No. 1)		-	-	-	d			
	4				-	-	-	-			
	5		加熱処理検体 1/10液培養液		-	-	-	-			
	6				-	-	-	-			
2010. 3. 8 (再試験)	1	腹腔	加熱処理検体 原液培養液 (No. 1)	1/5希釈液 0.5ml	-	d					
	2				-	+	d				
	3				-	-	-	+	d		
	4				-	-	-	+	d		
	5				-	-	-	-	-	+	d
	6				-	-	-	-	-	-	-

- : 症状無し + : 症状有り d : death (死亡)

表2. 抗毒素試験結果

マウス接種日	マウス番号	注射部位	検体	検体接種量	抗毒素血清	抗血清量 (単位)	マウスの症状 (日後)								
							1	2	3	4	5	6	7	8	9
2010. 3. 11	1	腹腔	加熱処理検体 原液培養液	1/5希釈液 0.5ml	抗A	0.2ml (0.2単位)	-	-	-	-	-	d			
	2						-	-	-	-	-	-	-	-	
	3				抗B	0.2ml (0.2単位)	-	-	-	-	-	d			
	4						-	-	-	-	-	-	-	-	
	5				抗C1	0.2ml (0.2単位) 再試	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6						-	-	-	-	-	-	-	-	
	7						+	+	+	+	+	d			
	8				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9				抗C2	0.2ml (0.2単位)	+	+	d						
	10						-	-	-	-	-	-	-	-	
	11				抗D	0.2ml (2単位)	-	-	-	-	-	+	d		
	12						-	-	-	-	-	-	-	+	d
	13				抗E	0.2ml (2単位)	-	-	+	d					
	14						-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15				抗F	0.2ml (0.2単位)	-	-	+	d					
	16						-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17				-	-	-	-	-	-	-	+	d		
	18						-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20		-				-	-	-	-	-	-	-	-	

- : 症状無し + : 症状有り d : death (死亡)

表3 蜂蜜培養液(CMGY培地)を用いてのマウス毒性試験結果および抗毒素試験結果 (国立感染症研究所実施)

マウス接種日	マウス番号	注射部位	検体	検体接種量	抗毒素血清	マウスの症状			
						約2時間後	約5時間後	1日後	2日後
2010年 4月5日	1	腹腔	CMGS培地 継代培養液 No. 1	原液 0.5ml	-	-	+	d	
	2					-	+	d	
	3			1/10希釈液 0.5ml	-	-	-	-	-
	4					-	-	-	-
	5			1/10希釈液 0.5ml	抗 ABCDEF	-	-	-	-
	6					-	-	-	-
	7		CMGS培地 継代培養液 No. 2	原液 0.5ml	-	++	d		
	8					++	d		
	9			1/10希釈液 0.5ml	-	-	-	-	-
	10					-	-	-	-
	11			1/10希釈液 0.5ml	抗 ABCDEF	-	-	-	-
	12					-	-	-	-
2010年 4月6日	1	腹腔	CMGS培地 継代培養液 No. 2	原液 0.5ml	-	+	d		
	2				抗ABCDEF	+	d		
	3				抗CD	+	+++	d	
	4				抗C. perf	+	+++	d	
	5	皮下			-	+*1	++*1	+*2	

- : 症状無し + : 症状有り d : death (死亡)

表4. 分離コロニーのCMGY培養液を用いてのマウス毒性試験結果および抗毒素試験結果

(国立感染症研究所実施)

マウス接種日	マウス番号	注射部位	検体	検体接種量	抗毒素血清	マウスの症状		
						約2時間後	約5時間後	1日後
2010年 4月15日	1	腹腔	非溶血性 暗色コロニー 培養液	原液 0.5ml	-	-	-	-
	2	腹腔				-	-	-
	3	皮下				-	-	-
	4	腹腔	溶血性 白色コロニー 培養液			+	d	
	5	腹腔				+	d	
	6	皮下				++*1	++*1	+*2

- : 症状無し + : 症状有り d : death (死亡)

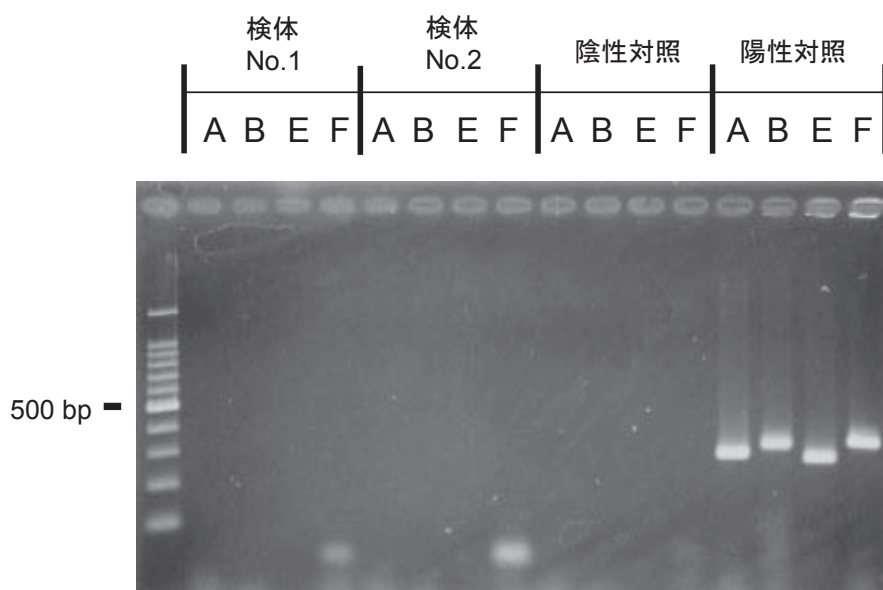
*1 : マウスの腹部に、隆起と弛緩が見られた。腹部の内出血によると思われる。

*2 : マウス腹部の皮下組織は壊死して欠落し、浸出液が認められた。

皮膚に穴があき、内容物が外に出た。

図2. ボツリヌス毒素遺伝子検出検査 (PCR法)

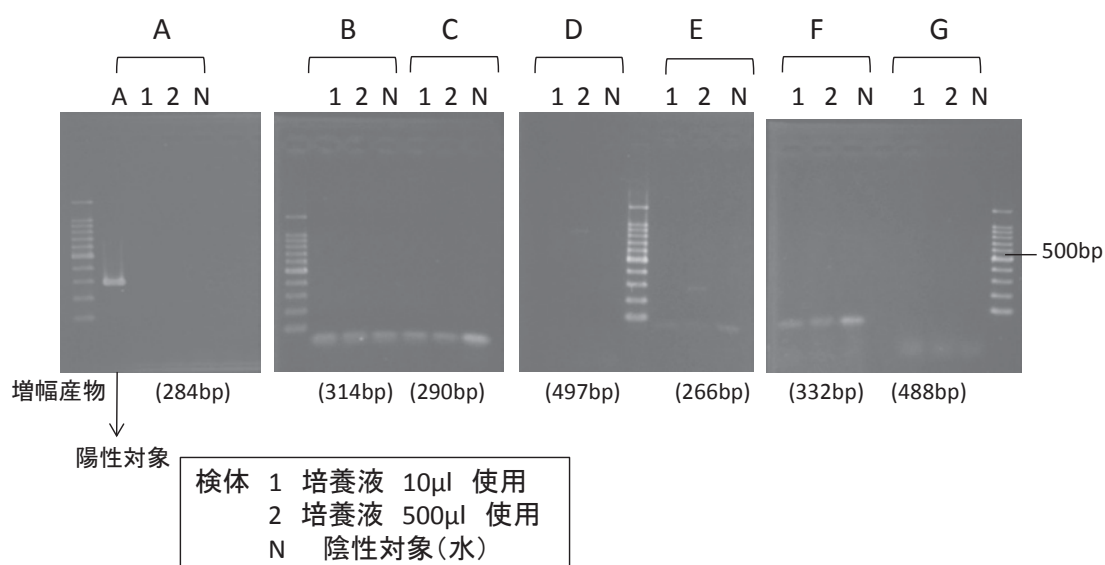
1. 武士らの方法 原法 Takeshi, K. et al. Microbiol Immunol. 1996, 40, 5-11.
(国立感染症研究所 細菌第2部 実施)



両検体とも F型プライマーによる PCR で、サイズの小さいバンドが見られたが、陽性対照 (350bp)とはサイズが異なり、非特異的な増幅と思われる。

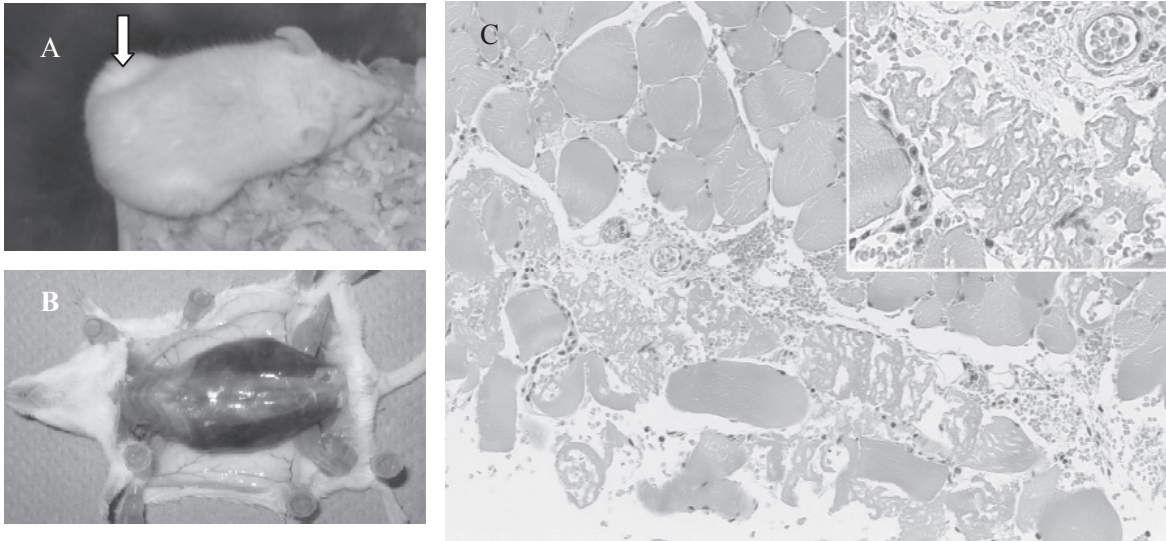
判定: A,B,,E,F型 陰性

2. TAKARA プライマー使用 PCR (宮崎県衛環研実施)



判定: A,B,C,D,E,F,G 陰性

図3 試料接種マウスの症状



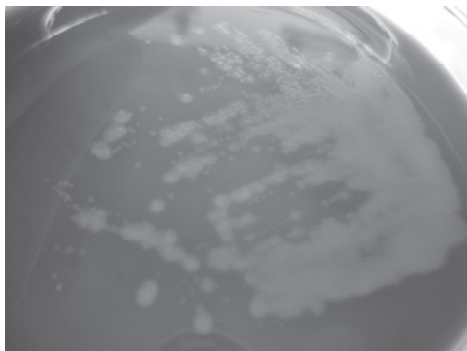
(国立感染症研究所細菌第2部撮影)

(国立感染症研究所 感染病理部永田室長 撮影)

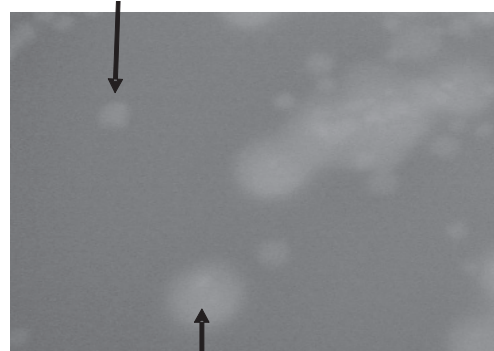
- A 接種マウスの外観：見た目は腹部が弛緩して少しへこんだようで、ボツリヌス毒素による症状とやや似ていた。しかし、マウスに触れてみると、腹部をさわられることに過敏になっており、かなり痛みを感じているように見えた。
- B 死亡マウスの解剖所見：腹部皮下組織および腹腔内に出血が見られた。
- C 死亡マウスの腹部出血部分の病理標本：マウスの腹部筋組織である。内臓面側を中心とした、筋組織の空砲変性，凝固壊死，筋の断裂が見られる。また、これに伴った腹膜，腹横筋，腹直筋組織間の出血とわずかな好中球浸潤が認められる。組織診断名：筋細胞壊死

図4. 血液寒天上に認められたコロニー

検体 No. 1 の血寒培養

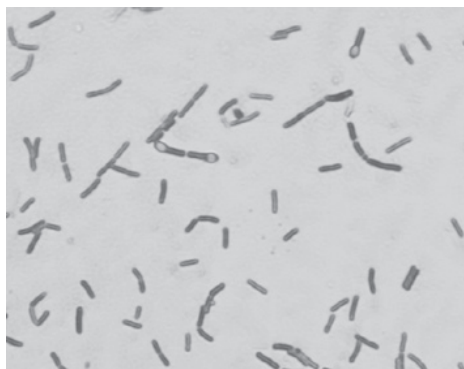


非溶血性コロニー



溶血性コロニー

溶血性コロニー
のグラム染色



(国立感染症研究所細菌第2部撮影)

図5 16S rRNA 遺伝子配列解析による菌株同定 (国立感染症研究所 細菌第2部実施)

*16S rRNA 遺伝子増幅のために使用したプライマーセット

A : 16S rRNA 遺伝子の 10-800 nt 領域を増幅するプライマーセット

B : 16S rRNA 遺伝子の 525-1050 nt 領域を増幅するプライマーセット

C : 16S rRNA 遺伝子の 800-1500 nt 領域を増幅するプライマーセット

1. 溶血性コロニー (マウスに症状を起こす菌)

プライマーセットA による PCR 産物の塩基配列

```
CTGTTTGCTACCCACGCTTTCATGCCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACT
GGTGTTCCTCCTAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCGCTTTCCTCTCCTGTACT
CTAGATACCCAGTTTGAATGCAGCACCGGGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCCCCTTAAGTA
TCCGCCTACGCATGCTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCCCTCCTCAGGTACCGTCATTATCGTCCCTGAAAACAGA
GCTTTACAATCCGAAGACCGTCATCACTCACGCGCGTGGCTGCGTCAGGGTTTCCCCATTGCG
CAATATTCCTCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGAT
CACCTCTCAGTTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGC
GCCGCGGGTCCATCTCAAAGCGGATTACTCCTTTAATCATTTCAACATGCATTGAAATGATGTTAT
GCGGTATTAATCTTCTTTCGGAAGGCTATCCCCCTCTTTGAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCGCTAATCCACTTCCCGAAGGAAGCTTCATCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCACG
CCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAACGGGGNTCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGN
ANCTTGG
```

データベース解析の結果, *Clostridium limosum* と同定された.

2. 溶血性のないコロニー

プライマーセットB による PCR 産物の塩基配列

```
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGTCTTTAAGTCTGA
TGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAGCGGTCAATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCTCCTGACCGCCCTGGAGACAGGGTCTTCCCTTCGGGGACAGGATGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG
GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG
CGT
```

データベース解析の結果, *Bacillus thermoamylovorans* と同定された.