

Clostridium bifermentas と Clostridium sordellii の分類学的再検討

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	http://hdl.handle.net/2297/8647

Clostridium bifermentans と Clostridium sordellii の分類学的再検討

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

林 秀 秋

(昭和51年10月9日受付)

Clostridium bifermentans と Clostridium sordellii は培養性状、生物性状が極めて似た菌種であり、僅かに毒素原性 (toxigenicity) とウレアーゼ産生能で異るとされた菌種であり、Bergey's determinative Bacteriology (第7版 1957)¹⁾ では C.sordellii は C.bifermentans の 1 変異株 (non-pathogenic variety) として取り扱われて来た。然し乍ら、元来、病原性 Clostridia 属の同定の最終的決定は、その出す specific toxigenicity によってなされるのであり²⁾、果して C.sordellii が C.bifermentans の無毒株であるかどうかは、clostridia 分類学上の懸案の問題であるばかりであるにとどまらず、「有毒種の無毒株とは何か」という基本的な問題に連なり、C.sordellii の無毒株を決めることにより、有毒株と無毒株間の Toxigenesis 研究の素材とするという意義をもっている。

分類学の立場からは既に Brooks ら³⁾ が両者を別種として取り扱う様述べているが、続いて Tamai ら⁴⁾ Huang ら⁵⁾ は「C.sordellii の single cell culture によって得られた菌の中から、毒性陰性で且ウレアーゼ陰性の極めて C.bifermentans に似た株をつくり出せる」と述べた。更に最近では Novotný⁶⁾ は両菌種の細胞壁構成糖が異なる所から両者が別種として区別し得る旨、述べている。著者は本研究で最近の分類学の新手法である数値分類⁷⁾ 及び DNA-DNA homology^{8,9)} DNA-DNA hybrids の熱安定性試験¹⁰⁾等を用いて、両者の関係を検討したいと考えた。且 Novotný らの主張にしたがい細胞壁構成糖の分析をも併せ検討した。

実験材料並びに方法

I. 使用菌株

使用菌株名並びにその由来については表 I に示した。

このうち、特に説明を要する株について述べれば次の如くである。C.sordellii 82は元来、英国 Leeds 大学細菌学教室 (Prof. C.L. Oakley) から西田が1959年金大医学部微生物学教室に持参したものであるが、持ち帰った時点で既に毒性 (-) でウレアーゼ (-) であったものである。当教室では、この株を strain 82 Kanazawa (82-KZ) と呼んでいる。Leeds 大学の原株から K. I. Johnston¹¹⁾ (Leeds 大学) によって C.sordellii 原株から single-cell isolation をうけたものを 82-SJ₂, 82-SJ₃、並びに 82-SJ₄ と名づけられた株¹²⁾ が Huang を通じて当教室に保存されている。元来、C.sordellii 82株はパリーのパスツール研究所に保管された株であるので、1963年に Prévot 博士が来日の際、特に持参願った株を 82-Pasteur (82-P) と本論文では記すこととする。SJ₄ 並びに 82-P 株はウレアーゼ (+) で毒性 (+) であるが、SJ₂, SJ₃ はウレアーゼ (-) 毒性 (-) で、この点 C.bifermentans と区別し難いものである⁵⁾。C.sordellii 7222R/100と記される菌は毒性株である C.sordellii 7222R を 100℃30分加熱することによって得られた無毒株であり、C.sordellii 1734/90 は毒性株である C.sordellii 1734を90℃30分加熱して得られた無毒株である。

II. 数値分類

菌の性状決定に使用するべき性状項目及びその方法については既に Nakamura ら⁷⁾ が clostridia について決めたものを用いた。更に、その他に deaminase 活性をも調べたが、基質としてはアラニン、アスパラート、アルギニン、グルタミン、ロイチン、メチオニンフェニールアラニン、セリン、バリン、スレオニンを用いた。項目総数は 162 である。項目のとり方、相似値 (Similarity value, 以下 S-値と略) の計算法等に

Reinvestigation on the taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*.
Hideaki Hayashi, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

ついても Nakamura ら⁷⁾の方法にしたがった。

III. 細胞壁構成糖

東洋濾紙No.51でペーパークロマトグラフィーを用いて Cummins and Johnson¹³⁾の方法にしたがって行った。細菌は1%フラクトース加PYF培地(プロテオースペプトン, イースト培地)(以下PYFと称する)を用いて培養した。PYF培地の構成はプロテオースペプトン No.2 (Difco, U. S. A.) 2%, 酵母エキス(大五, 東京) 0.5%, NaCl 0.5%, チオグリコール酸ソーダ 0.1%である。菌は対数増殖期に達した直後に収穫した。

IV. マンノースによる増殖阻害

0.5%フラクトース加PYF培地の12時間培養液 0.1 mlを10mlの1%マンノース加とマンノースを加えないPYF培地の両者にうえ, 菌増殖を波長 560 nm でその optical density (E₅₆₀)を Shimazu-Bosch-Lomb Spectronic 20 spectrophotometer (島津, 京都)で 12, 24, 48, 72時間目にそれぞれ測定した。pH 値の変化は Zeromatic SS-3 pH meter (Beckman-To-

siba Ltd, 東京)を用いて最終時の pH を測定した。

V. DNAの調整

菌はPYF培地で増殖させて得られたものを用いた。³HラベルDNAを得るために, 10 μ Ci の ³Hチミンを 100 mlの酵母エキス抜きPYF(つまり, PF)培地に加え対数増殖期後期に最終濃度50 μ g/mlになる様にペニシリンGを加えた。37 $^{\circ}$ Cで30分間さらに60 $^{\circ}$ Cで10分保ち, この菌液を遠心集菌し, 更に pH 8.0で 0.01M-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)を含む0.15M-NaCl液に懸濁した。この菌浮遊液を-25 $^{\circ}$ Cで保管し, 用いの際に緩解して用いた。菌浮遊液をリゾチム(1 mg/ml)で処理し, 更に3% Sodium lauryl sulfate (SLS)の中で菌融解を起こさせこの融解液を Marmur¹⁴⁾の方法にしたがってDNA抽出を行った。

VI. DNA-DNA homology 試験

メンブレンフィルターによる competition test を Johnsonら⁹⁾の方法にしたがって行った。即ち濾紙上のDNA (reference DNA) にホモロジーな10

表1 Sources and designations of organisms employed in numerical taxonomy and DNA reassociation studies

Name and strain number, as designated when isolated or received	Source or reference
<i>C. bifermentans</i> 181, 317, 302	Strains isolated from soils, Kanazawa, Japan (Nishida, Tamai and Yamagishi, 1964)
7031, 7033, 7034, 7036, 7037, 7039 506	Strains isolated from hen faeces, Kanazawa, Japan (Nishida <i>et al.</i> , 1964)
D-6	Huang, Hong Kong University, Hong Kong (originally NCTC 506) National Institute of Health, Tokyo, Japan
<i>C. bifermentans</i> -like strains 82-KZ, 82-SJ2, 82-SJ3, 6927 7222R/100	Huang, Hong Kong (Huang, 1959) Huang, Tamai and Nishida (1965)
<i>C. sordellii</i> 1732, 1619, 1620, 1621, 1623, 3703, 4707, 4708, 4709 6929, 6800, 1340, 1733, 1734, 7222R, 82-SJ4 1734/90 82-P	Mrs Irene Batty, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England Huang, Hong Kong (Huang, 1959) Huang <i>et al.</i> (1965) Prévot, Pasteur Institute, Paris
<i>C. sporogenes</i> 173, 14	Strains isolated from soil, Kanazawa, Japan
<i>C. botulinum</i> type A: 97-S type A: 190, type E: Iwanai, Tenno	National Institute of Health, Tokyo, Japan Hokkaido Institute of Public Health, Hokkaido, Japan

μ l のラベルDNA (1.0 μ g DNA) に対し, 100 μ l の 2.2 倍強のクエン酸ソーダ液 (以下 S S C と略す。S S C とは 0.15M-Sodium chloride と 0.015 M-Sodium citrate の略, pH 7.0) か或は competitor DNA (普通は 75 μ g を使うが時として 150 μ g を使う時もある) の 2.2 倍濃度 S S C 溶解液をバイアル瓶 (6 \times 25mm) の中に加える。フィルターのサイズは 3 \times 9 mm である。バイアル瓶を 60°C 15 時間で保った後, 60°C の温度で 2 倍強濃度の S S C で洗い, 乾燥した。その後 Unilex 1-A (Nuclear-Chicago Co., Des Plaines, Ill., U.S.A.) 液体シンチレーションカウンターで計測した。

VII. DNA-DNA hybrids の熱安定性試験¹⁶⁾

濾紙板上に吸収させた homologous 及び heterologous DNA の複合 hybrids は上述の操作方法によって作成した。この濾紙を 2 倍濃度の S S C で洗った後, 昆虫ピンで棘し, $\frac{1}{2}$ 濃度の S S C 1.2 ml を含むワッセルマン試験管 (13 \times 100 mm) の中に置く。この試験管は水槽の中に置く。次にこの濾紙を 10 分間隔で一連の 5°C ずつの差のある試験管の中をうつして行く。(水槽の温度は実際には 5 分たつと所定の新温度に到達する)。各々の試験管内容をシンチレーションバイアル瓶の中に空け, 0.5 ml の $\frac{1}{2}$ 濃度強の S S C で洗い更に 10 ml の Triton X-100 調整液 (トルエン対 Triton X-100 = 3 対 2) をバイアル瓶の中にうつし, 最後に液体シンチレーションカウンターにうつす。

実験結果

I. 数値分類による検討

8 株の有毒, 無毒の *C. sordellii*, 11 株の *C. bifermentans* 並びに 5 株の *C. bifermentans* 類似菌 (*C. sordellii* と命名保管されてはいるが, 無毒で且ウレアーゼ反応が陰性である) を用いて, コンピューターによる数値分類のデンドログラムを作ると (図 1) すべての株が極めて高い S-値, 即ち 88% で相互に連り, *C. sporogenes* や *C. botulinum* 等とは 82% で連り一応区別されることがわかった。この 88% で連る分類群 (88-phenon) は更に 91% の S-値の所で更に 2 つの分類群に分かれた。これを I, 及び II というふうにしたが phenon I には, すべての *C. bifermentans* 株と *C. bifermentans* 類似株が含まれたが, phenon II は, 有毒と無毒のすべての *C. sordellii* を含んだ。

いかにこの両群が類似した菌群であるかを見るために, 表 2 で phenon II (*C. sordellii* 群) の各菌の phenon II 群自身の各菌との S-値の総平均値 (平均

S-値) を出し, 且又, 第 I 群即ち *C. bifermentans* 及び *C. bifermentans* 類似菌各菌との S-値の総平均 S-値を出したものと比べたものを表 2 として示した。この表を見れば *C. sordellii* の中には *C. bifermentans* と極めて類似したものがあることが判る。この類似した両群の間で両者を区別する鑑別点を探すとすれば, マンノース, ソルビトールの分解, ウレアーゼ活性, アルギニン, デアミネース, 並びにマンノースによる増殖抑制の 5 規準と考えられた (表 3)。マンノースによる増殖抑制に関しては従来報告されていない新事実であるが, 1% 加マンノース加 P Y 培地では phenon I の菌群の増殖を促進したが, phenon II の菌群の増殖を抑制することが判った (表 4)。12~24 時間培養の後では菌の lysis が起るので 24 時間値の値を示した。この他 16 の糖を調べたが, いずれもマンノースによる増殖抑制の作用を見ることがなく, この phenon II 群に対するマンノースの増殖抑制は特異なものであることが判った。

II. 細胞壁構成糖

次に *C. sordellii* 並びに *C. bifermentans* の細胞壁構成糖をペーパークロマトグラフィーを用いて検討を行った (表 5)。用いた 34 株の内 1 株を除く 33 株のすべてにグルコースを証明することが出来たが, 18 株の *C. sordellii* の細胞壁にマンノースもラムノースも認めることは出来なかった。これに反してマンノースは 11 株の *C. bifermentans* のすべてに認められた。*C. bifermentans* のうち No. 7031, 7033, 7034,

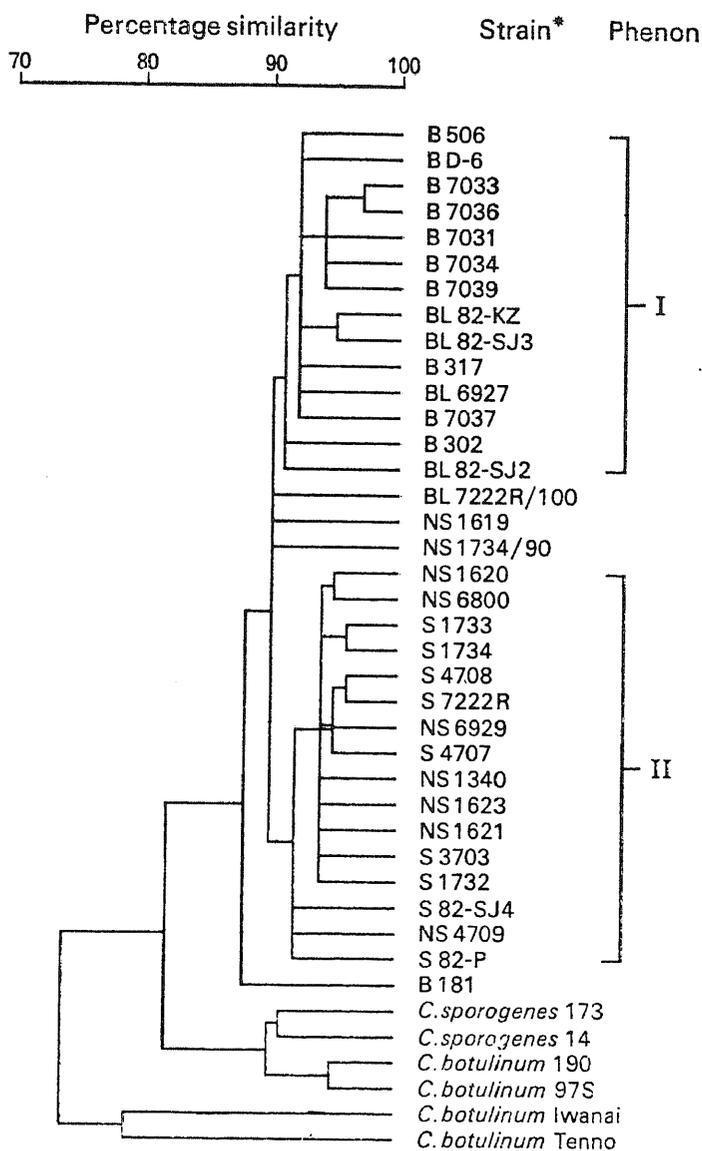
表 2 Mean similarities of each phenon-II strain (*C. sordellii*) to other strains in the same phenon (II) and to all strains in another phenon (I)

Strain in phenon II	Mean similarity value (%) to	
	phenon I	phenon II
<i>C. sordellii</i>		
1734	84	86
1620	83	90
1621	83	89
6800	83	89
3703	81	89
1733	81	90
6929	81	92
7222R	80	92
1732	80	89
1623	80	91
4709	80	89
1340	79	87
4707	79	90
82-SJ4	78	89
4708	78	90
82-P	77	88

7037並びに7039の記名をもつ5株は*C. bifermentans*としては異常に細小なコロニーを示すにもかかわらず、*C. bifermentans*の通常型の溶血環よりはるかにひろい溶血環を示すというものであるが、グルコース、マンノースとガラクトースを示し、ラムノースを認めることは出来なかった。*C. bifermentans*類似菌として用いた82-KZ菌はもともと毒素原性をもつ*C. sordellii*株から得たウレアーゼ、毒素原性共に陰性でコロニー

も又 *C. bifermentans* に似たものであるが、この菌の糖構成はグルコースとガラクトースを明瞭に認めることが出来たが、マンノース、ラムノースは認知することは出来なかった。現在毒性、ウレアーゼ陽性の定型的な *C. sordellii* 82-Pの細胞壁構成糖はグルコースの他に痕跡としてガラクトースを示し、82-KZと等しい構成を示した。しかしながらもともと82-KZから single cell isolation によって得られた82-SJ₂、

図 1



Dendrogram of *C. bifermentans*, *C. sordellii*, and reference strains. *B = *C. bifermentans*; BL = *C. bifermentans*-like strain; S = toxigenic *C. sordellii*; NS = non-toxicogenic *C. sordellii*.

82-SJ₃並びに82-SJ₄に関しては82-SJ₂と82-SJ₁はウレアーゼ、毒性共に陰性でコロニーも *C. bifermentans* に似たコロニーを呈するものであったが 82-SJ₂

に関しては、グルコースのみが証明されるにすぎず、毒性、ウレアーゼ共に陽性で定型的 *C. sordellii* の性状を示す82-SJ₄がグルコースのみを示すと全

表3 Some biochemical criteria differentiating phenon I from phenon II

Phenon	Number of strains included	Number of strains giving a positive result in tests for								
		fermentation of		growth inhibition by mannose*	phosphatase	urease	deaminase for			toxi-genicity
		mannose	sorbitol				arginine	valine	alanine	
I	14	12*	13	0	8	0	14	7	8	0
II	16	1	1	15	0	16	1	0	0	9

* See Methods and table 4.

表4 Inhibition of growth of certain organisms by mannose

Organism		Optical density (E_{560}) of culture at 24 h in medium*		pH value after culture for 72 h in medium*	
		PY	PYM	PY	PYM
Phenon I					
506	(B)†	0.48	1.24	8.07	5.52
D-6	(B)	0.34	0.58	7.84	6.52
7033	(B)	0.26	0.96	8.10	5.43
7036	(B)	0.30	0.96	8.02	5.30
7031	(B)	0.40	0.80	8.70	5.47
7034	(B)	0.33	0.89	8.07	5.34
7039	(B)	0.37	1.05	8.00	5.38
82-KZ	(BL)	0.57	1.30	8.10	5.70
82-SJ3	(BL)	0.47	1.22	7.98	5.58
317	(B)	0.34	1.18	8.12	5.54
6929	(BL)	0.55	1.16	8.09	5.61
7037	(B)	0.40	0.90	8.00	5.42
302	(B)	0.54	1.05	8.04	6.55
82-SJ2	(BL)	0.47	1.10	7.87	5.95
Phenon II					
1620	(NS)	0.44	0.05	8.00	7.60
6800	(NS)	0.42	0.25	7.99	7.71
1733	(S)	0.29	0.30	7.92	7.57
1734	(S)	0.21	0.10	7.90	7.82
4708	(S)	0.32	0.10	7.94	7.60
7222R	(S)	0.28	0.15	8.05	7.81
6929	(NS)	0.69	0.50	8.00	7.74
4707	(S)	0.31	0.05	7.86	7.44
1340	(NS)	0.54	0.22	7.90	7.70
1623	(NS)	0.41	0.09	8.00	7.64
1621	(NS)	0.49	0.23	8.05	7.70
3703	(S)	0.48	0.31	8.04	7.57
1732	(S)	0.31	0.01	8.02	7.40
82-SJ4	(S)	0.49	0.04	8.02	7.56
4709	(NS)	0.53	0.10	8.02	7.38
82-P	(S)	0.29	0.05	8.04	7.50
90-phenon					
7222R/100	(BL)	0.62	1.15	8.05	5.53
1619	(NS)	0.47	0.07	8.00	7.58
1734/90	(NS)	0.37	0.38	8.10	7.78

* PY = peptone yeast-extract medium; PYM = PY medium with mannose (1%) (see Methods).

† B = *C. bifermentans*; BL = *C. bifermentans*-like strain; S = toxigenic *C. sordellii*; NS = non-toxicogenic *C. sordellii*.

く等しい所見を呈した。しかし、82-SJ₃はウレアーゼ陰性、毒性陰性でコロニーも *C. bifermentans* と変らず、細胞壁構成糖も *C. bifermentans* と全く変らぬものであった。

III. DNA-DNA homology

phenon I (*C. bifermentans*) と phenon II (*C. sordellii*) との間でDNA-DNA homology 試験を行った (表6)。phenon I (*C. bifermentans* 群)の82 SJ₂は、元来、*C. sordellii* 由来のものであるが、培養性状、生化学性状の他にウレアーゼ、毒素原性、コロニーの所見から *C. bifermentans* と殆ど変らない一方 *C. sordellii* の株と90%のS-値を示す程に *C.*

sordellii にも近く、両者の関係を知るためあえて *C. bifermentans* のレファランス株として用いた。この82-SJ₂はDNA-DNA homology の上でも phenon I (*C. bifermentans* 群)の各者と91~100%にわたっての高いDNA-DNA相同性を示したが、phenon IIの各者とは43~72%にわたってのみにわたりながらもかなり高いホモロジーを示すことが判った。これに反して phenon II (*C. sordellii*) のレファランス株であるNo.1620株をレファランス株として、それぞれの各群の各者に対して検討する時、phenon I と phenon II はかなりに近いグループであるとは言え、区別しうる可能性があることが判った。

表5 Cell-wall sugars of *Clostridium sordellii* and *C. bifermentans*

Strain number	Cell-wall sugars present (+) or absent (-)*			
	galactose	glucose	mannose	rhamnose
<i>C. sordellii</i>				
1733	+	+	-	-
1734	-	++	-	-
4707	-	tr	-	-
4708	-	+	-	-
3703	+	+	-	-
82-P	tr	++	-	-
82-SJ4	-	++	-	-
1623	+	tr	-	-
1340	tr	tr	-	-
1619	-	+	-	-
1620	-	++	-	-
6800	tr	tr	-	-
6929	+	+	-	-
1621	tr	++	-	-
4709	tr	tr	-	-
7222R	-	++	-	-
1732	-	++	-	-
1734/90	tr	++	-	-
<i>C. bifermentans</i>				
302	-	++	++	++
506	-	+	+	+
317	-	+	++	-
181	+	+	+	+
7031	+	++	++	-
7033	+	+	+	-
7034	+	+	tr	-
7036	+	+	+	-
7037	+	+	+	-
7039	+	++	+	-
D-6	+	tr	+	++
<i>C. bifermentans</i> -like strains				
82-KZ	++	++	-	-
82-SJ2	-	+	-	-
82-SJ3	-	++	++	++
7222/100	-	++	++	++
6927	-	++	++	++

* tr = Trace; +, ++ indicate the relative amounts present.

IV. DNA-DNA duplex の熱安定性試験

同一 phenon 内の DNA 相互の間で形成させた DNA-DNA hybrids と異種の phenons の間に形成させた DNA-DNA hybrids に対してその安定性に対して熱安定性試験を行った。図 2 に示した様に phenon I のレファランス株の 82-SJ₂ にしろ phenon II のレファランス株の 1620 株にしても、その自己自身の DNA との hybrids は安定した変性カーブを示すにかかわらず、phenon I と phenon II 間の hybrids では、表 6 に示す様に $\Delta T_m(e)$ において、ホモローガスのコントロール値と 9~10°C の差 $\Delta T_m(e)$ を示した。これに反して、各 phenon 内群との菌相互の間では、DNA-DNA homology 試験ではいくらかの変異域を示しつつも、DNA-DNA hybrids の安定性に関しては、一定した安定性の差を示し、異った phenon I と phenon II との間では遺伝的には近いながらも、差を認めうる事が判った (ホモローガスな DNA duplex では 2.6°C 以下であったのに、異なる phenon の間では 7.8°C~10.5°C の間にわたった)。

考 察

Johnson (1973年)¹⁰⁾ は DNA-DNA homology という観点から species というものを定義し、80% 以上の相同性をもつものを geno-variety, 60~70% 台の相同性のものを geno-subspecies として、この程度までは一つの species として見なされるべきものとした (彼は現実に用いられている species と区別して geno-species とする言葉を用いている)。著者が本研究の対象とした *C. bifermentans* と *C. sordehlii* はこの見地から言えば、一つの geno-species に入れて良いものと思える。しかしながら、分類学というものの現実性から考え、医学上、*C. sordellii* が毒素原性のある菌種 (もつともその無毒株も多い) であり、*C. bifermentans* が決して毒素原性を示さぬ株であることを考える時、この DNA-DNA homology 上、約 30%, $\Delta T_m(e)$ 上約 10°C の差を示すこの近接した両群の間に何らかの差を示す性質を発見しようとし、例え僅かなものであっても、それで区別しよう

表 6 Polynucleotide sequence relationships between strains of phenons I and II

Organism	Data obtained in comparative tests with			
	strain 1620 (phenon II)		strain 82-SJ ₂ (phenon I)	
	Percentage homology	$\Delta T_m(e)$	Percentage homology	$\Delta T_m(e)$
Phenon II				
1620 (S)*	100	0	51	9.5
1734 (S)	100	...†	52	...
82-SJ ₄ (S)	99	0	72	9.9
1621 (NS)	97	...	72	...
4708 (NS)	97	...	71	...
1732 (S)	96	0.3	72	9.9
6800 (NS)	95	0	69	10.5
7222R (S)	94	...	69	...
3703 (S)	92	0.4	43	9.9
82-P (S)	88	...	55	...
Phenon I				
82-KZ (BL)	71	...	91	...
82-SJ ₃ (BL)	63	9.8	100	0.2
7034 (B)	62	9.7	97	0.5
7037 (B)	60	...	99	...
7033 (B)	57	...	100	...
7039 (B)	54	...	100	...
317 (B)	51	7.8	92	2.6
82-SJ ₂ (BL)	46	8.8	100	0
90-Phenon				
1734/90 (NS)	99	...	69	...
7222R/100 (BL)	60	...	98	...

* See footnote to table IV.

† ... = Not tested.

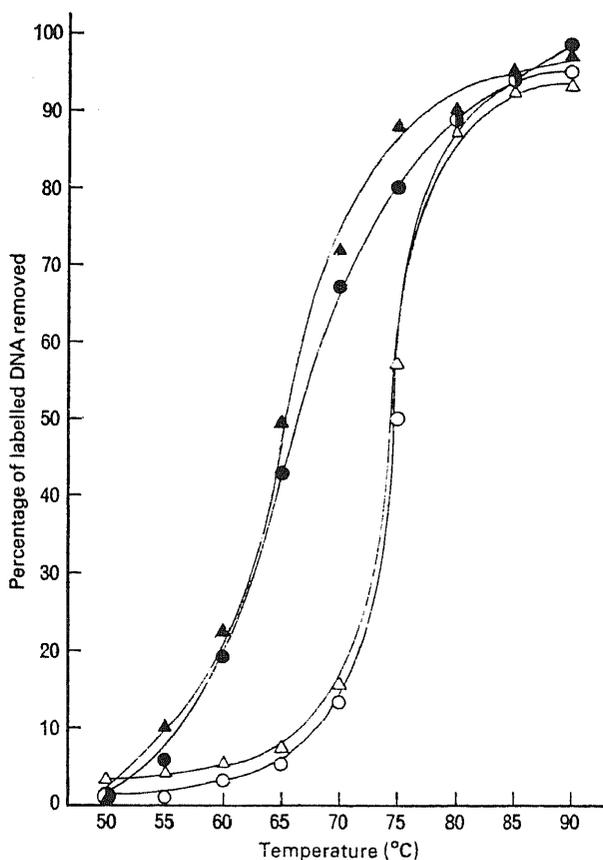
ならば、別種とすることは意義あるものと言うべきであろうと著者は考える(別種とするか、或は unidentifed として無毒の株を有毒種と区別することは、従来の医学にたづさわる分類学者の伝統的手法である)¹⁵⁾。この意味で著者は、従来から述べられているものの中で、ウレアーゼ、マンノース並びにソルビトールの分解の他に、アルギニン脱アミノ酵素反応、特にマンノースによる増殖抑制の有無が上述の遺伝学的差異に相応するものとして有意義な鑑別点と考えるに致った。

細胞壁構成糖に関しては Novotony⁶⁾ は、*C. bifermentans* はグルコース、マンノースとラムノース或はガラクトースから成り、*C. sordellii* はグルコースのみか或はグルコースの痕跡のガラクトースから成

るパターンを示すと述べて両者が区別しようと述べている。しかし、Rode ら¹⁶⁾によれば、彼の用いた6株中2株の *C. bifermentans* はグルコースのみの構成糖から成ると述べている(残りの4株はグルコース、ラムノースとに更にラムノースか或はガラクトースが加わっていると述べている)。

この様に、構成糖が菌によって色々異なるばかりではなく、一つの菌株についても色々な構成糖をもったものが現れ得ることが、*C. sordellii* 82の substrainsで見られると著者は本論文で述べた。元来、この株が無毒株を生じ易いことについて Brooks ら³⁾は1958年の記載の中で述べているが、Huang は Leeds 大学 K. I. Johnston の協力¹¹⁾により、この株より single cell

図 2



Thermo-stability profiles of homologous and heterologous duplexes of a strain 82-SJ2 of phenon I and a strain 1620 of phenon II. Strain 82-SJ2, ³H-DNA: △ homologous, ▲ heterologous; strain 1620, ³H-DNA: ○ homologous, ● heterologous. The reassociations were performed in double-strength SSC at 60°C. The elution profiles were performed in half-strength SSC.

isolation の操作の下に、いくつかの substrains (82-SJ₂, 82-SJ₃, 82-SJ₄) を得たが、著者はこの株をゆずりうけて検討した所、82-SJ₄ 及び82-SJ₃ は、すべての性状、DNA-DNA homology の上では全く *C. bifermentans* として良いにもかかわらず、その cell wall のみは *C. sordellii* のそれであるという結果を得た。Huang は又、この single cell から得たの82-SJ₄ の加熱耐性株を選択することによって、生化学性状、免疫学的性質 の上で *C. bifermentans* と区別し得ぬ似た菌を得たと述べている。我々の研究から推定して確かに、現実的には *C. bifermentans* と *C. sordellii* と一応区別して良い群が自然界に存在する様に思われるが、極めて近接性がつよいため時として区別し得ぬ中間株が現われると著者は考えるに致った。

結 論

Clostridium bifermentans と *Clostridium sordellii* の分類学的研究を numerical taxonomy (数値分類) と DNA-DNA homology 及び DNA-DNA hybrids の熱安定性試験の新方法を用いて再検討した結果、両者は遺伝学的には一つの geno-species とすべきものではあるが、いくらか異なることで sub-geno-species と見られることが判ったが taxonomy の「現実性」換言すれば「*C. sordellii* は有毒種であるのに *C. bifermentans* は決して毒素原性を示さぬという医学上の立場」から両者が実際の性状で区別しうるものがあれば区別したいとする立場に立ち、この鑑別点として、ウレアーゼ産生能、マンノース、ソルビトール分解能という従来知られたものを確認すると共に新しく、アルギニン脱アミノ活性並びにマンノースによる増殖の抑制の有無に由る差を用いることが出来ることが判った。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った西田尚紀教授ならびに種々なる御援助御助言を戴いた中村信一助教授、島村外百助手に深く感謝の意を表します。また微生物学教室員各位の御協力に対して謹んで謝意を表します。

文 献

- 1) **Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R.** : Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., p. 634, Baltimore, Williams & Wilkins, Co (1957).
- 2) **Oakley, C. L.** : Soluble bacterial antigens as discriminants in classification in Microbial classification edited by Ainsworth, G. G. & Sneath, P. H. A. p. 242, Cambridge, University Press (1962).
- 3) **Boorke, M. E. & Epps, H. B. G.** : J. Gen. Microbiol., 21, 144 (1958).
- 4) **Tamai, K. & Nishida, S.** : J. Bact., 88, 1647 (1964).
- 5) **Huang, C. T., Tamai, K. & Nishida, S.** : J. Bacteriol., 90, 391 (1965).
- 6) **Novotný, P.** : J. Med. Microbiol., 2, 81 (1969).
- 7) **Nakamura, S., Shimamura, T., Hayase, M. & Nishida, S.** : Int. J. syst. Bacteriol., 23, 419 (1973).
- 8) **McCarthy, B. J. & Balton, E. T.** : Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 50, 156 (1963).
- 9) **Johnson, J. L. & Ordal, E. J.** : J. Bacteriol., 95, 893 (1968).
- 10) **Johnson, J. L.** : Int. J. syst. Bacteriol., 23, 308 (1973).
- 11) **Johnstone, K. I.** : J. Gen. Microbiol., 9, 293 (1953).
- 12) **Huang, C. T.** : Comparison of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. Ph. D. Thesis, University of Leeds, England (1959).
- 13) **Cummins, C. S. & Johnson, J. L.** : J. Gen. Microbiol., 67, 33 (1971).
- 14) **Marmur, J.** : J. Molec. Biol., 3, 208 (1961).
- 15) **Smith, L. D. S.** : Introduction to pathogenic anaerobes, 1st, ed. p. 21, Chicago, The University of Chicago Press (1955).
- 16) **Rode, L. J. & Smith, L. D. S.** : J. Bacteriol., 105, 349 (1971).

Abstract

Reinvestigation on the taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. Hideaki Hayashi, Department of Bacteriology (Director : Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

The taxonomic relationships between *Clostridium bifermentans* and *C. sordellii* were reinvestigated by numerical taxonomy, studies of DNA-DNA homology and DNA duplex thermal stability, and by analysis of cell-wall sugar components. Although the results indicate that both species may be grouped into one geno-species, *C. sordellii* strains could be differentiated from *C. bifermentans* strains on the basis of a few phenetic criteria that include the inability to ferment mannose and sorbitol, the absence of mannose in the cell wall, the production of urease, the absence of arginine deaminase activity, and susceptibility to inhibition of growth by mannose.
