

レプトスピラならびに関連スピロヘータの細胞壁と 多糖体画分の化学組成による Chemotaxonomy

三 瀧 一 二

Chemotaxonomy of *Leptospira* and Related Spirochetes by Chemical Compositions of Cell walls and Polysacchride Fractions

Ichiji MIFUCHI

ABSTRACT The spirochetes are composed of three main structures : the outer envelope, protoplasmic cylinder and axial fibrils (flagella). They are typical prokaryotes and are classified as bacteria since no nuclear membrane are present and muramic acid or peptidoglycan were present in the cell wall or cell wall-membrane complex of these organisms.

Outer envelope polysaccharide fractions extracted by ammonium hydroxide (NH₄OH-PS) were obtained from various representative members of genera of the family *Spirochaetaceae*. The sugar composition of NH₄OH-PS preparations was complex and many kinds of sugar such as rhamnose, fucose, ribose, xylose, mannose, galactose and glucose were detected in all spirochetes. Of particular interest was the presence of 4-O-methylmannose as a unique constituent of polysaccharide in members of the genus *Leptospira*. This sugar was not detected in the polysaccharide of *Spirochaeta*, *Borrelia* and *Treponema*.

The chemical compositions of cell wall fractions were also examined. 4-O-Methylmannose was detected in the cell wall polysaccharides of the genus *Leptospira* but not in the cell walls prepared from the other genus spirochetes. The diaminopimelic acid present in cell wall peptidoglycans of the genus *Leptospira* was *meso*-diaminopimelic acid (A₂pm). In contrast to the *Leptospira*, the peptidoglycans of *Spirochaeta*, *Borrelia* and *Treponema* contained ornithine (Orn) but not A₂pm.

Since 4-O-methylmannose and A₂pm were found in the cell wall fractions of genus *Leptospira* but not in *Spirochaeta*, *Borrelia* or *Treponema*, it was suggested that the chemical composition of the cell wall becomes an important criterion of chemotaxonomy of *Spirochaetales*.

1. はじめに

レプトスピラを含むスピロヘータは極めて繊細な細長いらせん状をした細菌で、活発な固有運動を行っている。スピロヘータの名称は Spiro-chete = coiled hair を意味し、その特有ならせん毛髪状形態に由来している。

スピロヘータは淡水、海水中に棲息し、また動物やヒトの口腔、消化管に常在するものがある。多くのスピロヘータはヒトに病原性を示さないが、ワイル氏病レプトスピラや秋疫レプトスピラ、梅毒トレポネーマや再帰熱ボレリアなどヒトの病原菌として極めて重要なものが含まれる。

スピロヘータのなかで、レプトスピラは他のスピロヘータと非常に異なり、好気性でかつ試験管内培養が比較的容易であるので、多くの研究が行なわれ、また予防ワクチンもほぼ完成の域に達している。これに対して、レプトスピラ以外のスピロヘータは、培養の困難なものが多く、また培養可能なものでも大量培養し多量の菌体を集めることには可成りの困難を伴う。

またスピロヘータは他の細菌にくらべ、細胞の微細構造が複雑であることから、スピロヘータの菌体成分の研究ことに細胞壁や構成多糖体の化学組成の研究は極めて立ち遅れている。

本総説は、培養可能な各種のスピロヘータの大量培養と集菌に努力し、スピロヘータの細胞壁ならびに構成多糖体の分画とその化学組成を比較検討したものである。この結果、スピロヘータの細胞壁と多糖体の化学組成の相異に基づいたスピロヘータの chemotaxonomy (化学的分類) に貢献したものである。

2. スピロヘータの分類

スピロヘータは、後に述べる細胞の微細構造から、原核生物 Prokaryote の細菌として分類され、Order (目) *Spirochaetales* は一つの Family (科) *Spirochaetaceae* のみで、この中に5つの Genus (属), *Spirochaeta*, *Crstispira*, *Treponema*, *Borrelia* と *Leptospira* からなっている(1)。

Order	Family	Genus
<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	I. <i>Spirochaeta</i>
		II. <i>Crstispira</i>
		III. <i>Treponema</i>
		IV. <i>Borrelia</i>
		V. <i>Leptospira</i>

Genus I. *Spirochaeta* (スピロヘータ属) はやや大きなスピロヘータで、 $5\sim 50\mu\text{m}\times 0.2\sim 0.75\mu\text{m}$ の大きさを持ち、淡水、海水、下水などで自由生活をしている。多くのものは偏性嫌気性であるが、*S. aurantia*, *S. halophila* は通性嫌気性で、アミノ酸・糖を利用し醗酵により増殖する。

Genus II. *Cristispira* (クリスチスピラ属) はその形態が crested coil 状である。 $30\sim 150\mu\text{m}\times 0.5\sim 3.0\mu\text{m}$ の大型のスピロヘータで、貝類などの軟体動物の消化管に寄生する。今日なお人工培養ができないので、その性質について不明な点が多い。

Genus III. *Treponema* (トレポネーマ属) は turn thred を意味し、大きさは $5\sim 15\mu\text{m}\times 0.09\sim 0.5\mu\text{m}$ で、規則正しい細かいらせんで柔軟性に乏しい。偏性嫌気性でアミノ酸と糖を利用し、醗酵により増殖する。動物やヒトの口腔、消化管に存在する。非病原性のトレポネーマには人工培養が可能なものがあるが、病原性の梅毒トレポネーマなどは、今日なお人工培養は困難である。

Genus IV. *Borrelia* (ボレリア属) 発見者の Borrel に由来する名称で、大きさは $3\sim 20\mu\text{m}\times 0.2\sim 0.5\mu\text{m}$ の不規則で粗大ならせん状を示す中型で柔軟性に富むスピロヘータである。1971年 Kelly (2) が再帰熱ボレリアの人工培地で培養にはじめて成功した。*B. hermsi* や *B. parkeri* が微好気状態で、糖を醗酵してよく増殖する。ボレリアはブドウ糖から乳酸のみを産生する。

Genus V. *Leptospira* (レプトスピラ属) Fine coil を意味し、 $6\sim 20\mu\text{m}\times 0.1\mu\text{m}$ の非常に繊細ならせん状を示す。他のスピロヘータと異なり好気性で、水中に自由生活をしているものと、動物やヒトに寄生し病原性を示すものがある。人工培地でよく増殖するが、他のスピロヘータと違って、アミノ酸や糖は利用できず、主として高級脂肪酸を用い呼吸により増殖する。*Leptospira* と他属スピロヘータとの相違を表 1, 2, 3 に示した(3)。

レプトスピラはワイル氏病病原体として、1915年稲田, 井戸によって発見され、*Spirochaeta icterohaemorrhagiae* と命名されたが、後に野口英世により *Leptospira* と改められた。

レプトスピラの分類は、現在、Genus *Leptospira* は3つの Species (種) に分類され、動物寄生性 “parasitic” 群として *L. interrogans* (疑問符 interrogation に形態が類似する) と非病原性で水中に自由生活する *L. biflexa* (菌体の両端のフックしている形態) と、近年新しく発見された *L. illini* である。

Table 1 Oxygen Requirements and Metabolism of the Spirochetes*

	Oxygen Requirements	Type of Metabolism
<i>Leptospira</i>	Aerobic	Respiratory
<i>Borrelia</i>	Microaerophilic	Fermentative
Host-Associated		
<i>Treponema</i>	Anaerobic	Fermentative
<i>Spirochaeta</i>	Facultatively anaerobic to anaerobic	Fermentative

Table 2 Carbon, Energy, and Nitrogen Source of the Spirochetes*

	Carbon and Energy Source	Nitrogen Source
<i>Leptospira</i>	Fatty acids	Ammonium salts Urea
<i>Borrelia</i>	Carbohydrates	Amino acids
Host-Associated	Carbohydrates	Amino acids or
<i>Treponema</i>	and/or amino acids	Ammonium salts
<i>Spirochaeta</i>	Carbohydrates and/or amino acids	Amino acids or Ammonium salts

Table 3 Amino Acid and Fatty Acid Requirements of the Spirochetes*

	Amino Acids	Fatty Acids
<i>Leptospira</i>	Not required	Required
<i>Borrelia</i>	Some required	Required
Host-Associated <i>Treponema</i>	Some required	Required
<i>Spirochaeta</i>	Some required	Not required

* R. C. Johnson, 1976.

Table 4

Genus	Species	Serogroup	Serovar
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i> <i>copenhageni</i>
		<i>canicola</i>	<i>canicola</i> <i>broomi</i> <i>galtoni</i> <i>etc.</i>
		<i>autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
		<i>australis</i>	<i>australis</i>
		· · ·	· · ·
<i>Leptospira</i>	<i>biflexa</i>	<i>biflexa</i>	<i>biflexa</i>
<i>Leptospria</i>	<i>illini</i>	<i>illini</i>	<i>illini</i>

さらに“parasitic”群の *L. interrogans* や *L. biflexa* 群は、血清学的性状から serogroup 血清群に分けられ、これをさらに serovar (type) 血清型に細分される。Serovar は 160 以上に及び、その分類は極めて複雑である(表4)。

3. スピロヘータの微細構造

スピロヘータは極めて細長いらせん状で、一般の細菌にくらべると、やや複雑な構造である。図1、及び図2に模型図を示した。

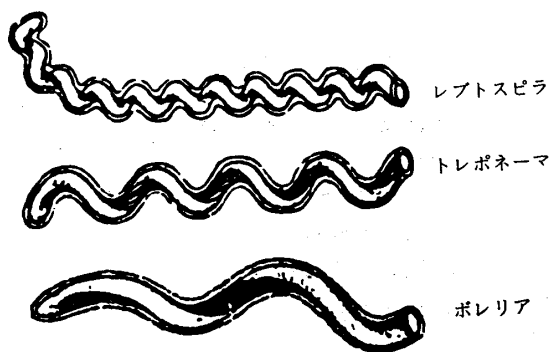


Fig. 1 スピロヘータの形態部分模型図

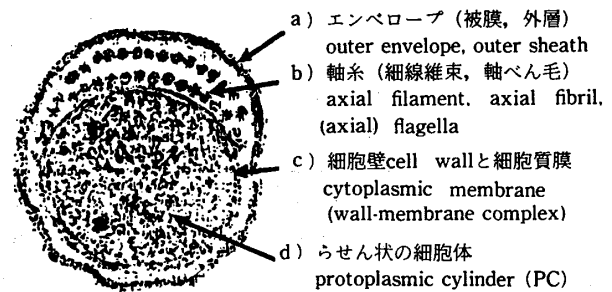


Fig. 2 スピロヘータの微細構造

スピロヘータ細胞は3つの主要素で構成される。1) は最外側に存在し細胞体ならびに軸糸を覆う被膜 (outer envelope, OE または outer sheath) である。2) は OE に覆われたらせん状の細胞体 (protoplasmic cylinder, PC) で、その表面には細胞壁 cell wall と細胞質膜 cytoplasmic membrane からなる wall-membrane complex が存在する。3) は運動を司ると考えられている軸糸 (axial filament, axial fibril, axial flagella, AF) である。AF は細胞体の両端部から発生し、細胞体 PC の表面に存在し、被膜 OE によって覆われている。軸糸 AF の数はスピロヘータの属によって異なり、*Loptospira* では両端から各1本で、*Treponema* では1~8本、*Borrelia* では15~20本である。*Spirochaeta* 属は両端から各1本であるが、大型スピロヘータの *Cristispira* では約100本の軸糸がある。軸糸 AF は細菌の鞭毛と化学組成が類似している(4)。

スピロヘータの細胞体 PC にある核には核膜が認められず、小器官ミトコンドリアの存在も認められない(5,6)。細胞体 PC には細胞壁構成成分のペプチドグリカンやリポ多糖体の存在が認められる(3,7,8,9,10,11,12,13)。このようなスピロヘータの構造の特性から、スピロヘータは原核生物の細菌として分類されている。

被膜 OE には多くの抗原物質の存在が予想され、Johnson らは OE の分離精製と、その免疫学的性状を検討し、レプトスピラ感染防御抗原の存在を示唆していることは興味深い(14, 15, 16)。

4. スピロヘータの菌株と培養

使用した *Leptospira* 属, *Treponema* 属, *Borrelia* 属, *Spirochaeta* 属の菌株は表5に一括して示した。

Table 5 Organismus Used

<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>copenhageni</i> strain Shibaura
serovar <i>canicola</i> strain HU IV
serovar <i>canicola</i> strain Moulton
<i>Leptospira biflexa</i> strain Urawa
<i>Leptospira illini</i> strain 3055
<i>Treponema phagedenis</i> biotype Reiter
<i>Borrelia hermsii</i>
<i>Spirochaeta stenostrepta</i> strain Z1
<i>aurantia</i> strain J1
<i>aurantia</i> strain J4T

Leptospira interrogans serovar *copenhageni* 芝浦株, serovar *canicola* HUIV 株は Shenberg 培地(17), *L. interrogans* serovar *canicola* Moulton 株, *L. biflexa* 浦和株および *L. illini* 3055株は Baseman-Cox 血清無添加培地(18)を用い30℃ 7日間培養した。

Treponema phagedenis biotype Reiter 株は川田のチオグリコール酸培地(19)で37℃ 7日間嫌気培養した。

Borrelia hermsii は Kelly 培地(2)で35℃ 1~2週間培養した。

Spirochaeta stenostrepta Z1株, *S. aurantia* J1 および J4T 株は Livermore-Johnson 培地で嫌気培養した(20)。

スピロヘータは培養後、遠心集菌、洗滌したのち、菌体は凍結乾燥して保存した。なおスピロヘータ科の中の *Cristispira* 属は培養が不可能なので調べられなかった。

5. スピロヘータの構成多糖体画分および細胞壁画分

スピロヘータのような複雑な細胞の微細構築物質を研究する方法としては、細胞を化学的あるいは酵素的に処理して、細胞構造体を外属より順次剥ぎとり、あるいは解体して行く方法が

有効である。種々の方法が検討されたが、アルカリ処理法、なかんづく水酸化アンモニウム処理は、被膜 OE を剝離し、intact に細胞体 PC を分離しうることを認めたので、この方法によって、水酸化アンモニウム抽出多糖体画分と細胞壁画分を調製した。

多糖体画分の抽出法は図 3 に示した(21)。

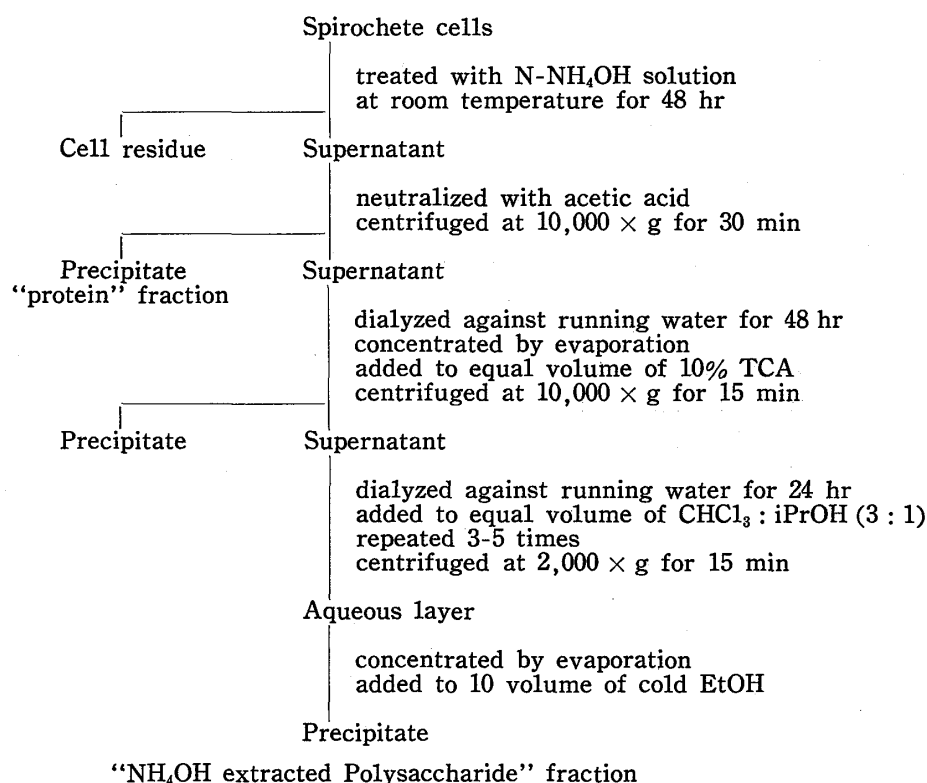


Fig. 3 Preparation of "NH₄OH extracted Polysaccharide" fraction from Spirochetes

スピロヘータ細胞を N-NH₄OH で室温48時間処理し、その抽出液を中和、TCA 沈殿さらに脱脂を行ない、残った水層を濃縮、冷エタノール沈殿で多糖体画分 (NH₄OH-PS) を分離した。

スピロヘータ細胞壁画分の調製は図 4 に示したように、N-NH₄OH 溶液でスピロヘータ細胞を処理すると、OE は可溶化除去され細胞体 PC が残る。次に残渣細胞体を Sorvall cell fractionator または超音波処理で破碎し、これを DNase ならびに RNase で処理し、粗細胞壁を沈殿として分別する。続いてトリプシン、キモトリプシン、プロナーゼ処理ならびに脱脂処理を行ない細胞壁 (cell wall) 画分を調製した(7)。

このようにして分離調製した NH₄OH-PS, cell wall 画分について、糖組成は Sawardeker らの方法(22)に準じ、柳本 GC-80 を用いてガスクロマトグラフィーで分析した (7,21,23)。Hexosamine 含量は Blix の方法(24)で測定した。cell wall 画分のアミノ酸ならびにアミ

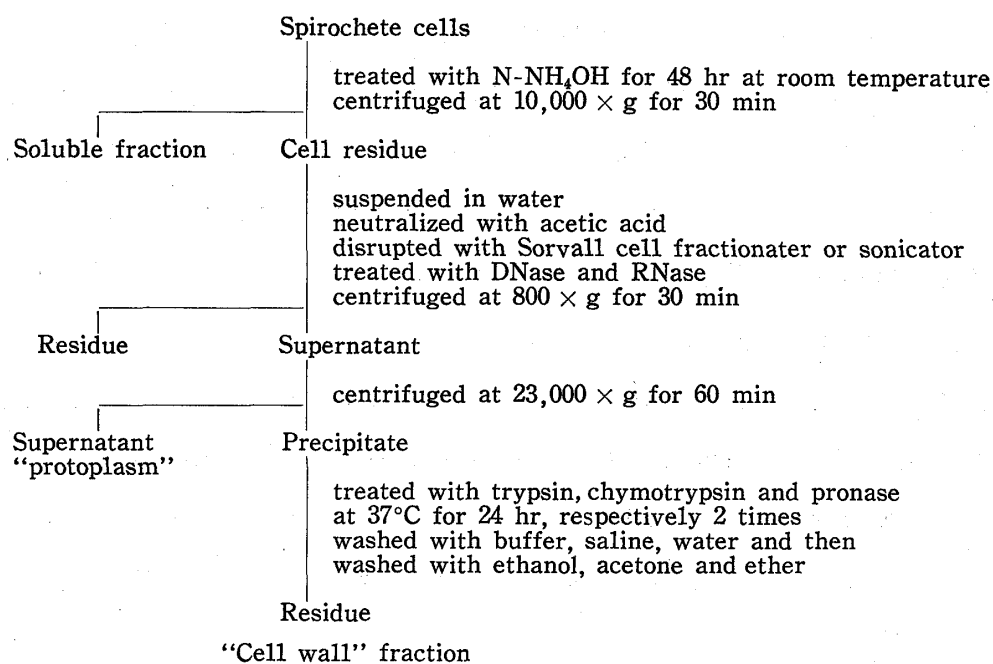


Fig. 4 Preparation of "cell wall" fraction from Spirochetes

ノ糖は、105°C 12時間 4N-HCl で加水分解後、アミノ酸分析器日立 KLA-3B または Beckman 120-B を用い分析した。

6. 水酸化アンモニウム抽出多糖体 (NH₄OH-PS) の糖組成

Leptospira 属, *Spirochaeta* 属, *Borrelia* 属 と *Treponema* 属の主として OE に由

Table 6 Neutral sugar composition of polysaccharides, NH₄OH-PS, of the genera *Leptospira*, *Spirochaeta*, *Borrelia*, and *Treponema*^{a)}

Sugars	<i>Leptospira biflexa</i> Urawa	<i>Leptospira interrogans canicola</i> HUIV	<i>Leptospira interrogans copenhageni</i> Shibaura	<i>Spirochaeta stenostrepta</i> Z 1	<i>Spirochaeta aurantia</i> J 1	<i>Spirochaeta aurantia</i> J4T	<i>Borrelia hermsii</i>	<i>Treponema phagedenis</i> btp. Reiter
Rhamnose	0.75	1.45	2.90	0.73	1.07	1.28	1.84	0.56
Fucose	0.27	0.23	0.09	0.26	0.38	0.82	1.93	0.19
Ribose	0.07	d ^{b)}	2.11	0.23	0.50	0.37	3.87	2.29
Arabinose	0.74	1.61	2.41	d	— ^{c)}	—	d	0.18
Xylose	0.40	4.12	1.24	0.33	0.36	0.62	0.79	0.20
4-O-Methylmannose	0.10	0.21	0.11	—	—	—	—	—
Mannose	2.30	1.16	2.57	0.61	0.43	1.13	0.46	0.47
Galactose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucose	0.70	d	0.21	0.58	0.67	1.61	1.40	0.42

^{a)} Expressed as relative molar ratios to galactose.

^{b)} Detected but <0.03.

^{c)} Not detected.

来する水酸化アンモニウム抽出多糖体の糖組成を表6に示した(25)。すべてのスピロヘータの抽出多糖体画分には多種類の糖の存在が認められるが、特にメチル化糖の 4-O-methylmannose が *Leptospira* 属にのみ特異的に存在することは興味深い。こまかく見ると rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose が, *Spirochaeta aurantia* の2株以外のすべてのスピロヘータに認められる。*Leptospira* 属と比較すると, *Spirochaeta*, *Borrelia*, *Treponema* では arabinose の含量が極めて少いか、または検出されない。*Leptospira* と他のスピロヘータとの間には, mannose と glucose の含量比に違いが認められ, *Leptospra* では mannose が多い。さらに *Leptospira* の中で, 非病原性の *L. biflexa* と “parasitic” な病原性の *L. interrogans* serovar *canicola* や *copenhageni* とくらべると, 後者の方が glucose 含量が著しく少ない。糖組成比はそれぞれのスピロヘータ間で複雑である。

7. 細胞壁画分の化学組成

スピロヘータの細胞壁画分の収量は, 他の細菌にくらべ極めて少ない。一般に細菌の細胞壁の収量は20% (乾燥重量) であるが, スピロヘータでは4~5%に過ぎない。これはスピロヘータの活発な運動性と柔軟な細胞壁との関係を示すものと考えられ, ペプチドグリカン層が薄い為と考えられる(9,26)。

(1) 細胞壁画分の糖組成

Table 7 Neutral sugar composition of cell wall fractions of the genera *Leptospira*, *Spirochaeta*, *Borrelia*, and *Treponema*^{a)}

Sugars	Cell walls of :									
	<i>Leptospira biflexa</i> Urawa	<i>Leptospira interrogans copenhageni</i> Shibaura	<i>Leptospira illini</i> 3055	<i>Spirochaeta stenostrepta</i> Z1	<i>Spirochaeta aurantia</i> J1	<i>Spirochaeta aurantia</i> J4T	<i>Borrelia hermsii</i>	<i>Treponema phagedenis</i> btp. Reiter		
Rhamnose	0.66	0.50	1.80	1.24	0.15	0.51	2.59	1.74	0.34	0.44
Fucose	0.39	0.11	0.29	0.25	d ^{b)}	0.13	2.17	0.70	— ^{c)}	—
Ribose	—	—	0.60	d	—	d	d	5.74	—	—
Arabinose	1.19	1.05	1.47	6.23	—	—	—	d	0.91	0.57
Xylose	0.34	0.89	1.83	1.05	d	0.58	0.19	0.42	0.74	0.19
4-O-Methylmannose	0.23	0.34	0.10	0.54	—	—	—	—	—	—
Mannose	0.92	0.51	1.58	1.65	0.16	0.16	2.26	d	0.12	0.16
Galactose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucose	0.30	0.22	1.23	0.38	0.22	2.44	2.13	0.98	1.27	0.74

^{a)} Expressed as relative molar ration to galactose.

^{b)} Detected but <0.03.

^{c)} Not detected.

細胞壁画分に含まれる多糖体の糖組成は表7に示した。(25)

Leptospira では rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose と、特に 4-O-methylmannose の存在が認められる。*L. illini* において arabinose の含量がとくに高いのが特徴的である。Arabinose は他のスピロヘータ属では認められないか、または少ない。

個々について見ると、*S. stenostrepta* では rhamnose, fucose, arabinose, ribose が少ない。また galactose と glucose の含量比が、*S. aurantia* とくらべ極めて小さい。*Borrelia hermsii* では ribose が多く、*Treponema* では fucose, ribose が認められないなどスピロヘータの属により糖組成の可成りの相異が認められる。

とくに 4-O-methylmannose が *Leptospira* 属のみに認められることは、4-O-methylmannose の生産的な意義、ならびに chemotaxonomy の面からも極めて重要な所見と考えられる。

図5に *L. illini* 3055 株の細胞壁多糖体の糖組成を示すガスクロマトグラムを示した(27)。

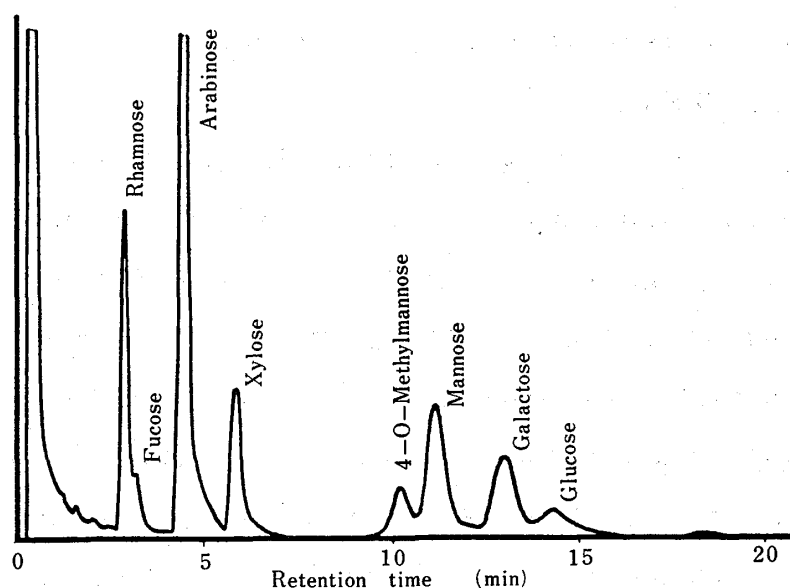


Fig. 5 Gas chromatograms of alditol acetate derivative prepared from acid hydrolysate of cell wall polysaccharide of *Leptospira illini* strain 3055.

GC pattern にみられる O-methylmannose が、4-O-methyl 体であることの証明は、図6に示すように、 NaBH_4 を用いて還元した場合と、 NaBD_4 (Duteriated sodium borohydride) で還元した場合の GC-Mass スペクトル法 (Gas chromatography-mass spectrometry) で解析し決定した(27)。

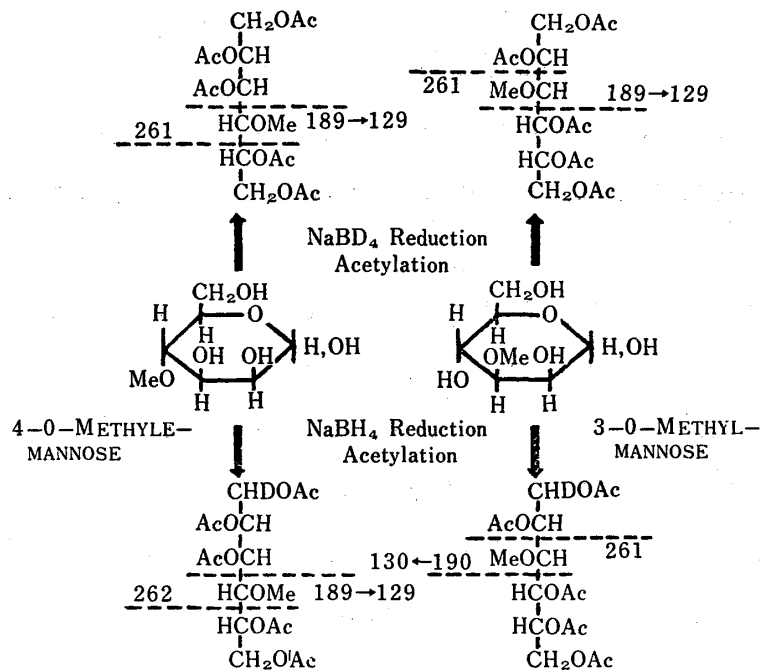


Fig. 6 Alditol acetates of 3-, and 4-O-methylmannose reduced by NaBH₄ and NaBD₄, respectively, and *m/z* values of their fragment ions expected in mass spectrometry.

図7は *L. ithni* 3055 株と *L. biflexa* 浦和株の多糖体を NaBH₄ または NaBD₄ で還元後、アセチル化した後の Mass spectra の実例を示した(27)。

(2) 細胞壁画分のペプチドグリカン

1963 Ginger (8) がスピロヘータ細胞に muramic acid のあることを初めて認め、つづいて Yanagawa & Faine (13), Pillot (28) が muramic acid と glucosamine 含量を測定し、スピロヘータにも他の細菌と同様に細胞壁ペプチドグリカンの存在することを証明した。

Tinelli & Pillot (12) や Joseph ら (9) は嫌気性スピロヘータの *Reiter treponema*, *Spirochaeta stenostrepta* から細胞壁画分を分離し、これらスピロヘータのペプチドグリカンの塩基性アミノ酸は ornithine (Orn) であることを示した。梅本ら (26) も *Treponema pallidum* Kazan 株について、そのペプチドグリカンは Orn 型で、*Borrelia hermsii* については Klariter & Johnson (29) が、これも Orn 型であることを報告した。

これらの報告から Schleifer & Kandler (30) はスピロヘータ目 *Spirochaetales* の細胞壁のペプチドグリカンは L-Orn 型のものであると分類している。

本研究では、*Leptospira* ならびに他属のスピロヘータの細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成を比較検討した。表 8 (25)。

目立って明らかなことは、*Leptospira* の細胞壁ペプチドグリカンは、alanine, glutamic acid, meso-diaminopimelic acid (A₂pm), glycine, glucosamine, muramic acid が約

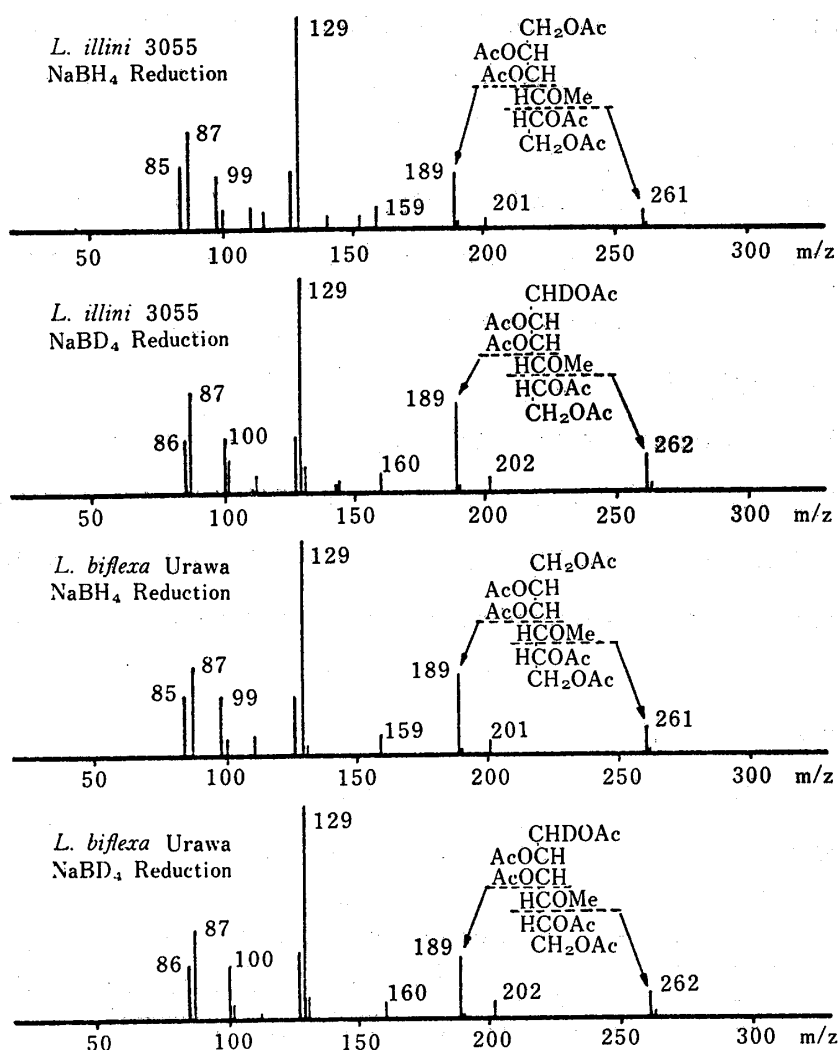


Fig. 7 Mass spectra of mono-*O*-methylmannitol acetates of *Leptospira illini* strain 3055 and *Leptospira biflexa* strain Urawa. Each leptospiral polysaccharide fraction was acetylated after reduction by NaBH₄ or NaBD₄. Mass spectrometry of the peak referring to mono-*O*-methylmannose in gas chromatography was carried out on a Nihondenshi JMS-01SC apparatus at an ion chamber temperature of 275 C.

Table 8 Relative molar ratios of major constituents of cell wall peptidoglycans of the genera *Leptospira*, *Spirochaeta*, *Borrelia*, and *Treponema*^{a)}

Amino acids and amino sugars	Cell walls of :									
	<i>Leptospira biflexa</i> Urawa		<i>Leptospira interrogans canicola</i> Moulton	<i>Leptospira illini</i> 3055		<i>Spirochaeta stenostrepta</i> Z 1		<i>Borrelia hermsii</i>	<i>Treponema phagedenis</i> btp. Reiter	
Alanine	2.00	2.61	0.71	2.02	2.43	1.84	2.06	2.87	1.85	2.87
Glutamic acid	1.29	1.40	0.60	1.73	1.89	1.02	1.36	1.83	1.98	2.16
meso-Diamino-pimelic acid	0.61	1.02	0.62	0.77	0.52	— ^{b)}	—	—	—	—
Ornithine	—	—	d ^{c)}	—	—	1.16	1.17	1.29	0.77	1.10
Glycine	0.74	0.44	0.60	0.99	1.70	0.67	0.60	2.21	1.36	1.77
Muramic acid	0.91	1.10	0.42	1.56	1.00	0.95	0.80	0.52	1.00	0.98
Glucosamine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

^{a)} Expressed as relative molar ratios to glucosamine; values were not corrected for destruction during hydrolysis.

^{b)} Not detected.

^{c)} Detected but <0.04.

2:1:1:1:1:1 であって, ornithine (Orn) は認められないことである。 *L. interrogans* serovar *canicola* Moulton 株で, Orn を検出しているが Orn 含量は A₂pm の 6.6% 以下であり極めて微量である。

これらの分析結果から, *Leptospira* 属の細胞壁ペプチドグリカンの塩基性アミノ酸は mesoA₂pm であって, これは極めて特異的なことである。これに対し, 他のスピロヘータ属 *Spirochaeta*, *Borrelia*, *Treponema* のペプチドグリカンの塩基性アミノ酸は *Leptospira* とは違って Orn で構成されている。

これらの知見は, *Leptospira* 属において先に確認した 4-O-methylmannose の特異的な存在に加えて, 細胞壁ペプチドグリカンのクロスリンクに関与する塩基性アミノ酸が *Leptospira* 属では meso-A₂pm であることは, スピロヘータ科における *Leptospira* 属の分類学的位置づけに重要な chemotaxonomical criterion (化学分類上の指標) を提供している。

8. スピロヘータの新しい分類

各種スピロヘータ属の G+C 含量 (モル%), 生物学的な性状の違いや, 本総説に述べたスピロヘータ細胞壁の構成成分の相違を表 9 のようにまとめた(31)。

Table 9 Characteristics of spirochetes.

	G+C (mol%) ^a	Oxygen ^a requirements	Major energy ^a and carbon source	Cell-wall ^b diamino amino acid	O-Methyl mannose ^c in cell-wall polysaccharide
<i>Spirochaeta</i>	50-66	Facultative anaerobes to anaerobic	Carbohydrates	Ornithine	-
<i>Treponema</i> nonpathogenic	37-46	Anaerobic	Carbohydrates or amino acids	Ornithine	-
<i>Borrelia</i>	ND ^d	Anaerobic or microaerophilic	Carbohydrates	Ornithine	-
<i>Leptospira</i>	36-39	Aerobic	Fatty acids	Diamino- pimelic acid	+

^a Buchanan and Gibbons, 1974.

^b Azuma et al., 1975; Joseph, Holt, and Canale-Parola, 1973; Klaviter, 1975.

^c Azuma et al., 1976.

^d ND = not determined.

Spirochaeta, *Treponema*, *Borrelia* などの多くのスピロヘータは嫌気性または通性嫌気性であるが, *Leptospira* のみは好気性である。エネルギー源と栄養炭素源をみると, 多くのスピロヘータは炭水化物またはアミノ酸を利用するが, *Leptospira* のみは脂肪酸を利用する。

細胞壁ペプチドグリカン構成の塩基性アミノ酸が, 本総説に示したように, *Leptospira* で

はdiaminopimelic acid で、他のスピロヘータでは ornithine であり、さらに *Leptospira* の細胞壁多糖体には O-methylmannose の存在が認められる。

このように、*Leptospira* はスピロヘータ目の中であって、他のスピロヘータとその性状が著しく異っている。とくに *Leptospira* 細胞壁ペプチドグリカンが他のスピロヘータと違って meso-A₂pm 型であることと、*Leptospira* 多糖体にもみ 4-O-methylmannose が存在する決定的な chemotaxonomical criterion によって、1984出版の新しい Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 からは、Order *Spirochaetales* (スピロヘータ目) の Family *Spirochaetaceae* (スピロヘータ科) の1つの Genus (属) であった *Leptospira* が格上げされ、独立した Family *Leptospiraceae* (レプトスピラ科) として取り扱われるにいたった(32)。

The Spirochetes

Order I. *Spirochaetales*

Family I. *Spirochaetaceae*

Genus I. *Spirochaeta*

Genus II. *Cristispira*

Genus III. *Treponema*

Genus IV. *Borrelia*

Family II. *Leptospiraceae*

Genus I. *Leptospira*

9. おわりに

本総説の内容は、日本・中国国際微生物会議、上海シンポジウム1984の*Leptospira* に関する Special Lecture として発表したものである。

この研究は、十数年にわたって行われて来たものであって、静岡薬科大学 柳原保武教授、北海道大学・免疫化学研究所 東 市郎教授との協同研究であり、また米国ミネソタ大学医学部 Russel C. Johnson 教授との密接なる協力研究によるものであることを明記したい。

文 献

- 1) Smibert, R. M., Canale-Parola, E., Kuhn, D. A., Felsenfeld, O., Turner, L. H.: In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. Edited by

- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., pp. 167–193, Williams and Wilkins Co. (1974).
- 2) Kelly, R. T., *Science*, **173**, 443–444 (1971).
 - 3) Johnson, R. C., In *The Biology of Parasitic Spirochetes*, Edited by Johnson, R. C., pp. 39–48, Academic Press Inc. (1976)
 - 4) Bharier, M. A., Rittenberg, S. C., *J. Bacteriol.*, **105**, 422–429 (1971).
 - 5) Hovind-Hougen, K., *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*, Suppl. No. 255, 1–41 (1976).
 - 6) Johnson, R. C., *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 89–106 (1977).
 - 7) Azuma, I., Taniyama, T., Yamamura, Y., Yanagihara, Y., Hattori, Y., Yasuda, S., Mifuchi, I., *Jap. J. Microbiol.*, **19**, 45–51 (1975).
 - 8) Ginger, C. D., *Nature*, **199**, 159 (1963).
 - 9) Joseph, R., Holt, S. C., Canale-Parola, E., *J. Bacteriol.*, **115**, 426–435 (1973).
 - 10) Shinagawa, M., Yanagawa, R., *Infect. Immun.*, **5**, 12–19 (1972).
 - 11) Taniyama, T., Azuma, I., Yamamura, Y., Yanagihara, Y., Mifuchi, I., *Med. Biol.*, **85**, 139–141 (1972).
 - 12) Tinelli, R., Pillot, J., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris D.* **263**, 739–741 (1966).
 - 13) Yanagawa, R., Faine, S., *Nature*, **211**, 823–826 (1966).
 - 14) Auran, N. E., Johnson, R. C., Ritzi, D. M., *Infect. Immun.*, **5**, 968–975 (1972).
 - 15) Bey, R. F., Auran, N. E., Johnson, R. C., *Infect. Immun.*, **10**, 1051–1056 (1974).
 - 16) Johnson, R. C., Wachter, M. S., Ritzi, D. M., *Infect. Immun.*, **7**, 249–258 (1973).
 - 17) Shengerg, E., *J. Bacteriol.*, **93**, 1598–1606 (1967).
 - 18) Baseman, J. B., Cox, C. D., *J. Bacteriol.*, **97**, 992–1000 (1969).
 - 19) Kawata, T., *Jap. J. Bacteriol.*, **11**, 547–560 (1957).
 - 20) Livermore, B. P., Johnson, R. C., *J. Bacteriol.*, **120**, 1268–1273 (1974).
 - 21) Taniyama, T., Yanagihara, Y., Mifuchi, I., Azuma, I., Yamamura, Y., *Infect. Immun.*, **6**, 414–415 (1972).
 - 22) Sawardeker, J. S., Sloneker, J. H., Jeans, A., *Anal. Chem.*, **37**, 1602–1604 (1965).
 - 23) Azuma, I., Takeda, K., Yamamura, Y., Yanagihara, Y., Mifuchi, I., *J. Bacteriol.*, **128**, 492–494 (1976).
 - 24) Blix, G., *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467–473 (1948).
 - 25) Yanagihara, Y., Kamisango, K., Yasuda, S., Kobayashi, S., Mifuchi, I., Azuma, I., Yamamura, Y., Johnson, R. C., *Microbiol. Immununol.*, **28**, 535–544 (1984).
 - 26) Umemoto, T., Ota, T., Sagawa, H., Kato, K., Takada, H., Tsujimoto, M., Kawasaki, A., Ogawa, T., Harada, K., Kotani, S., *Infect. Immun.*, **31**, 767–774 (1981).
 - 27) Yanagihara, Y., Kamisango, K., Takeda, K., Mifuchi, I., Azuma, I., *Microbiol.*

- Immunol., 27, 711–715 (1983).
- 28) Pillot, J., These. Doct. Sci. Nat. Paris, N d'ordre, 5418 (1965).
 - 29) Klaviter, E. C., Johnson, R. C., Acta Tropica, 36, 123–131 (1979).
 - 30) Schleifer, K. H., Kandler, O., Bacteriol. Rev., 36, 407–477 (1972).
 - 31) Johnson, R. C. : In The Prokaryotes, Vol. I. Edited by Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G., pp. 533–537 (1981).
 - 32) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Edited by Krieg, N. R., Holt, J. G., pp. 38–62, Williams & Wilkins (1984).