

ウレアーゼ陰性のClostridium sordelliiについて

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/2297/8648

ウレアーゼ陰性の *Clostridium sordellii* 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)

林 秀 秋
 島 村 外 百
 中 村 信 一

(昭和51年10月9日受付)

最近、Miwa¹⁾は南極土壌から多数の *Clostridium sordellii* と *C. bifermentans* を分離したと報告した。この両種は新しく出来た Bergey's Manual 第8版(1974)²⁾ではウレアーゼによって区別されている。著者らは Miwa よりこれらの株の供与をうけて検討中、Miwa によって *C. bifermentans* と同定された株の多くが、ウレアーゼは陰性であるが、他の多くの性状の上で、著者或はこれまでの他の著者達が³⁾⁻⁶⁾ *C. sordellii* について述べてきた性状と一致するものであることが判った。毒性とウレアーゼ反応は *C. bifermentans* と *C. sordellii* を区別する数少ない criteria のうちの最も重要な鑑別点であるが、毒性はしばしば失われるので実際には、ウレアーゼのみが重要な決め手としてこれまで信じられて来ているので、著者らは本論文で果してウレアーゼ陰性の *C. sordellii* なるものが存在するか、否かについて DNA-DNA homology⁴⁾ 並びに細胞壁構成糖成分の分析⁴⁾⁷⁾ 並びにマンノース増殖抑制法⁴⁾を使用して分類学的検討を行った。

実験材料及び方法

I. 使用菌株

Miwa によって *C. bifermentans* 或は *C. sordellii* と同定された全部で72株を鈴木祥一郎教授(岐大, 医, 細菌)の好意により分与をうけた。これらは次の通りである。ウレアーゼ陰性株として J AM Nos. 11, 21, 30, 42, 142, 235, 237, 463, 512-m, 712, 1, 2, 12, 32, 36, 39, 42, 46, 50, 53, 60, 62, 65, 68, 70, 73, 76, 77, 101, 103, 150, 153, 162, 168, 177, 203, 470。ウレアーゼ陽性株として J AM Nos. 8, 20, 27, 29, 36, 38, 40, 41, 44, 48, 79, 86, 89, 92, 245, 247, 249, 252, 254, 255, 256, 257,

258, 259, 262, 303, 317, 318, 319, 320, 321, 473, 475, 506, 512-s。

DNA-homology 上のレファランス株としては *C. bifermentans* 82-SJ₂ (この菌については林⁴⁾参照), *C. sordellii* 1620を用いた。

II. 生化学性状

Nakamura⁵⁾, Tamai⁶⁾及び Nishida⁸⁾にしたがって行われた。

III. 毒性検査

Nishida⁵⁾にしたがって行った。

IV. 種々のテスト

細胞壁構成糖, マンノース増殖抑制試験, DNA-DNA homology tests は林⁴⁾にしたがった。

結 果

I. 培養並びに生化学性状

ウレアーゼ陰性のため Miwa によって *C. bifermentans* と同定されたウレアーゼ陰性の37株のうち10株は、マンノース、ソルビトール分解陽性でマンノース、ソルビトール陰性の、残りの27株とくらべて明確に区別しうる程度に著しくインドール反応を呈した。且又、その2群はコロニー性状でもはっきり区別し得た。即ち、前者の10株は *C. bifermentans* 82-SJ₂ に似ているのに対し、のこりの27株の方は *C. sordellii* 1620に似たものであった(コロニーについてはBrooksの論文³⁾に詳しい)。したがってこの10株は *C. bifermentans* と見なして、他の27株から離し、この27株即ち J AM Nos. 1, 2, 12, 32, 36, 39, 42, 46, 50, 53, 60, 62, 65, 68, 70, 73, 76, 77, 101, 103, 150, 153, 162, 168, 177, 203, 470 について *C. sordellii*-like strains と命名して更に検討に付することとした。

Urease-negative strains of *Clostridium sordellii*. Hideaki Hayashi, Tomo Shimamura, and Shinichi Nakamura, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

Miwwa によってウレアーゼ陽性で *C. sordellii* と同定された株は、著者らが今 *C. sordellii*-like strains と命名した27株とはウレアーゼ産生をのぞけば、全く差異のないものであった(但し、すべて毒性は陰性である)。この株は35株で、Miwa の命名通り *C. sordellii* と命名し、本論文では *C. sordellii*-like strains とは一応区別してとりあつた。但し、この両者の間には差異は殆ど認められなかった。

II. 細胞壁構成糖の決定

8株の *C. sordellii*-like strains, 9株の *C. sordellii* 並びに3株の *C. bifermentans* をそれぞれの群から任意に選び、ペーパークロマトグラフィーによって糖構成を調べたのが表 I である。

C. sordellii と *C. sordellii*-like strains のすべてに未知の糖が認められたが、*C. bifermentans* のどの株にも見ることはできなかった(この未知の糖はスポットした点に最も接近して現われた)。

既知糖としては *C. sordellii*-like strains はガラクトースのみであり、*C. sordellii* はグルコースかガラクトース或は両者共の場合であり、*C. bifermentans* のそれはグルコース、マンノース、ラムノースであった。

III. マンノースによる増殖抑制試験

C. sordellii-like strains, *C. sordellii* 並びに *C. bifermentans* を培養し、6, 12, 24, 48, 72, 120, 160 時間培養後にその増殖を波長 560 nm で Optical density (OD 値) を測定した。図 1 で示す様にマンノース加の培地では *C. sordellii* と *C. sordellii*-like strains では、急激な OD 値の減少が起った。これに反して *C. bifermentans* の場合には同一条件下ではマンノースにより増殖は促進された。48時間目に顕微鏡下でこの培養液を調べて見るとマンノースを付加しない場合では沢山の胞子が観察されたのに対し、マンノースを付加した培地では細菌細胞の殆どは胞子を形成することが出来ずむしろ退化した形を示した。

C. bifermentans でもこの傾向はほぼ同じではあったが、*C. sordellii* にくらべて、マンノースの影響は、より弱く現われた。

この事実から、マンノースによる OD 値の減少は増殖の阻止と言うよりむしろ細菌の溶解促進に由るものと推定されるに到った。同様な事実は24株の *C. sordellii*-like strains, 32株の *C. sordellii* の殆どの株にあてはまった(自家融解のはげしい株がいくらかあり、この株では正確な測定は出来なかった)。

表 1 Cell wall sugar components of *C. sordellii*, *C. sordellii*-like strains, and *C. bifermentans*

Strain	Urease	Cell wall sugars				
		Gal*	Glu*	Man*	Rha*	Unk*
<i>C. sordellii</i>						
JAM 41	+	-	+	-	-	+
JAM 44	+	++	-	-	-	+
JAM 79	+	Tr	+	-	-	+
JAM 89	+	Tr	Tr	-	-	Tr
JAM 92	+	+	+	-	-	-
JAM 259	+	-	+	-	-	-
JAM 262	+	-	Tr	-	-	Tr
JAM 303	+	++	-	-	-	+
JAM 319	+	++	-	-	-	+
<i>C. sordellii</i> -like strains						
JAM 32	-	Tr	-	-	-	Tr
JAM 36	-	-	-	-	-	+
JAM 42	-	+	-	-	-	+
JAM 46	-	++	-	-	-	-
JAM 60	-	+	-	-	-	+
JAM 73	-	+	-	-	-	+
JAM 101	-	+	-	-	-	+
JAM 470	-	+	-	-	-	+
<i>C. bifermentans</i>						
JAM 235	-	-	++	+	++	-
JAM 237	-	-	++	+	++	-
JAM 463	-	-	++	+	+	-

*Gal = galactose, Glu = glucose, Man = mannose, Rha = rhamnose, Unk = unknown sugar.
NOTE: Tr = trace; +, ++ indicate the relative amounts present.

IV. DNA-DNA homology の測定

C. sordellii-like strains, *C. sordellii* 並びに *C. bifermentans* の関係をDNA-DNA homology で調べた成績を表2に示す。7株の *C. sordellii*-like strains, 5株の *C. sordellii* 並びに3株の *C. bifermentans* 株を任意にとりあげ検討したのであるが *C. sordellii*-like strains と著者らが一応今まで命名したものは *C. sordellii* の中に入れられるべきものであることが判った。

考 察

C. sordellii は現在 *C. bifermentans*からは毒性とウレアーゼ反応で区別されているが²⁾⁹⁾¹⁰⁾, *C. sordellii* の無毒株はめづらしくないので¹¹⁾ウレアーゼのみが重要な鑑別点となっている。この研究では、ウレアーゼ陰性の *C. sordellii*-like strains がマンノース分解並びに細胞壁構成糖中のマンノースの欠如, 並びにマンノースによる自家融解の促進並びにDNA-DNA

homology 上で区別しうることが判った。

著者の研究室ではしばしばマンノース陰性の *C. bifermentans* 株を分離することがあり又この様な株の同定依頼をうけることがあるが、これらの株について7日間培養を仔細に日を追って観察する限り7日間の内何日目かには糖を分解していることが判った。これらの株は常にマンノースによって増殖が促進されるか、少くともマンノースによって増殖が抑制されることはないで、著者らはこの試験によって容易にウレアーゼ陰性の無毒の *C. sordellii* を *C. sordellii* と同定することが出来た。

最近 Smith¹²⁾ は *C. sordellii* は土中に広く存在していると述べているが、このことはウレアーゼ陰性の *C. sordellii* も広く存在して *C. bifermentans* との鑑別を困難にする可能性があると考えられる。既に Rode¹³⁾ も又マンノース陰性の *C. bifermentans* について述べている。したがって著者らとしてはこの鑑別には、細胞壁の構成糖中のマンノースの欠如, マンノース発酵の欠如, 並びにマンノースによる増殖抑制を考慮に入れることが望ましいものと信ずる。但し、このマンノースに関する如上の諸現象が同一の機構に基くものかどうかについては著者は更に検討するには到らなかった。

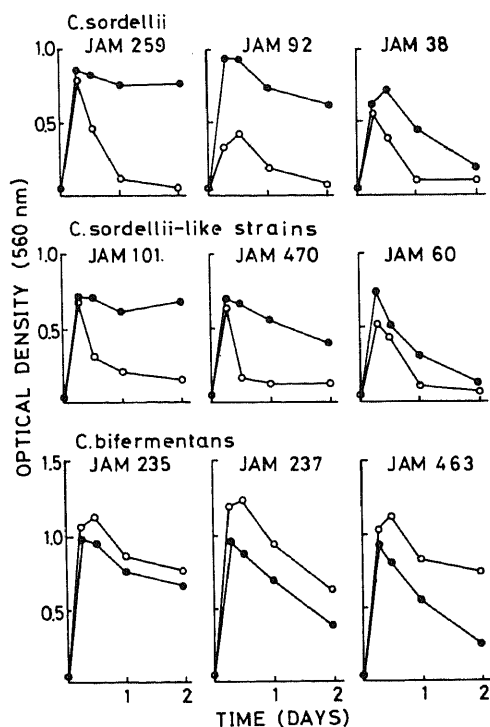


図1 Growth in the presence of 1% mannose. PY medium with 1% mannose (○), PY medium (●). PY medium 2% proteose peptone (Difco, No. 2) water containing 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, and 0.1% sodium thioglycollate (pH 7.2).

表2 DNA-DNA homology of *C. sordellii*, *C. sordellii*-like strains, and *C. bifermentans*.

Organisms	Urease	% homology to DNA from:	
		1620	82-SJ2
<i>C. sordellii</i>			
1620	+	100	35
JAM 41	+	93	37
JAM 79	+	91	44
JAM 259	+	93	
JAM 262	+	93	28
JAM 319	+	89	39
<i>C. sordellii</i> -like strains			
JAM 32	-	89	34
JAM 36	-	91	49
JAM 42	-	90	37
JAM 60	-	84	43
JAM 73	-		40
JAM 101	-	93	
JAM 470	-	93	
<i>C. bifermentans</i>			
82-SJ2	-	54	100
JAM 235	-	48	99
JAM 237	-	42	72
JAM 463	-	51	96

結 論

毒素原性陰性で且ウレアーゼ陰性であることに基き *Clostridium bifermentans* と元来同定された37株(これらはすべて南極から分離された)のうち27株はDNA-DNA homology 試験, 細胞壁構成糖中のマンノースの欠如, マンノースによる増殖抑制試験によって *C. sordellii* と同定した。*C. sordellii* の細胞壁構成糖について調べて見た所, ウレアーゼ陰性として用いた8株のいづれにもグルコース, マンノース, ラムノースは証明されず, ガラクトースのみが発見された(1株にはガラクトースも見出されなかった)。これに対しウレアーゼ陽性株ではグルコースかガラクトースか或は両者が存在することが判った。

稿を終るにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を戴いた西田尚紀教授ならびに御助力を得た微生物学教室員各位に深く感謝の意を表します。また菌分与に御協力を得た岐阜大学医学部細菌学教室の鈴木祥一郎教授, 上野一恵助教授, 三和敏夫博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Miwa, T. : Jpn. J. Med. Sci. Biol., 28, 201 (1975).
- 2) Smith, L. DS. & Hobbs, G. : *Clostridium*. In Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8th ed. Edited by R.E. Buchanan and N. E. Gibbons. Williams & Wilkins Company, Baltimore Md. pp. 551 (1974).
- 3) Brooks, M. E. & Epps, H.B. G. : J. Gen. Microbiol., 21, 144 (1958).
- 4) 林 秀秋: 十全医会誌, 印刷中
- 5) Nishida, S., Tamai, K. & Yamagishi, T. : J. Bacteriol., 88, 1641 (1964).
- 6) Tamai, K. & Nishida, S. : J. Bacteriol., 88, 1647 (1964).
- 7) Novotný, P. : J. Med. Microbiol., 2, 81 (1969).
- 8) Nakamura, S., Shimamura, T., Hayase, M. & Nishida, S. : Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 419 (1973).
- 9) Holdeman, L. V. & Moore, W. E. C. : M., Anaerobe laboratory manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Va. (1972).
- 10) Smith, L.DS. & Holdeman, L.V. : The pathogenic anaerobic bacteria. 1st ed. Charles C. Thomas, Publishers, Springfield, Ill. (1968).
- 11) Shimamura, T., Nakamura, S., Hayase, M., & Nishida, S. : J. Med. Microbiol., 7, 277 (1973).
- 12) Smith, L. DS. : Appl. Microbiol., 29, 590 (1975).
- 13) Rode, L.J. & Smith, L. DS. : J. Bacteriol., 105, 349 (1971).

Abstracts

Twenty-seven of 37 non-toxigenic, urease-negative strains originally identified as *Clostridium bifermentans* that were isolated in the Antarctic were reidentified as *C. sordellii* by the tests for DNA-DNA homology, by the absence of mannose in the cell wall, and by growth inhibition of mannose. The test for cell wall sugar components of urease-negative and -positive strains of *C. sordellii* revealed that glucose, mannose, and rhamnose could not be detected in any of eight urease-negative strains used but galactose was detectable in seven of the eight strains and that glucose or galactose or both of the two sugars were present in the urease-positive strains tested.