

# Studies on Clostridium sporogenes I. DNA-DNA Homology, Cell Wall Sugar Components and Antigenic Properties of Clostridium sporogenes and Proteolytic Clostridium botulinum

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7829">http://hdl.handle.net/2297/7829</a>

## *Clostridium sporogenes* に関する研究

### I. *Clostridium sporogenes* と蛋白分解性 *Clostridium botulinum* の DNA-DNA 相同性, 細胞壁構成糖および抗原性状について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

中 塩 哲 士

(昭和60年10月16日受付)

本研究において, *Clostridium sporogenes* と蛋白分解性 *Clostridium botulinum* との分類学的, および遺伝学的関係を検討した. 缶詰由来の *C. sporogenes* 62 株の培養性状, 耐熱性および *C. botulinum* A-190 株に対する DNA-DNA 相同性を検討した. 孢子形成は "Medusa head" 型コロニーを形成する菌群 (コロニー型 I 型菌) 21 株の大部分に認められたのに対し, 不整形あるいは円形ボタン状で smooth 型のコロニーを形成する菌群 (コロニー型 II 型菌) 41 株の大部分では認められなかった. II 型菌の半数以上の菌株は I 型菌よりも明確に異なる強い耐熱性を示した. *C. sporogenes* II 型菌から分離した DNA はレフアレンス株 *C. botulinum* A-190 の DNA と 81% 以上の高い相同性を示し, その DNA-DNA 複合体の Tm(e) (50% 解離温度) と homologous *C. botulinum* A-190 複合体のそれとの差は見られなかった. しかし *C. sporogenes* I 型菌の DNA は *C. botulinum* A-190 と DNA-DNA 相同性において 30~40% 異なり, A-190 株との間で形成された DNA-DNA 複合体は homologous *C. botulinum* A-190 株の DNA-DNA 複合体との Tm (e) と比較したとき,  $\Delta Tm$  (e) が 7.0°C を示した. *C. sporogenes* と蛋白分解性 *C. botulinum* の鑑別には, 細胞壁構成糖に基づいて区別することはできなかったが, 加熱菌体抗原による凝集反応上では, *C. sporogenes* I 型菌, II 型菌および蛋白分解性 *C. botulinum* の間には互いに差異があることがわかった.

**Key words** *Clostridium sporogenes*, proteolytic *Clostridium botulinum*, DNA-DNA homology, cell wall sugar component, agglutination test.

*Clostridium sporogenes* は土壌中に最も普遍的に存在する *Clostridium* 属のひとつである<sup>1)2)</sup>. 一般にガス壊疽の原因菌のひとつと記載されているが<sup>3)</sup>, この菌種自体には毒素の産生が証明されない<sup>1)</sup>. しかしながら, この菌種の中には培養性状, 生化学性状が蛋白分解性 *C. botulinum* と酷似する菌群が存在する<sup>3)</sup>. Lee らは DNA-DNA 相同性試験においても蛋白分解性 *C. botulinum* と区別し得ない *C. sporogenes* の存在を報告している<sup>4)5)</sup>. *C. botulinum* が毒素原性を示すのに対して, *C. sporogenes* が毒素原性を示さないだけで区別

されているに過ぎない<sup>6)</sup>. しかし, 毒素原性は遺伝的変異や環境的要因によって容易に影響を受けることから<sup>7)8)</sup>, 無毒化した蛋白分解性 *C. botulinum* と *C. sporogenes* との分類学的, 遺伝学的関係が問題となるが, 毒素原性を重視する現行の *Clostridium* 属の分類体系においては有毒菌種の無毒株は同定不能とされるか別種とされている<sup>1)9)</sup>. 著者の研究室において, 缶詰の中から分離された *Clostridium* の半数以上が *C. sporogenes* と同定されて保存されているが, これらの菌群はそのコロニー性状から, *C. sporogenes* に特徴的

Abbreviations: BBL, Baltimore Biological Laboratory; BHI, brain heart infusion; *C. bifermentans*, *Clostridium bifermentans*; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; *C. sordellii*, *Clostridium sordellii*; *C. sporogenes*, *Clostridium sporogenes*; DNA, deoxyribonucleic acid; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; SSC, sodium chloride-sodium citrate; Tm(e),

な“Medusa head”を示す菌群と、不整形あるいは円形ボタン状のsmooth型のコロニーを形成する菌群に分かれている<sup>9)</sup>。後者の菌群は蛋白分解性 *C. botulinum* と酷似しているが、これらの *C. sporogenes* が缶詰から多数分離されるという公衆衛生学上の実際の問題に鑑み、缶詰由来の *C. sporogenes* が蛋白分解性 *C. botulinum* とそれぞれいかなる関係にあるかをDNA-DNA 相同性試験により検討を試みた。なお、蛋白分解性 *C. botulinum* と *C. sporogenes* の細胞壁構成糖が異なり、*C. sporogenes* はガラクトース、*C. botulinum* はグルコースを有することから、細胞壁構成糖を比較することは両菌種の鑑別に有用であると一部の成書に記載されていること<sup>10)</sup>に鑑み、これらの *C. sporogenes* に対してこの観点から検討を加えた。併せて細胞壁構造と免疫反応が密接に関連することから、両菌種の表面抗原に対する凝集反応を検討した。

## 材料と方法

### I. 使用菌株

*Clostridium sporogenes* 63株：松田典彦氏（日本缶詰協会研究所，横浜）により缶詰から分離されたものを、培養性状，生化学性状，ガスクロマトグラフィーによる代謝産物の分析および毒素原性から，著者の研究室で *C. sporogenes* と同定した62株（J-1～J-62）<sup>9)</sup> およびレファレンス株としての *C. sporogenes* PA 3679<sup>11)</sup>（この株は上記松田氏より分与を受けた）。蛋白分解性 *Clostridium botulinum*：A型4株，B型9株，F型4株。このうち *C. botulinum* A-190（A型）がDNA-DNA 相同性試験および凝集反応においてレファレンス株として用いられた。本菌は日本において最も頻用されている代表株のひとつである<sup>9)12)13)</sup>。

### II. コロニー性状

コロニー性状は，2%（W/V）にグルコースを加えた10%（V/V）血液寒天培地およびブレインハートインフュージョン（brain heart infusion, BHI，ニッサン，東京）寒天培地を用いて観察した。

### III. 孢子形成能の測定

クックドミートブロー<sup>14)</sup>で37°Cにて1晩培養した菌液の1白金耳を，BHI寒天培地および2%（W/V）プロテオースペプトン No.2（Difco），0.5%（W/V）塩化ナトリウム，1.5%（W/V）寒天を加えたペプトン寒天培地に塗布して，37°Cにて48時間水素ガス下で嫌気培養した。生じた集落をWirtzの方法<sup>15)</sup>により

孢子染色して，少くとも1,000個の菌細胞を数え，この中の孢子数を計測した。孢子形成率は総菌数に占める孢子数の割合で示した。光学顕微鏡下の10視野いずれにおいても孢子が観察できなかった場合，“検出不能”と判定した。

### IV. 耐熱性試験

小試験管（12×106 mm）中のクックドミートブロー<sup>14)</sup>で1晩培養した菌液0.5 mlを0.05%（W/V）にシステイン塩酸塩を加えた中試験管（17×165 mm）中のBHIブロー10 mlに接種して，37°Cにて48時間培養した。この培養液を用いて，耐熱性を定性的および定量的に測定した。定性的測定においては，被験菌液を75°C，15分および100°Cにて1，2，3時間それぞれ加熱した後に，被験菌液の1 mlを0.05%（W/V）システイン塩酸塩，0.1%（W/V）寒天，1%（W/V）グルコース，1%（W/V）可溶性デンプンを加えた中試験管中のBHIブロー10 mlに接種して，37°Cにて48時間培養して発育の有無を観察した。定量的測定においては，同様に加熱した被験菌液をBHIブローで10倍段階希釈して，各希釈液の0.1 mlを，1%（W/V）グルコース，1%（W/V）可溶性デンプンを加えたBHI寒天培地20 mlに混釈して接種し，37°Cにて48時間嫌気培養後に生じた集落数を測定して耐熱性孢子数を求めた。

### V. DNAの調製

被験菌を1%（W/V）プロテオースペプトン（大五栄養，大阪），1%（W/V）ポリペプトン（大五栄養），1.5%（W/V）酵母エキス（Difco），1%（W/V）グルコース，0.1%（W/V）フルクトース，0.05%（W/V）システイン塩酸塩および金属塩類<sup>10)</sup>を加えた培地を用いて培養した。*C. sporogenes* J-53株の標識DNAの調製には，3%（W/V）トリプチケース（BBL），1%（W/V）グルコース，0.05%（W/V）システイン塩酸塩，0.03%（W/V）チオグリコール酸ナトリウム（和光，大阪）および金属塩類<sup>10)</sup>，ビタミン類<sup>10)</sup>の入った100 mlの培地に，10  $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-チミジン（日本アイソトープ協会，東京）を加えた。*C. botulinum* A-190株の標識DNAの調製には，上述の培地に0.3%（W/V）BHIを加えた。すべてにおいて，対数増殖期後期にベニシリンGを最終濃度が50  $\mu$ g/mlになるように加えて，さらに30分間培養した。被験培養液を遠心集菌し，得られた菌塊を0.15 M塩化ナトリウム，0.01 M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (pH8.0)

temperature at which there is 50% dissociation of homologous and heterogous DNA duplexes;  $\Delta T_m(e)$ , the difference between the temperatures at which there is 50% dissociation of homologous and heterologous DNA duplexes.

を含む溶液に懸濁した。この懸濁液を 60°C, 20 分間加熱した後、リゾチーム(生化学工業, 東京), プロナーゼ(科研, 東京)を最終濃度がそれぞれ 1 mg/ml になるように加えて 37°C で 15 分間保温し, 続いてラウリル硫酸ナトリウム(和光)を最終濃度が 3% (W/V) になるように加えて菌を溶解させた。溶解菌液から Marmur の方法<sup>16)</sup>により DNA を抽出した。

#### VI. DNA-DNA 相同性試験

Johnson らの方法<sup>17)</sup>にしたがって, メンブランフィルターによる competition test を行った。フィルター上の DNA (レファレンス DNA) に 10  $\mu$ l の標識した homologous DNA (1  $\mu$ g) に対し, 100  $\mu$ l の 2.2 倍濃度の塩化ナトリウム-クエン酸ナトリウム液 (0.15 M sodium chloride-0.015 M sodium citrate, SSC, pH 7.0) か, あるいは competitor DNA (通常 75  $\mu$ g) の 2.2 倍濃度の SSC 溶解液をバイアルビン (6  $\times$  25 mm) に加えた。フィルターのサイズは 3  $\times$  9 mm である。バイアルビンを 60°C で 15 時間保温後, 60°C の 2 倍濃度の SSC で洗浄し, 乾燥した。その後, 液体シンチレーションカウンター (Unilux 1-A, Nuclear-Chicago, Des Plaines, Illinois) で放射活性を測定した。

#### VII. DNA-DNA 複合体の熱安定性試験

Johnson らの方法<sup>17)</sup>にしたがって, メンブランフィルターに固定した種々の DNA と, <sup>3</sup>H で標識したレファレンス DNA との DNA-DNA 複合体を作製した。このフィルターを 2 倍濃度の SSC 溶液で洗浄した後, 1/2 濃度の SSC 溶液に浸し, 温度を 5°C ずつ上げることにより, 解離してくる <sup>3</sup>H-DNA の量を液体シンチレーションカウンターで測定し, 50% 解離温度を求め, レファレンス DNA の 50% 解離温度との差 ( $\Delta T_m(e)$ ) により, 熱安定性を表わした。

#### VIII. 細胞壁構成糖の分析

被験菌を 1% (W/V) プロテオースペプトン No.2 (Difco), 1% (W/V) 酵母エキス (Difco), 0.5% (W/V) グルコース, 0.05% (W/V) システイン塩酸塩を含む培地で培養して, Cummins の方法<sup>10)</sup>により細胞壁を調製して, 東洋濾紙 No.50 (東洋, 東京) を用いるパークロマトグラフィーにより構成糖を分析した。

#### IX. 凝集反応

被験菌を 1% (W/V) トリプテケースペプトン (BBL), 1% (W/V) プロテオースペプトン No.2 (Difco), 0.5% (W/V) グルコース, 0.05% (W/V) システイン塩酸塩を含む培地で培養した。Solomon らの方法<sup>18)</sup>にしたがって, 18 時間培養した菌液を 100°C で 60 分間加熱したものを抗原液として, 家兎を用いて抗血清を作製した。2 段階階稀釈した抗菌血清 1 ml と適当な濃度の抗原 1 滴を混合し, 56°C, 2 時間静置後判

定し, 明瞭な凝集を示す最高稀釈の逆数をもって凝集価とした。

## 成 績

### I. 缶詰由来の *C. sporogenes* の培養性状, 孢子形成能および耐熱性

缶詰由来の *C. sporogenes* 62 株は, 血液寒天培地および BHI 寒天培地におけるコロニー性状から 2 群に分けられた。*C. sporogenes* に特徴的な “Medusa head” を示す菌群 21 株を I 型菌とし, 不整形円形あるいは円形ボタン状で smooth 型コロニーを形成する菌群 41 株を II 型菌とした (図 1a, 1b)。これらの菌株のコロニー性状は 2 株 (J-5, J-10) を除いて, 長期にわたり安定していた。I 型菌コロニーは寒天培地表面に固く接着し, 白金耳では容易にはがれなかったのに対して, II 型菌コロニーは寒天培地表面から容易に除去し得るものであった。I 型菌 21 株のうち, 18 株 (86%) は恒常的に孢子を形成することが顕微鏡観察により確認されたのに対して, II 型菌 41 株のうち, わずか 8 株 (20%) において孢子が観察されたに過ぎなかった (表 1)。しかしながら, これらの菌株について耐熱性試験を行った結果はいくらか意外な成績を示した。すなわち I 型菌においては, 21 株全株が 75°C, 15 分の加熱に耐えるが, 100°C, 1 時間の加熱にはわずか 9 株が耐えるに過ぎず, 100°C, 2 時間の加熱には全株とも耐えることができなかった。これに対して II 型菌においては, 被験 41 株中 9 株 (22%) が 75°C, 15 分の加熱にも耐えなかったが, 耐熱性を示した 32 株中 28 株は 100°C, 1 時間の加熱に耐え, さらにこの 28 株中 26 株は 100°C, 2 時間の加熱にも耐えた (表 1)。

次に I 型菌, II 型菌から無作為に各々 5 株を選んで, 孢子形成能を定量的に測定した (表 2)。I 型菌の 5 株はいずれも寒天培地上での孢子形成は良好で, 顕微鏡観察による孢子形成率は, ペプトン寒天培地で 2.3~87.5%, BHI 寒天培地で 9.0~83.3 であった。75°C, 15 分加熱処理後の耐熱性菌数は  $1.1 \times 10^6$  (J-6) ~  $2.7 \times 10^7$  (J-5) 個/ml であったが, 100°C, 1 時間の加熱には全株とも耐えられなかった。II 型菌 5 株については, いずれも寒天培地上における孢子の形成は顕微鏡観察によつては確認できなかった。しかしながら, 75°C, 15 分の加熱に対して 1 株 (J-12) は耐性でなかったが, 他の 4 株は  $1.7 \times 10^8$  (J-17) ~  $2.6 \times 10^8$  (J-14) 個/ml の耐熱性菌数を示した。これらの菌株はいずれも 100°C, 1 時間の加熱に耐え, さらにこのうちの 1 株を除いて 100°C, 3 時間の加熱にも耐性であった。以上の成績から, I 型菌は孢子形成は良好であるが, 比較的耐熱性の弱い孢子を形成する菌群であるのに対し

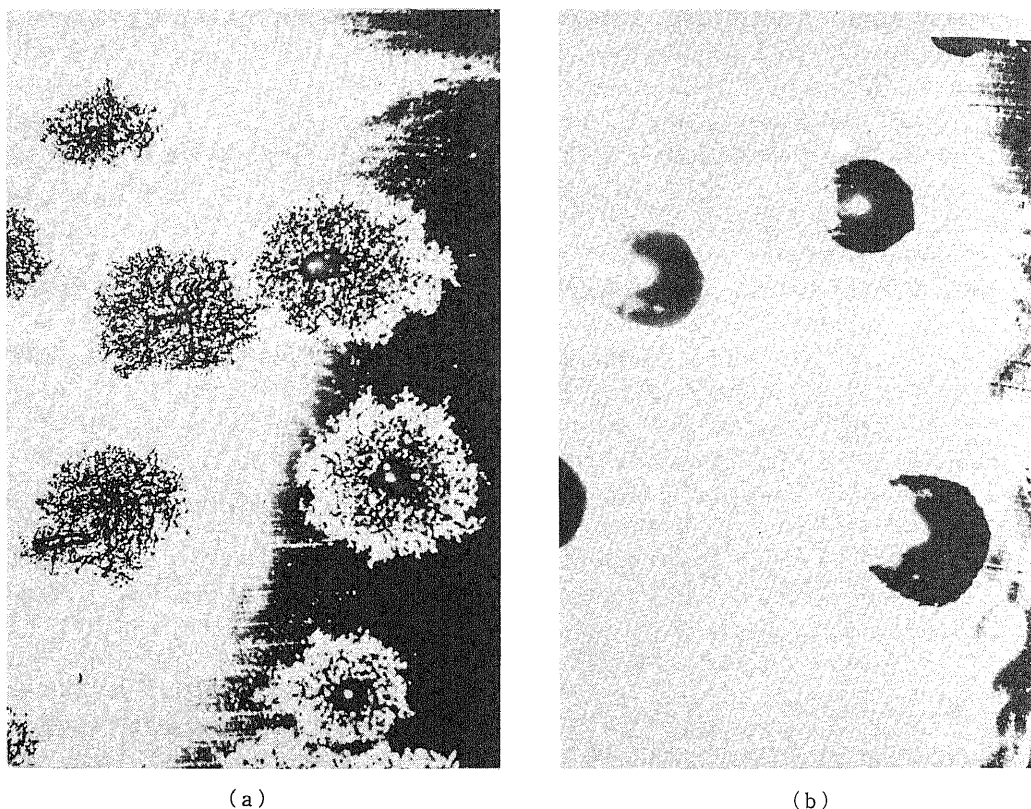


Fig. 1. Colonies of *Clostridium sporogenes* strains on blood-glucose agar. (a) Colony-type I (strain J-53), (b) colony-type II (strain J-62).

Table 1. Sporulation and heat resistance of the two colony-types of *Clostridium sporogenes*

Colony-type	Colonial property*	No. of strains tested	Number of strains showing				
			Stickening colony	Detectable spore**	Resistance to heating at		
					75°C 15 min	100°C 1 hr	100°C 2 hr
I	Rhizoid, or "Medusa head"	21	21	18	21	9	0
II	Smooth, round, or button-like	41	0	8	32	28	26

\* See Figure 1.

\*\* Spores were detected by microscopic examination.

て、II型菌は孢子形成は貧弱であるが、耐熱性の強い孢子を形成する菌群であることがわかった、

## II. DNA-DNA 相同性および DNA-DNA 複合体の熱安定性

*C. sporogenes* I型菌, II型菌からそれぞれ7株, 8株を無作為に選び、あわせて *C. sporogenes* PA 3679 (コロニー性状としてはII型菌) からそれぞれDNAを抽出し、レファレンス株とした *C. botulinum*

A-190 (A型) および *C. sporogenes* J-53 (I型菌) の標識したDNAに対して、DNA-DNA 相同性試験を行った(表3)。II型菌9株は *C. botulinum* A-190の標識DNAに対して81~91%と高い相同性を示したが、*C. sporogenes* J-53の標識DNAに対しては66~74%の相同性を示したに過ぎなかった。これに対してI型菌7株は、*C. botulinum* A-190の標識DNAに対しては66~73%の相同性を示したが、*C. sporo-*

Table 2. Sporulation and heat resistance of strains of *Clostridium sporogenes*

Colony-type and strain	Sporulation (%) on		$10^{-8} \times$ total viable count/ml	No. of cells/ml resistant to heating at		
	Peptone agar	BHI agar		75°C 15 min ( $\times 10^{-4}$ )	100°C 1 hr	100°C 3 hr
Type-I						
J-1	2.3	51.0	4.1	650	0	0
J-2	33.0	17.0	3.3	790	0	0
J-5	5.8	9.0	6.2	2700	0	0
J-6	3.4	54.5	5.7	110	0	0
J-10	87.5	83.3	3.0	1300	0	0
Type-II						
J-12	—*	—	0.59	0	0	0
J-14	—	—	1.8	26	16	0
J-17	—	—	1.7	0.17	55	18
J-52	—	—	0.53	0.61	960	39
J-57	—	—	2.2	1.30	6900	49

\* No spores detected.

Table 3. Reassociation of DNA samples from *Clostridium sporogenes* isolates with DNA from the reference strains *Clostridium botulinum* A-190 and *C. sporogenes* J-53

DNA source	Labelled DNA source			
	Strain A-190		Strain J-53	
	Relative DNA bound(%)	$\Delta Tm(e)$ (°C)	Relative DNA bound(%)	$\Delta Tm(e)$ (°C)
<i>C. botulinum</i>				
A-190	100	0	67	5.5
<i>C. sporogenes</i> , type-II				
J-62	91	1.0	66	
J-12	91	0.5	69	
J-17	87	1.5	69	
J-20	86		67	
J-60	86		74	
J-36	85	1.0	68	
PA 3679	83	1.0	68	
J-19	81		66	
J-21	81	1.4	68	5.3
<i>C. sporogenes</i> , type-I				
J-53	70	7.0	100	0
J-2	72		100	
J-6	72		100	
J-10	72		100	
J-32	71		100	
J-59	73		92	
J-1	66	7.0	89	0

The extent of binding between DNA from the test isolates and labelled DNA from reference strains is expressed as a percentage relative to the extent of binding between labelled and unlabelled DNA from the reference strain. Specific activities of the labelled DNA from strains A-190 and J-53 were 15,000 and 1,300 c.p.m./ $\mu$ g, respectively.  $\Delta Tm(e)$  is the difference between the temperatures at which there is 50% dissociation of homologous and heterologous DNA duplexes.

genes J-53 の標識 DNA に対しては 89~100% と高い相同性を示した。以上の成績から、*C. sporogenes* I 型菌、II 型菌は DNA-DNA 相同性のうえからはそれぞれ均一な菌群と見てよいが、両菌群は互いに区別し得る菌群であることがわかった。また *C. sporogenes* II 型菌は DNA-DNA 相同性のうえからは蛋白分解性 *C. botulinum* と区別し得ない菌群であることがわかった。

続いて、これらの DNA-DNA 複合体の熱安定性試験を行った。II 型菌 6 株と *C. botulinum* A-190 との DNA-DNA 複合体の  $\Delta T_m$  (e) は 0.5~1.5°C を示したのに対して、I 型菌 2 株と *C. botulinum* A-190 との DNA-DNA 複合体の  $\Delta T_m$  (e) は 7.0°C を示した。*C. sporogenes* J-53 (I 型菌) と *C. sporogenes* J-21 (II 型菌) および *C. botulinum* A-190 との DNA-DNA 複合体の  $\Delta T_m$  (e) は 5.3 および 5.5°C を示したのに対して、*C. sporogenes* J-53 と *C. sporogenes* J-1 (I 型菌) との DNA-DNA 複合体の  $\Delta T_m$  (e) は 0°C を示した。図 2 に、*C. botulinum* A-190 と *C. sporogenes* J-36 (II 型菌) および *C. sporogenes* J-53 (I 型菌) との DNA-DNA 複合体の熱解離パターンを示した。以上の成績から、*C. sporogenes* I 型菌、II 型菌は互いに区別し得る菌群であること、および *C. sporogenes* II 型菌は蛋白分解性 *C. botulinum* と区別し得ない菌群であることがわかり、DNA-DNA 相同性試験の成績を確認した。

### III. 細胞壁構成糖の分析

*C. sporogenes* I 型菌から 6 株、II 型菌から 6 株を無作為に選び、蛋白分解性 *C. botulinum* 17 株 (A 型 4 株、B 型 9 株、F 型 4 株) を用いて、細胞壁構成糖によりそれぞれの菌群が鑑別し得るか否かを検討した (表 4)。細胞壁構成糖に関しては、ガラクトースのみ、あるいはガラクトースが主で微量のグルコースを含む菌株をガラクトース型、グルコースのみを含む菌株をグルコース型とした。*C. sporogenes* I 型菌においてはガラクトース型が 2 株で、残り 4 株からは糖が検出されなかった。*C. sporogenes* II 型菌においては、ガラクトース型が 2 株、グルコース型が 1 株で、残り 3 株からは糖が検出されず、I 型菌、II 型菌の間には細胞壁構成糖に関して差異が認められなかった。蛋白分解性 *C. botulinum* 17 株の細胞壁構成糖に関しては、ガラクトース型が 9 株、グルコース型が 4 株で、残り 4 株からは糖が検出されなかった。型別では、A 型 4 株中ガラクトース型が 2 株、残りの 2 株は糖検出陰性、B 型 9 株中ガラクトース型が 5 株、グルコース型が 2 株、残りの 2 株は糖検出陰性、F 型 4 株中ガラクトース型 2 株、グルコース型 2 株であり、A、B、F 型間に細胞

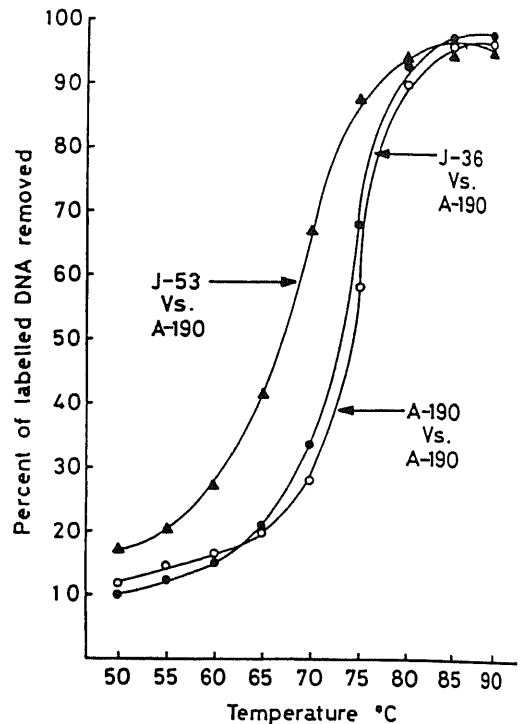


Fig. 2. Thermal elution profiles of homologous and heterologous DNA duplexes formed with *Clostridium botulinum* A-190 DNA.

(○), Homologous DNA duplexes of strain A-190; (●), heterologous DNA duplexes between *C. sporogenes* J-36 (type-II) and A-190; (▲), heterologous DNA duplexes between *C. sporogenes* J-53 (type-I) and A-190.

壁構成糖において差異は認められなかった。

### IV. 凝集反応

*C. sporogenes* J-53 (I 型菌)、*C. sporogenes* J-62 (II 型菌)、*C. botulinum* A-190 の加熱菌体に対する抗菌血清を作製し、無作為に選んだ *C. sporogenes* I 型菌 7 株、II 型菌 7 株および蛋白分解性 *C. botulinum* 8 株 (A 型 3 株、B 型 3 株、F 型 2 株) の加熱菌体抗原に対して凝集反応を行い、それぞれの菌群が鑑別し得るか否かを検討した (表 5)。*C. sporogenes* I 型菌 7 株は、I 型菌抗菌血清に対して全株とも 640~1,280 の高い凝集価を示し、かつ II 型菌抗菌血清に対し 160~1,280 の凝集価を示したが、*C. botulinum* 抗菌血清に対しては 2 株 (凝集価, 80) を除いて凝集しなかった。*C. sporogenes* II 型菌 7 株は、II 型菌抗菌血清、*C. botulinum* 抗菌血清に対し、おのおの 1 株 (J-62 菌の II 型菌抗菌血清に対する凝集価, 2,560; J-12 菌の

Table 4. Cell wall sugar component of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum*

Species and type	No of strains tetsted	No. of strains showing sugar component type of		
		Galactose*	Glucose	No sugar
<i>C. botulinum</i> **	17	9	4	4
<i>C. sporogenes</i> , type-I	6	2	0	4
<i>C. sporogenes</i> , type-II	6	2	1	3

\* Galactose, the strain containing only galactose, or galactose with a small amount of glucose; glucose, the strain containing only glucose.

\*\* Types and numbers of strains tested: type A, 4; type B, 9; type F, 4.

Table 5. Agglutination reaction of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum*

Antigen	No. of strains tested	Agglutination titer with antiserum against		
		<i>C. botulinum</i>	<i>C. sporogenes</i>	
		A-190	J-62 (type-II)	J-53 (type-I)
<i>C. botulinum</i> *	8	640-1,280	80-160	≤40
<i>C. sporogenes</i> , type-II	7	160-640	160-2,560	≤160
<i>C. sporogenes</i> , type-I	7	≤80	160-1,280	640-1,280

\* Types and numbers of strains tested: type A, 3; type B, 3; type F, 2.

*C. botulinum* 抗菌血清に対する凝集価, 640) を除いて, 両抗菌血清に対し, いずれも 160~320 の凝集価を示した。またこの II 型菌は I 型菌抗菌血清に対しては 3 株が凝集価 80~160 を示し, 残り 4 株はまったく凝集しなかった。*C. botulinum* 8 株は *C. botulinum* A-190 抗菌血清に対しては 640~1,280 の高い凝集価を示し, かつ II 型菌抗菌血清に対し凝集価は低いながらも明らかな被凝集性 (凝集価 80~160) を示した。しかしながら *C. sporogenes* I 型菌抗菌血清に対して全株とも凝集しなかった。以上の成績から, 加熱菌体抗原を用いる凝集反応により, *C. sporogenes* I 型菌と蛋白分解性 *C. botulinum* は抗原的に差があるが, *C. sporogenes* II 型菌が抗原的に両者の中間に位置することが推定された。

#### 考 察

本研究において, 著者は *C. sporogenes* と蛋白分解性 *C. botulinum* との分類学的, 遺伝学的関係について検討した。両菌種は培養, 生化学性状および DNA-DNA 相同性においても区別し得ないことが報告されている<sup>3)-5)</sup>。両者は毒素原性の有無, すなわち *C. sporogenes* は毒素原性を示さず, 蛋白分解性 *C. botulinum* は毒素原性を示すことで区別されているに過ぎない<sup>6)</sup>。

Johnson<sup>10)</sup> は DNA-DNA 相同性および DNA-DNA 複合体の熱安定性の観点から geno-species を設定した。このうち DNA-DNA 相同性で 80% 以上の値を示し, かつレファレンス菌株の DNA-DNA 複合体の Tm (e) に対する  $\Delta Tm$  (e) が 0°C に近い菌群を geno-variety, また DNA-DNA 相同性で 60~70% の値を示し, かつレファレンス菌株の DNA-DNA 複合体の Tm(e) に対する  $\Delta Tm$ (e) が 7~9°C を示す菌群を geno-subspecies と Johnson<sup>10)</sup> は定義した。本研究で用いた缶詰由来の *C. sporogenes* 62 株に関しては, コロニー性状などから I 型菌, II 型菌の 2 群に分けられ, このうち II 型菌が蛋白分解性 *C. botulinum* と区別し得ぬ菌群であることを著者は明らかにした。すなわち I 型菌 21 株はレファレンス株 *C. botulinum* A-190 に対して 66~73% の DNA-DNA 相同性を示し,  $\Delta Tm$ (e) が 7.0°C を示したことから, DNA 分類の観点からは geno-subspecies とし, 他方 II 型菌 41 株はレファレンス株 *C. botulinum* A-190 に対して 81~91% の高い DNA-DNA 相同性を示し,  $\Delta Tm$  (e) が 0°C を示したことから, 理論的には蛋白分解性 *C. botulinum* と *C. sporogenes* II 型菌は同一 species の geno-variety とみなしてよいことがわかった。しかしながら, ボツリヌス症という医学, 公衆衛生学上の実際の問題を考え



ば、毒素原性を示す蛋白分解性 *C. botulinum* と *C. sporogenes* II型菌とが DNA-DNA 相同性でいかに区別し難いにせよ、両者をそれぞれ別種として区別せざるを得ないと思われる。

孢子形成能と耐熱性との関係については、*C. sporogenes* I型菌は孢子形成能は良好であるが、比較的耐熱性の弱い孢子を形成する菌群であるのに対して、II型菌は孢子形成能は貧弱であるが、耐熱性の強い孢子を形成する菌群であることがわかった。このように孢子形成能と耐熱性との関係は、*C. perfringens* においても報告されている<sup>8)20)</sup>。本研究において用いられた *C. sporogenes* は高熱で予め加熱処理された缶詰から分離されているために、耐熱性の消失変異、あるいは孢子形成は貧弱であるが耐熱性の強い孢子を形成する菌群が選択されたことも考えられる。

細胞壁構成糖を同定、分類学上の鑑別性状として重視する傾向がみられ、Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版<sup>21)</sup>においても、*Clostridium* 属をはじめ *Corynebacterium* 属、*Propionibacterium* 属、*Actinomycetales* 目などのグラム陽性桿菌を中心に各菌種について細胞壁構成糖が記載されている。*Clostridium* 属においては、諸性状が酷似することから、その分類、異同について論議の絶えない *C. sordellii* と *C. bifementans* との間に<sup>22)</sup>、細胞壁構成糖に明確な差異があり、同定の鑑別性状として用い得ることが報告されている<sup>23)24)</sup>。*C. sporogenes* と蛋白分解性 *C. botulinum* の細胞壁構成糖に関する Cummins の成績<sup>10)</sup>は両者を区別し得るように記載しているが、わずか5株の成績に基づいている。今回多数の菌株(蛋白分解性 *C. botulinum*, 17株; *C. sporogenes* I型菌, 6株; 同II型菌, 6株)を用いて検討したところ、両菌種の細胞壁構成糖はそれぞれ不均一な糖構成を示し、両菌群の間に差異は認められず、細胞壁構成糖に基づいて両菌群を鑑別することは困難であることがわかった。また DNA-DNA 相同性で約30%の差がある *C. sporogenes* I型菌, II型菌の間にも細胞壁構成糖に関して差異を見出すことはできなかった。

凝集反応による *C. sporogenes* と蛋白分解性 *C. botulinum* との鑑別の有効性は未だ証明されていない。今回、加熱菌体抗原を用いる凝集反応により蛋白分解性 *C. botulinum* と *C. sporogenes* I型菌は容易に鑑別し得ることを著者は明らかにした。また、蛋白分解性 *C. botulinum* と DNA-DNA 相同性においても一致する *C. sporogenes* II型菌に関しては、*C. botulinum* A-190 抗菌血清に対する凝集性が *C. botulinum* に比較して明らかに低いことから、抗原構成上何らかの差がある可能性が示唆された。

## 結 論

缶詰由来の *Clostridium sporogenes* 62株と蛋白分解性 *Clostridium botulinum* 17株を用いて、DNA-DNA 相同性、DNA-DNA 複合体の熱安定性および抗原性状を検討することにより、両菌種の分類学的、遺伝学的関係を検討して、以下の結論を得た。

1) 缶詰由来の *C. sporogenes* 62株は、*C. sporogenes* に特徴的な“Medusa head”のコロニーを示す菌群(コロニー型I型菌)21株と、不整形型あるいは円形ボタン状でsmooth型のコロニーを形成し、蛋白分解性 *C. botulinum* と培養、生化学性状の酷似する菌群(コロニー型II型菌)41株に分かれた。

2) *C. sporogenes* I型菌21株の孢子形成は良好で、耐熱性に関しては75°C、15分の加熱に全株とも耐えたが、100°C、2時間の加熱に耐えた菌株はなかった。これに対して、*C. sporogenes* II型菌41株の孢子形成は貧弱であったが、その過半数の株(26株)は100°C、2時間の加熱にも耐える菌株であった。

3) *C. sporogenes* I型菌7株はレファレンス株 *C. botulinum* A-190株と66~73%の低いDNA-DNA 相同性を示し、DNA-DNA 複合体の $\Delta T_m$ (e)は7.0°Cであった。これに対して、*C. sporogenes* II型菌8株は *C. botulinum* A-190と81~91%の高いDNA-DNA 相同性を示し、DNA-DNA 複合体の $\Delta T_m$ (e)は0.5~1.5°Cであった。しかし *C. sporogenes* J-53株(I型菌)とは66~74%の低いDNA-DNA 相同性を示し、DNA-DNA 複合体の $\Delta T_m$ (e)は5.3°Cであった。すなわち、*C. sporogenes* II型菌はDNA-DNA 相同性において蛋白分解性 *C. botulinum* と一致し、*C. sporogenes* I型菌とは区別し得る菌群であった。

4) つづいて *C. sporogenes* I型菌6株、II型菌6株および蛋白分解性 *C. botulinum* 17株(A型4株、B型9株、F型4株)を用いて、細胞壁構成糖を分析したが、それぞれの菌群の鑑別には有効でなかった。

5) *C. sporogenes* I型菌7株、II型菌7株および蛋白分解性 *C. botulinum* 8株(A型3株、B型3株、F型2株)を用いて、加熱菌体抗原を用いる凝集反応を行ったが、*C. sporogenes* I型菌と *C. botulinum* は明確に区別し得るが、*C. sporogenes* II型菌は抗原性状上、両者の中間移行的位置にあることがわかった。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った金沢大学医学部微生物学講座西田尚紀教授に心から感謝致します。また本研究の遂行にあたり終始御指導を賜った金沢大学医学部微生物学講座中村信一助教授はじめ微生物学講座各位、ならびに聖マリアンナ医科大学臨床検査医学講座中村

正夫教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Smith, L.Ds.: The pathogenic anaerobic bacteria, p313-320, 2nd ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1975.
- 2) 佐々木茂雄: クロストリジアに関する研究 IV. 土壌中のクロストリジア. 十全医会誌, 38, 191-264 (1933).
- 3) Kiritani, K., Mitsui, N., Nakamura, S. & Nishida, S.: Numerical taxonomy of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* strains and their susceptibilities to induced lysins and mitomycin C. Jap. J. Microbiol., 17, 361-372 (1973).
- 4) Lee, W. H. & Riemann, H.: The genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. J. Gen. Microbiol., 84, 85-90 (1970).
- 5) Wu, J. I. J., Riemann, H. & Lee, W. H.: Thermal stability of the deoxyribonucleic acid hybrids between the proteolytic strains of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Can. J. Microbiol., 18, 97-99 (1972).
- 6) Oakley, C. L.: Soluble bacterial antigens as discriminant in classification, p242-248. In G. C. Ainsworth & P. H. A. Sneath (ed.), Microbial classification, Cambridge University Press, London, 1962.
- 7) Nishida, S., Yamagishi, T., Tamai, K., Sanada, I. & Takahashi, K.: Effects of heat selection on toxigenicity, cultural properties and antigenic structures of clostridia. J. Infect. Dis., 120, 507-516 (1969).
- 8) Nishida, S., Seo, N. & Nakagawa, M.: Sporulation, heat resistance, and biological properties of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., 17, 303-309 (1969).
- 9) 加藤久人・中村信一・芹川俊彦・松田典彦: 缶詰由来の *Clostridium sporogenes*-like strains について. 日細誌, 30, 67 (1975).
- 10) Cummins, C. S.: Cell wall composition in classification of gram-positive anaerobes. Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 413-419 (1970).
- 11) Aschehoug, V. & Jansen, E.: Studies on putrefactive anaerobes as spoilage agents in canned foods. Food Research 15, 62-67 (1950).
- 12) Takumi, K. & Kawata, T.: Chemical composition of cell walls of *Clostridium botulinum* type A. Jap. J. Microbiol., 14, 57-63 (1970).
- 13) 飯田広夫: *Clostridium botulinum* の毒素産生に関する研究 (第1報). 日細誌, 19, 458-461 (1964).
- 14) Nishida, S., Murakami, M. & Yamagishi, T.: Chopped meat broth as a medium for the production of toxins by Clostridia. I. Production of toxins by *Clostridium welchii*. Jap. J. Microbiol., 6, 33-40 (1962).
- 15) Wirtz, K.: Ein einfache Art der Sporenfärbung. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A., 46, 727-728 (1908).
- 16) Marmur, J.: A principle for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol., 3, 208-218 (1961).
- 17) Johnson, J. L. & Ordal, E. J.: Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. J. Bacteriol., 95, 893-900 (1968).
- 18) Solomon, H. M., Lynt, R. K. Jr., Kautter, D. A. & Lilly, T. Jr.: Antigenic relationship among the proteolytic and nonproteolytic strains of *Clostridium botulinum*. Appl. Microbiol., 21, 295-299 (1971).
- 19) Johnson, J. L.: Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 308-315 (1973).
- 20) Nakamura, S. & Nishida, S.: Reinvestigation of the relationship between sporulation, heat resistance and some biochemical properties in strains of *Clostridium perfringens*. J. Med. Microbiol., 7, 451-457 (1974).
- 21) Smith, L. Ds & Hobbs, G.: *Clostridium*, p551-575. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 1974.
- 22) Brooks, M. E. & Epps, H. B. G.: Taxonomic studies of the genus *Clostridium*: *Clostridium bifermentans* and *C. sordellii*. J. Gen. Microbiol., 21, 144-155 (1959).
- 23) Novotný, P.: Composition of cell wall of *Clostridium sordellii* and *Clostridium bifermentans* and its relation to taxonomy. J. Med. Microbiol., 2, 81-100 (1969).
- 24) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayashi, H. & Nishida, S.: Reinvestigation of the taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. J. Med. Microbiol., 8, 299-309 (1975).

**Studies on *Clostridium Sporogenes* I. DNA-DNA Homology, Cell Wall Sugar Components and Antigenic Properties of *Clostridium Sporogenes* and Proteolytic *Clostridium Botulinum***  
Satoshi Nakashio, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., 94, 963–972 (1985)

**Key words:** *Clostridium sporogenes*, proteolytic *Clostridium botulinum*, DNA-DNA homology, cell wall sugar component, agglutination test

#### Abstract

The present study was pursued to investigate the taxonomical position and genetical relationship of *Clostridium sporogenes* to proteolytic *Clostridium botulinum*. Sixty two isolates of *C. sporogenes* from canned foods were examined for cultural properties, heat resistance and DNA-DNA homology to *C. botulinum* A-190. Sporulation was observed in most of 21 umbonate and rhizoidal colony-forming strains (colony-type I strains), but not in most of the remaining 41 strains with convex and circular or crenate colonies with a mat to semi-glossy surface (colony-type II strains). More than half of the latter strains showed much higher heat resistance than the colony-type I strains. The DNA isolated from colony-type II strains was 81% or more homologous to *C. botulinum* A-190 DNA, forming DNA duplexes which exhibited thermostabilities similar to homologous DNA duplexes of strain A-190. Colony-type I strains differed from *C. botulinum* A-190 by 30 to 40% DNA homology and the DNA duplexes formed between these strains and strain A-190 showed  $\Delta T_m(e)$  values of  $7.0^\circ\text{C}$  when compared with the  $T_m(e)$  of homologous DNA duplexes of strain A-190. Although the analysis of cell wall sugar component was not useful to differentiate these types of *C. sporogenes* and proteolytic *C. botulinum* each other, the agglutination reaction by using heat-treated somatic antigen disclosed some antigenic differences among these groups.