



Title	海水より分離した球菌の数値分類に関する研究
Author(s)	絵面, 良男; EZURA, Yoshio; 坂井, 稔 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 21(2), 152-159
Issue Date	1970-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23423
Type	departmental bulletin paper
File Information	21(2)_P152-159.pdf



海水より分離した球菌の数値分類に関する研究

絵面 良男*・坂井 稔*

Numerical Taxonomy of Micrococci Isolated from Sea Water

Yoshio EZURA and Minoru SAKAI

Abstract

Numerical taxonomy was applied to eighty strains of gram-positive and catalase positive cocci isolated from sea water. These strains were divided into 6 groups (groups I~VI) which consisted of 2 groups of genus *Staphylococcus* and 4 groups of genus *Micrococcus*, but could not be defined as a group of genus *Sarcina*.

In comparison with the previously reported subgroups B~K, group I was a group of *Staphylococcus* which mostly contained the strains of subgroups B, C and D; group II, a group of *Staphylococcus* with subgroups C, D and E; group III was a group of genus *Micrococcus* which mostly contained the strains of subgroups F and G; group IV, *Micrococcus* subgroup J which produced pink pigment; group V, a group of *Micrococcus* with subgroup I and *Sarcina* subgroup K; group VI, a group of *Micrococcus* with subgroups H and I.

結 言

従来の微生物分類法では分類上の key として特定の形態学、生物学あるいは生化学的性状などを重視して、それら特定の性状の相違により微生物を分類上の単位に分別する方法が採られてきたが、このような方法は分類学的に縦の関係は表わし得ても、属間、種間など横の類似性または近縁関係を明確にし得難く、また特定の性状に分類上の“重み”を置くことは分類上に主観性が強く影響し、客観性の乏しくなる傾向は歪み得ない。これらの点を是正する目的で Sneath¹⁾は Adanson (1763) が軟体動物の分類に用いた分類法を応用して新しい微生物の分類法すなわち数値分類法 (numerical taxonomy または Adansonian classification) を提案した。この数値分類法は分類しようとする菌株についてできるだけ数多くの性状を検査し、かついかなる性状も均等とみなし、菌株間で同じ結果を示す性状および異なる結果を示す性状を数えて数学的に相似性パーセント (Similarity value) を算出したのち、その数値によって微生物を分類する方法である。

その後この分類法は多数の研究者により種々の微生物について検討されてきたが、グラム陽性球菌については Hill²⁾, Pohja and Gyllenberg³⁾, Rosypal et al⁴⁾ および Hubálek⁵⁾ らの報告がみられる。著者らは先に海水から分離したグラム陽性・カタラーゼ陽性球菌を従来法に基づく方法で分類し、その結果を報告したが⁶⁾、本報では先の分類結果をさらに数値分類法により検討すると共に数値分類法についても若干の考察を行なったのでその結果を報告する。

実 験 方 法

供試菌: 先の実験⁶⁾に用いた301株の球菌のうち、1959年北太平洋海域海水から分離した球菌 172株

* 北海道大学水産学部微生物学講座

Table 1. List of features employed in numerical analyses of relationships among the test organisms

Property	No. of features	Property	No. of features
Gram reaction	2	Lipase	1
Cell arrangements	6	Urease	1
Diameter of cells	2	Anaerobic acid production from glucose, mannitol	1 each
Colonial morphology	6	Aerobic acid production from arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannitol	1 each
Pigments	5	sucrose, lactose, maltose, inositol, raffinose, dextrine, glycerol	1 each
Motility	1	Voges-Proskauer reaction	1
Growth in nutrient borth	6	Methyl red test	1
Growth on potato	1	Hydrolysis of gelatin, starch, casein, tween 20, tween 80	1 each
Growth at 37°, 40°C	1 each	Nitrate reduction	1
Growth on tellurite-glycine agar	1	H ₂ S production	1
Growth in presence of 15% NaCl	1	B.C.P. milk reaction	3
10% bile	1	Utilization of ammonium phosphate, ammonium acetate	1 each
0.25% phenylethylalcohol	1		
0.01% azaid	1		
Sea water requirement for growth	3		
Coagulase	1		
Catalase	1		
Phosphatase	1		
Oxidase	1 each		

中より無作為的に80株を選び、さらに対照菌株として当教室で保存中の *Staphylococcus aureus* (Mi. 3), *Sarcina lutea* (Mi. 7) および *Micrococcus roseus* (Mi. 9) の計3株を供試した。

形態学、生物学および生化学的性状：すべて先に報告した実験結果⁶⁾をそのまま採用した。

数値分類：まず Table 1 に示した形態学、生物学および生化学的性状の69項目の検査結果を記載したカードを作製し、そのカードを用いて供試菌株のすべてについて2株ずつ対比させ、両菌株とも陽性の項目数 (N_p)、陰性の項目数 (N_n) および両菌株間で異なる結果を示す項目数 (N_d) を求め、次の Sneath¹⁾ (1) および Silvestri²⁾ (2) の式により両菌株間の相似性を % (Similarity value) で表わした。

$$\frac{N_p}{N_p + N_d} \times 100 = S\text{-value } (\%) \dots\dots\dots (1)$$

$$\frac{N_p + N_n}{N_p + N_n + N_d} \times 100 = S\text{-value } (\%) \dots\dots\dots (2)$$

すなわち2菌株ずつの対比を83株すべての組合せについて実施し、S-value表を作製し、高いS-valueを示す組合せより順次拾い出して group を作り、さらに菌株および group の配列順序を三角平均 (triangle mean) により決定した。また group 間の関係は group 間の S-value の平均を求めて得た。

結 果

1. S-value 算出法の比較

Sneath¹⁾ および Silvestri²⁾ の2つの式より算出した S-value を整理した結果を Fig. 1 および Fig. 2 に図示した。ともに供試菌株80株は I~VI の6 groups に分けられ、各 group を構成する菌株数は group I が19株、II が9株、III が7株および V が13株で、これらの group においては両式

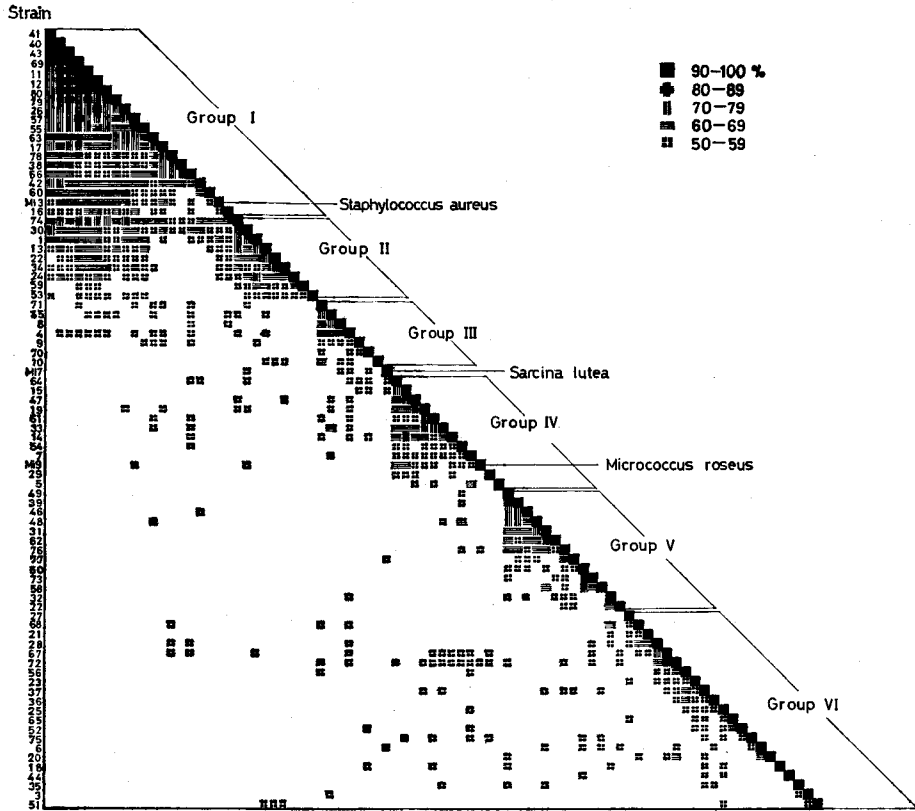


Fig. 1. Diagrammatic representation of the full table of S-value calculated by the Formula (1)

による結果は同一であったが配列順序には多少の変動がみられた。また group IV と VI においては両式により構成菌株数が異なり、(1)式による group IV の 11株中の 3株が(2)式では group VI に含まれた。次に S-value の算出に用いた両式のうち、対比させた 2 菌株が共に陰性である項目数を計算に加える Silvestri らの (2)式では当然高い S-value が算出されることは明らかであり、また Sneath の (1)式を用いた場合、陽性または活性を示す項目数の非常に少ない菌株間の対比では、異なる結果を示す項目の 1つ多いか少ないかが(2)式の場合に比較して当然 S-value に大きな影響を与える。その結果 Fig. 1 および Fig. 2 に示すごとく両者間における group 構成菌株数および菌株の配列順序に幾分の変動がみられた。なお(2)式による結果は(1)式による結果に比べ group 内の S-value の変動が少く、group 形成が明確となることから以後の記載は(2)式により得られた結果についてのみ記述することとする。

2. group 間の関係

Fig. 2 より I~VI の各 group 間の関係はおおむね推定できるが、さらにこれを group 内および group 間の S-value の平均値を求めて、各 group 間の関係を明確化したものが Table 2 および Fig. 3 である。すなわち各 group とも 80% 前後の平均値を示し、特に group IV は 82% と最も高い値を示す相似性の高い均一な group であり、一方 group VI は各 group 中最も低く(76%)比較的不均一

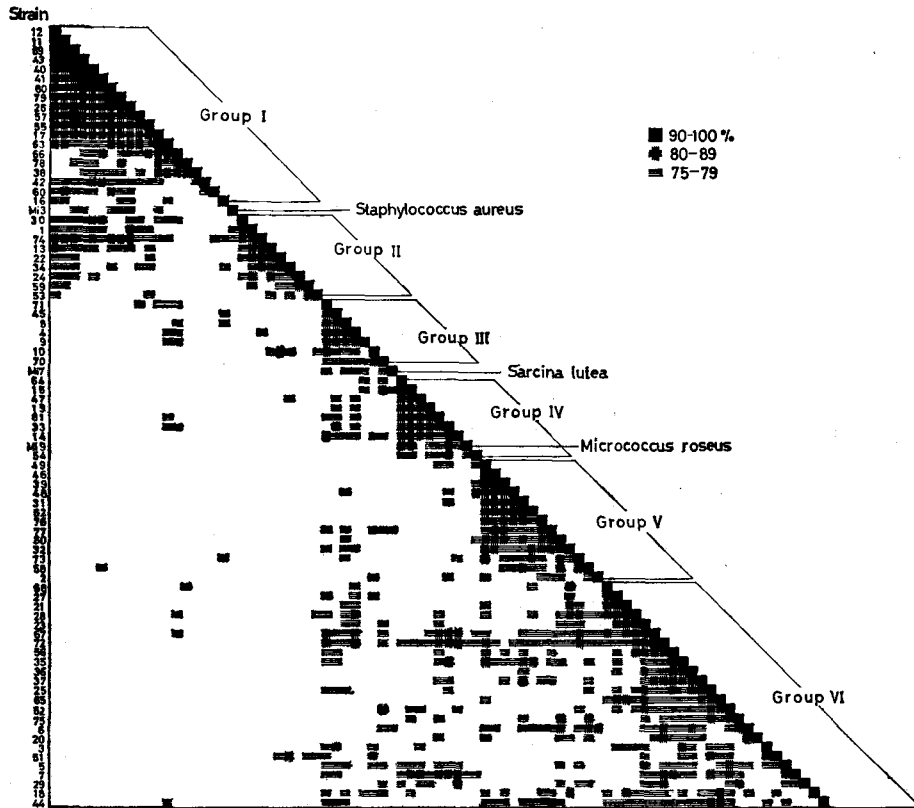


Fig. 2. Diagrammatic representation of [the full table of S-value calculated by the Formula (2)]

Table 2. Intra-group and inter-group mean S-values (%)

Groups (No. of strains)	I	Mi. 3	II	III	Mi. 7	IV	Mi. 9	V	VI
Groups	(19)	(1)	(9)	(7)	(1)	(8)	(1)	(13)	(24)
I	80								
Mi. 3	72	100							
II	70	70	78						
III	67	61	68	81					
Mi. 7	61	57	67	79	100				
IV	63	60	64	73	70	82			
Mi. 9	62	61	64	67	70	82	100		
V	57	55	57	68	69	68	68	80	
VI	60	57	62	71	67	70	67	71	76

な group であることが推察された。次に group 間の関係についてみると、group I~II と group III~VI との間の平均 S-value は 61% と相似性の低いことから供試菌は大きく 2 群に分かれ、先に報告した分類結果⁶⁾ から group I および II は genus *Staphylococcus* に、group III~VI は genus *Micro-*

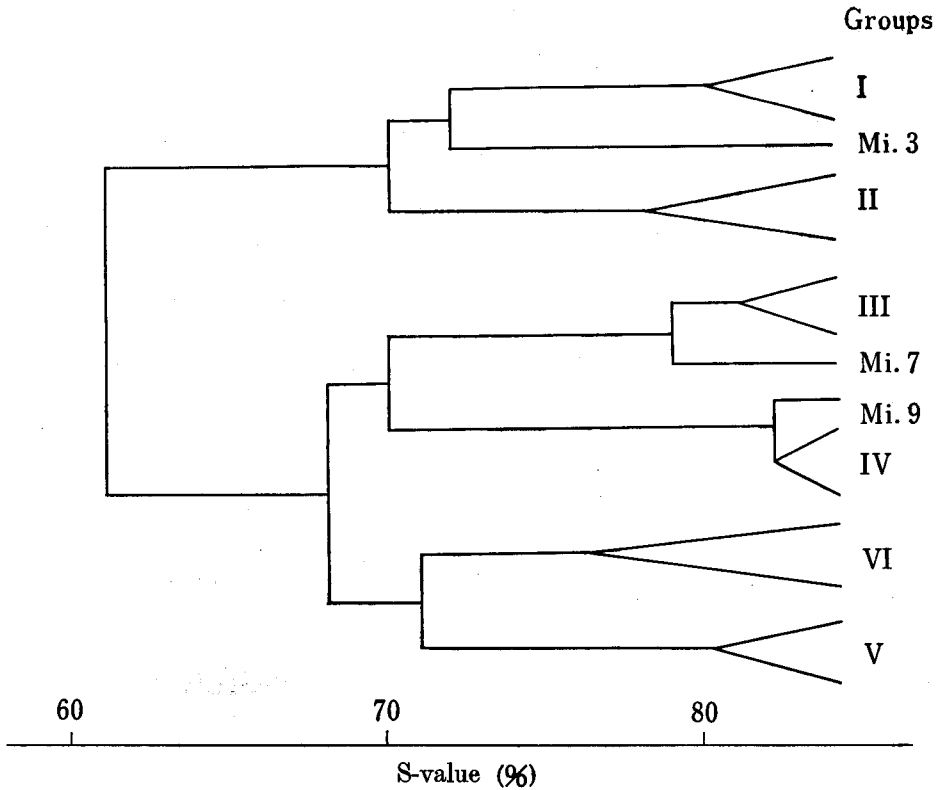


Fig. 3. Diagram of the relationships among the groups

coccus または genus *Sarcina* に該当することが認められた。また group III と IV は比較的の近縁であり、group VI は V に比べ、III および IV に近い関係にあることが明らかになった。

3. 分類学的検討

著者らは先に Fig. 4 に示すごとき分類法⁹⁾を創定し、海水から分離した球菌について分類を行い、その結果を報告した。そこで先に報告した本実験供試菌の従来法による分類結果と本報の数値分類法によって得られた結果とを対比させると Table 3 に示すごとき関係が得られた。本実験結果の group I は先の報告の *Staphylococcus* subgroup B, C, D, group II は B, C, D, E に分類された菌株を含み、すべて genus *Staphylococcus* に属する菌株より構成されているが、*Staphylococcus* subgroup E に属する 1 株が group III に含まれた。また group III は *Micrococcus* subgroup F, G および *Sarcina* subgroup K の一部を包含し、この group は Fig. 3 にみられるごとく group I および II よりは group IV~VI に近縁の group である。group IV はすべて桃色素を産生する菌株よりなり、*Micrococcus* subgroup J と全く一致し、最も相似性の高い group であることが立証された。group V は *Micrococcus* subgroup G, I の一部のほか *Sarcina* subgroup K を多く含むが対照株として用いた *Sarcina lutea* (Mi. 7) は group III に近似であり group V を genus *Sarcina* に属するものとは断定できない。しかしながら *Sarcina lutea* 1 株のみで genus *Sarcina* を代表させることのできないことももちろんである。group VI は 生化学的活性の弱い *Micrococcus* subgroup H および I を主体に構成されており、他の group に比し不均一な group である。

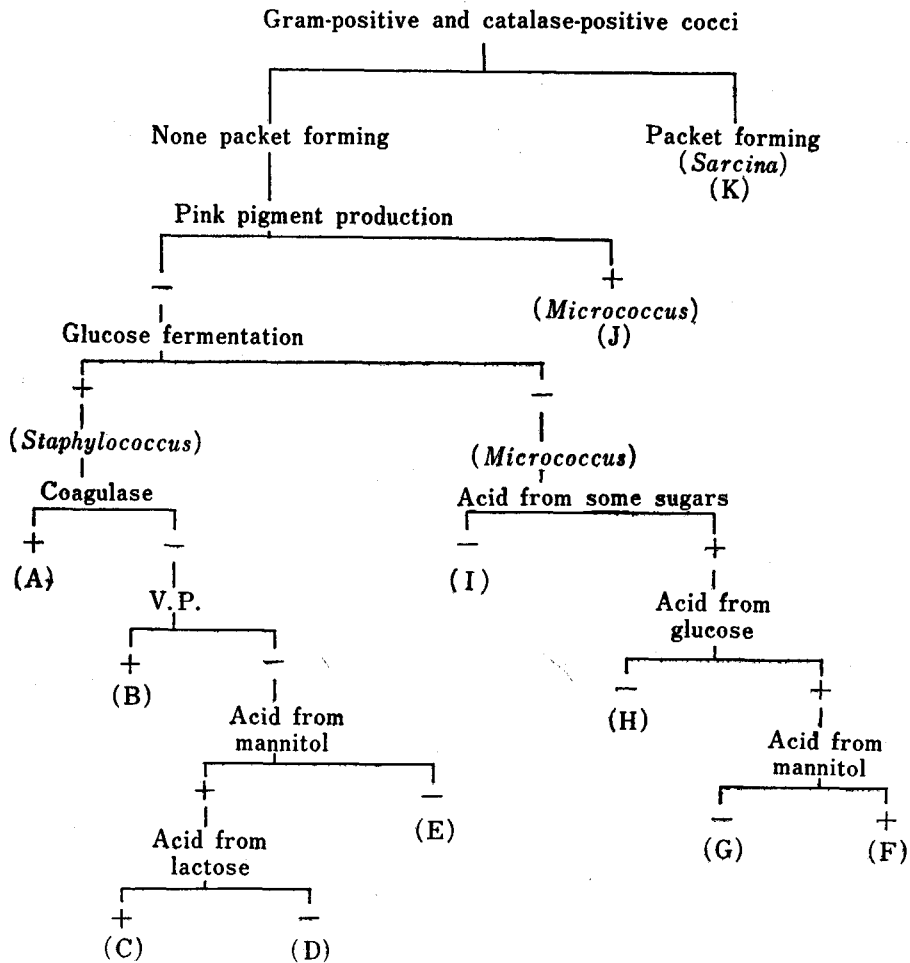
Fig. 4. Scheme for the separation of marine micrococci (by the authors⁶⁾)

Table 3. Relationships of the groups of numerical taxonomy to the previously reported subgroups for strains used in this study

		Subgroups previously reported ⁶⁾										
		A (0)	B (7)	C (16)	D (3)	E (3)	F (2)	G (8)	H (8)	I (17)	J (8)	K (8)
Groups of numerical taxonomy	I (19)		6	12	1							
	II (9)		1	4	2	2						
	III (7)					1	2	3				1
	IV (8)										8	
	V (13)							2		4		7
	VI (24)							3	8	13		

考 察

Sneath¹⁾ によって微生物の分類に応用された数値分類法は分類しようとする微生物のもつ種々の性状を可能な範囲で詳細に調べあげ、各性状の値を均等とみなして、数学的に相似性を算出したのち、その数値によって分類を試みようとする方法で、この方法の根底には遺伝的要因を量的にとらえ、微生物分類学に系統発生的思想を盛り込もうとする目的が存在している。なお数値分類法を実際に実施するにあたり、いまだいくつかの問題点が残されている⁸⁾。たとえば各性状の検査項目数の選び方も研究者により異なり、また検査項目数が形態、生物学あるいは生化学的性状などのいずれかに片寄ることも充分注意されなければならないが、本実験では多くの報告より妥当と考えられる各項目数を選んで実施した。次に Sneath¹⁾—(1)式—は大きな微生物群を分類する際、対比する菌株間で共に陰性の項目がある場合、これを相似の項目に取り入れず、S-value の算出に含めていない。これはある性状が共に陰性であるという事実には種々の要因が潜在することに起因する危険性を除去するためであるが、本実験のように対象とした供試菌がすべて family Micrococaceae に属するような比較的狭い範囲における微生物を分類する場合にはその危険性は非常に少ない。したがって本実験において、2つの式により得られた結果に大差は認められず (Fig. 1 および 2 参照)、一方 group 内での数値の変動も少く、group の形成がより明確に表わせる Silvestri⁷⁾ の式—(2)式—を採用する方が本実験のごとき場合は、より適切であることが推察された。

次に北太平洋海域の海水から分離した本実験供試菌80株は数値分類法により Fig. 1 および 2 に示すごとく 6 groups に分類されたが、先に報告した従来法による分類と対比し、group I および II は genus *Staphylococcus* に、group III~VI は genus *Micrococcus* に属するものであった。対照株として供試した *Staphylococcus aureus* (Mi 3) は group I に近縁であるが平均 S-value は 72% でそれほど高い値を示さず、Hill²⁾ その他^{4), 9), 10)} の報告にあるごとく *Staphylococcus aureus* として別に 1 つの group を形成するものと推察される。また対照株の *Sarcina lutea* (Mi. 7) は group III に近似したが、先の著者らの分類⁷⁾ で *Sarcina* subgroup K と分類された本実験供試菌 8 株中の 1 株のみが group III に含まれるにすぎず、他は group V に包含された (Table 3 参照)。またこれらの供試菌株の個々の相似性からも *Sarcina* を一つの属として *Micrococcus* から独立させる根拠は本実験結果からは認められなかった。なお Hill²⁾、Rosypal et al⁴⁾ および Hubálek⁵⁾ とも数値分類法を用いて同様の結果を得ている。

Hill²⁾ はグラム陽性球菌を *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, irregular branch 1, 2, intermediates および *Micrococcus roseus* と分類しているが、本実験の group 1 は *S. saprophyticus*, group II は irregular branch I, group III は intermediates, group IV は *M. roseus*, group V, VI は irregular branch 2 に相当する。Rosypal et al⁴⁾ は数値分類法と DNA 塩基組成比 (% GC) を組合せて genus *Micrococcus* を 8 subgroups に分けているが、本実験の group III が subgroup 2b, IV が subgroup 1b, V および VI が subgroup 1a に相当するものと推測されるが、その他の subgroup で一致するものは認められなかった。これらの結果および Shaw et al⁹⁾、Baiad-Parker¹⁰⁾、Kocur and Martinec¹¹⁾ らの報告と本実験結果を分類学的に検討してみると、group I は *S. epidermidis* または *S. saprophyticus* に類似する菌株群であり、group II は genus *Staphylococcus* と genus *Micrococcus* の中間的存在の *S. lactis* に類似し、group IV は *M. roseus*, group V および VI は *S. fermentans* または *M. luteus* に類似の菌株群であると考えられる。しかし group III に相当する菌群の種名は確立されておらず、また前記の種名も研究者によって異っており、種名として完全に認められるのは *S. aureus* および *M. roseus* のみである。

先の報告で考察した⁹⁾、著者らの分類法による B~K の 10 subgroups において subgroup D と E, F と G, H と I との各 subgroup 間の関係は明確にすることができず残された問題としておいたが、

数値分類法により得られた各 group は Table 3 に示すようにそれらの subgroup を一括した形で group が形成され、おおむね先の報告の妥当性が認められた。さらに本実験で得られた結果と DNA 塩基組成比(% GC)との関連性について検討を加える所存である。

要 約

海水から分離した球菌80株の数値分類法によって得られた結果は次のとおりである。

Sneath¹⁾ および Silvestri⁷⁾の両式によりそれぞれ S-value を求めて数値分類を行ったところ、両者とも供試菌株80株は I~VI の 6 groups に分類されて大差は認められなかったが、分類学的に小さな範囲内の微生物群を分類する場合は Silvestri の式に従った方がより妥当な分類が可能と思考された。

先に報告した従来法に準拠した著者らの分類法⁶⁾による分類結果と本実験の結果とを対比させた場合、本報の group I および II は genus *Staphylococcus* に、group III~VI は genus *Micrococcus* に属す点について矛盾は認められなかったが、genus *Sarcina* を独立した group と認める点については明確にしえなかった。また各 group についてみると、group I は先の報告の *Staphylococcus* subgroup B と C, group II は C, D および E, group III は *Micrococcus* subgroup F と G, group V は I と *Sarcina* subgroup K, group VI は H と I がそれぞれの group の主体をなす傾向がみられ、特に group IV は *Micrococcus* subgroup J と完全に一致した。

終りに本研究の遂行にあたり種々援助を頂いた木村喬久・信濃晴雄両氏に謝意を表する。

文 献

- 1) Sneath, P. H. A. (1957). *J. gen. Microbiol.*, **17**, 201.
- 2) Hill, L. R. (1959). *Ibid.*, **20**, 227.
- 3) Pohja, M. S. & Gyllenberg, H. G. (1962). *J. appl. Bact.*, **25**, 341.
- 4) Rosypal, S., Rosypalova, A. & Horejs, J. (1966). *J. gen. Microbiol.*, **44**, 281.
- 5) Hubálek, Z. (1969). *Ibid.*, **57**, 349.
- 6) 絵面良男・坂井 稔 (1966). 北大水産彙報, **17**, 47.
- 7) Silvestri, L. et al (1962). *Symp. Soc. gen. Microbiol.*, **12**, 333.
- 8) 坂崎利一 (1967). メディア・サークル, **12**, 385.
- 9) Shaw, C., Stitt, J. M. & Cowan, S. T. (1951). *J. gen. Microbiol.*, **5**, 1010.
- 10) Baird-Parker, A. C. (1965). *Ibid.*, **38**, 353.
- 11) Kocur, M. & Martinec, T. (1965). *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.*, **15**, 113.