

総説

分子系統解析に基づいた細菌の分類と同定

大楠 清文, 江崎 孝行

岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野：岐阜県岐阜市柳戸 1-1 (〒501-1194)

Key Words 細菌, 分類, 同定, 国際細菌命名規約, 分子系統解析

はじめに

地球が誕生したのが約 45 億年前とされており、最古の細菌は約 35 億年前に現れたことが確認されている。よって、細菌は地球誕生から約 10 億年かけて、自己複製能力を身につけた生命体として進化を遂げたことになる。一万メートルの海底から成層圏の彼方まで広く分布する細菌は、色々な環境に適応しながら人間社会のあらゆる場面において、良きにつけ、悪しきにつけ、多大な影響を与え続けている。「細菌」(microbe)という語は、1879 年に外科医セディヨーが医学アカデミー会員として「パスツール氏の研究が外科学の進歩に与えた影響について」と題した講演のなかで初めて用いられた。この 19 世紀末から 20 世紀初めは、細菌学の創始者パスツールとコッホの研究と貢献に引き続いて、病原細菌発見の黄金時代と呼ばれている。すなわち、炭疽(1876 年)、腸チフス(1880 年)、結核(1882 年)、コレラ(1883 年)、ジフテリアおよび破傷風(1884 年)、ペスト(1894 年)、梅毒(1905 年)といった感染症の原因菌が短期間のうちに次々と発見された。こうして特定の病気は特定の細菌に起因することが実験的に証明されたのである。この頃の細菌の記載方法は、病原細菌を一般の細菌と区別するために、形態と生化学性状を中心としたものであった。その後、多数の性状をコンピュータ化した数値分類、細菌の細胞構成成分を指標とした化学分類、さらに遺伝子増幅法や自動塩基配列決定技術の急速な進歩の影響を受けながら、ゲノム細菌学ともよぶべき時代を迎えている。

本稿では、これら細菌の分類体系の変遷と最近の動向を概説しながら、分類で頻繁に用いられる微生物学用語の解説や菌名の正しい表現方法、新種の提唱方法、インターネットや文献を利用した正式な菌名の検索、さらには病原細菌分類の問題点などについて紹介したい。

分類そして同定とは

分類学 taxonomy の語源はギリシャ語の taxis= 整理 arrangement と nimina= 配列 distribution に由来するとされている。分類学には歴史的に様々な見解があるが、Migula は「分類学者の仕事は混沌の中に秩序を見出すことである」、あるいは Simon は、「分類およびその基礎、原理、手順、規則を含む分類の理論的研究」さらに「分類学の対象は分類であり、分類の対象は生物である」としている。著名な分類学者である Cowan 博士は、分類学を次の 3 つの概念に分けた。すなわち、① 分類 classification：類似性に基づいてグループの中に細菌を秩序正しく配列すること、② 命名 nomenclature：①によって定義されたグループの単位に名前を付けること、そして③ 同定 identification：未知の細菌が①および②によって定義・命名されたグループのどれに属するかを決定するプロセスである。そして、この三位一体の総合が分類学であるとした。したがって、日常検査における「細菌の同定」は、未知の分離菌株が既に記載されたどの菌種にもっとも近いかを決定する作業である。いわば同定とは、分類と命名の実践的な応用なのであ

る。同定を行う場合、未知の分離菌株の性状を調べて、その特徴を類似した菌種の記載と比較する。同定ではその菌種をお互いに効率よく識別するために重みづけされた形質（性状）を用いる一方で、分類では形質（性状）に重みづけしないことが望ましい。この点で同定は分類とは大きく異なるのである。しばしば分類と同定が混同されているので注意が必要である。

細菌の分類体系

細菌は約 7,000 種類が記載されており、DNA の GC%（グアニンとチミンの割合）が 25～80% まで分布する、幅広い生物集団である。細菌の分類は、国際細菌命名規約（International Code of Nomenclature of Bacteria ; ICNB）により規定されている。細菌を分類する最も基本的な単位は株 strain である。しかし、分類学上の最小単位は、株ではなく菌種 species である。実際、国際細菌命名規約では、種（とくに亜種 subspecies）以上の細菌を取り扱い、種を細分する血清型 serovar、ファージ型 phagovar、病原型 pathovar、生物型 biovar は規約の対象外である。

菌種名は二命名法 binomial nomenclature によりラテン語で記載される。本命名法では、最初の名は属名 genus で、最初の文字は大文字で示される。第 2 の名は、種形容語 specific epithet と呼ばれている。属名と種形容語を一緒にすることにより 1 つの種名を表している。したがって、種形容語の部分のみを指して種名というのは誤りなので注意が必要である。

細菌は下位から種 species < 属 genus < 科 family < 目 order < 綱 class < 門 phylum < ドメイン（座）domain と上位に向かって分類される。分類の基本原理として、より上位のグループは下位のグループに比べて小数の特徴しか共有しない。各階層の定義はすべてにおいて定められているわけではない。種の定義に関しては、「全染色体 DNA の定量的な DNA/DNA ハイブリッド形成が最適条件下で 70% 以上あり、かつハイブリッドの熱安定度が 5℃ 以内におさまる菌株の集まり」としている¹⁾。DNA/DNA ハイブリッドの詳細な実験法に関しては成書を参照していただきたい²⁾。

16S rRNA 配列による系統分類と細菌の同定

現在の分類学的なアプローチでは上述の DNA/DNA ハイブリッド試験に基づいて菌株をグルーピングした後、これに対応するようなキーとなる表現性状を探して、それが菌種の識別指標になって同定を行うことになる。では、分類と同定を行うにあたって細菌全体に共通の汎用性の高い指標は存在しないのか。

細菌のもつ情報はすべて遺伝子として保存されている。したがって、各細菌の塩基配列を直接比較することが可能であれば、種どうしあるいは菌株の違いを明らかにできる。ところが、最初のゲノムプロジェクトで解読されたインフルエンザ菌のゲノムは比較的小さい（1,800 kb）とはいえ、このゲノムの全塩基配列（ATCG）を A4 サイズの紙に印刷すれば、約 2,000 ページ以上にはなるであろう。単に塩基配列を比較することすら容易ではない。

そこで分類学者がターゲットにした遺伝子はリボソーム RNA（rRNA）であった。3 種類の rRNA のうち、特にサイズが手頃な 16S rRNA が解析の対象とされた（図 1）。細菌の 16S rRNA は約 1,500 塩基対（bp）で、高等生物のそれは 1,800 bp ほどであるが、その二次構造はよく類似している。16S rRNA は DNA のサイズが異なる細菌および高等生物細胞に共通に存在する遺伝子であり、生物全体の進化距離を比較するのに適している。さらに、この遺伝子は進化速度が比較的鈍く、系統のかけ離れた細菌間での比較も容易にできる。つまり、16S rRNA のシーケンスを決定して系統解析を行えば、未知の菌株がどの属に所属しているか、あるいはどの菌種と類縁関係にあるかを推定できるようになった。この背景には、① RNA/DNA ハイブリッド形成実験から RNA が高位の分類階級の比較に有用であることが早くから認知されていたこと、② 16S rRNA の両端、あるいは少なくとも 10 ヶ所に属レベルを超えて共通な塩基配列の保存領域が存在しており（図 1）、これらをターゲットとした PCR プライマーの設計が容易であったこと、③ 高速な自動 DNA シーケンサーの普及によって 16S rRNA の塩基配列を簡便に決定できるようになり、データの蓄積が加速されたことなどが挙げられる。事実、現在記載されている約 7,000 種（亜種を含む）のほぼすべての 16S rRNA 塩基配列が登録されている³⁾（図 2）。

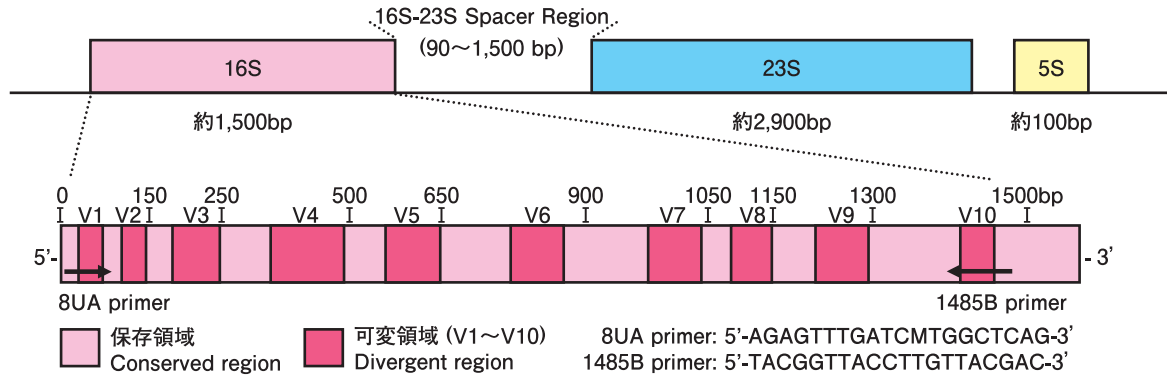


図1. 細菌のリボソーム RNA (rRNA) の構成と 16S rRNA 遺伝子の配列

細菌の rRNA は 16S, 23S, 5S の 3 種類で構成されている。16S rRNA には属レベルを越えて共通な塩基配列である保存領域が 10 ヶ所ほど存在するので、これらの領域を標的とした PCR プライマー (8UA & 1485B ほか) を用いて、菌種にかかわらずほぼ全領域を増幅することができる。一方、16S rRNA の可変領域には菌種 (属) に特異的な領域があり、ある菌種 (属) だけを検出するプライマーを設計する際には、これら V1 ~ V10 の塩基配列情報を用いる。特に V3 領域には菌種に特異的な配列が多い。

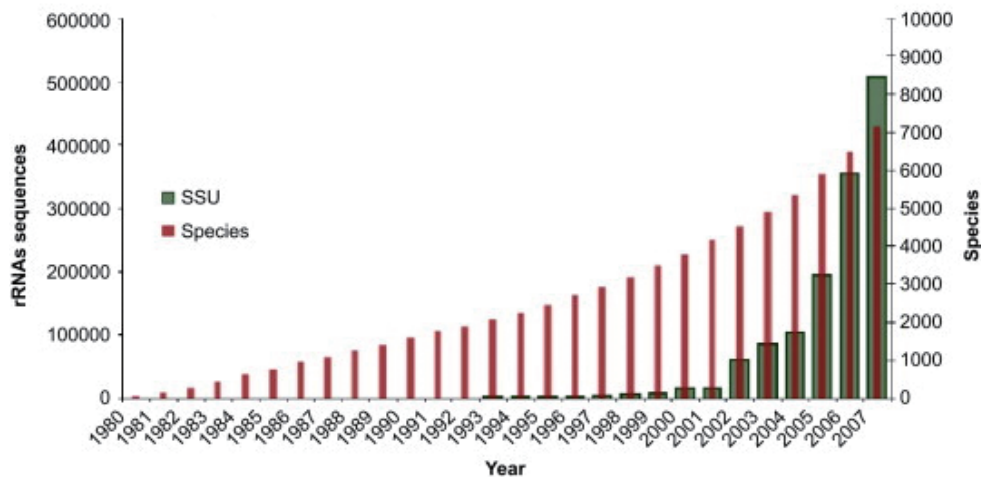


図2. 年次別にみた菌種の数と 16S rRNA 塩基配列の登録状況³⁾

赤色の棒グラフが記載された菌種の数 (右軸) を、緑色のグラフが 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の登録数 (左軸) を表している。

NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) などのデータベースを用いて検索・入手できる。菌株の 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を実施し、これらのデータベースとの相同性の比較 (ホモロジー検索) を行うだけで簡便かつ迅速に属名や菌種名に近いところまで絞り込むことが可能である。筆者らの施設には、全国の病院検査室で同定できなかった菌株が毎日のように届いており、精査を行っている (これまでに 700 菌株以上を解析)。このような菌株では 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定後、データベースとの相同性検索を行い、ときには系統樹解析を実施することで大半のケースにおいて菌種名を確定している。欧米においても 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による菌種の同定は、研究室や大規模な病院では実施されており、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) がそのガイドライン MM-18A⁴⁾ を作成し、公開している。なお、このガイドラインでは細菌の 16S rRNA 遺伝子の全長ではなく、前半の約 500 bp の塩基配列に基づいた同定法であることが筆者らの方法とは異なる点である。シーケンス解析の原理や詳細に関しては既出の総説⁵⁾があるので参照されたい。

細菌分類の変遷と最近の動向

細菌の分類は、20 世紀の前半には病原性菌種とその他の菌種を識別することから始まった。その手段として、血清型や少数の生化学的性状で病原性菌種を識別する検査方法が採用された。菌種が増加するにつれ、調べなければいけない表現形質が多くなり、コンピューターを使った数値分類方法へと進展し、これまで医科細菌学領域で利用されている。1970 年代後半には、再現性の高い方法として細菌の基本構造の成分を利用する化学分類が発展し、現在の分類方法の基礎となった。細胞壁のペプチドグルカンの組成、呼吸鎖酵素キノンの分子種、細胞壁の脂質や脂肪酸の種類、DNA の GC%などを分類指標としている。しかし、どの分類方法をとっても記載されたすべての細菌を完全に分類することはできない。このような流れのなかで、分子進化学的な立場に立つ

て分類する系統分類方法が必要となった。1980 年代から 16S rDNA の配列に基づいて、系統的に分類体系が再構築されている⁶⁾。現在、発刊が続いている Bergy's Manual of Systematic Bacteriology 第 2 版では、この傾向が強く編集方針に打ち出されている。16S rRNA 遺伝子のほぼ全塩基配列を決定し、類似度が 98.7%以上の菌種がない場合は新しい菌種の可能性が高い。98.7 ~ 99%以上の類似度では、最終的に染色体の DNA/DNA ハイブリッド形成を計測して判定する。従来は 16S rRNA 配列の類似度 97%が境界線であった⁷⁾が、シーケンスの精度が上がり、1.5%以上配列が異なる場合はほとんどが別の種になることが示されている⁸⁾ (図 3)。腸内細菌群のようにゲノム配列情報が多数入手できる場合は、国際命名委員会の勧告⁹⁾を受け、多型のあるハウスキーピング遺伝子 (菌の代謝機能をつかさどる) の塩基配列を 4 ~ 5 種類ほど調べて系統関係を比較する手法がとられるようになってきた。現在、使用されてデータの集積が行われているハウスキーピング遺伝子の例を表 1 にまとめた。

今後は、細菌の全ゲノム情報が多数蓄積してくれば、ゲノム配列を比較して菌種を決定できるようになることは容易に推察できるが、地球上の未発見の細菌は数百万種といわれ、わかっている菌種がわずか数%の現状では、多型遺伝子 (ハウスキーピング遺伝子) の塩基配列と染色体の DNA/DNA ハイブリッド法の両方の役割が重要である¹⁰⁾。しかし、今後も細菌の表現性状を解析する重要度はいささかも変わらない。ポストゲノムの時代を迎え、ゲノム解析技術とその解析結果が分類学の概念や分類体系の構築に影響を与えるかもしれない。

細菌学名の調べ方

国際細菌分類命名委員会は、国際細菌命名規約 (ICNB) に基づき、1980 年 1 月 1 日付で「細菌学名承認リスト: Approved lists of bacterial names」を出版し、このリストを細菌すべての学名の出発点とした。その結果、このリストに記載されていない菌種は発表されていないものとみなし、必要に応じて新分類群として提案することで対応することになった。さら

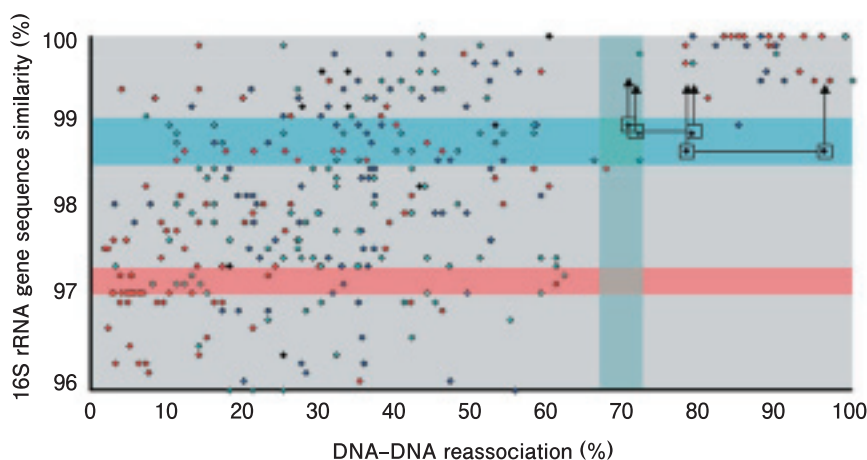


図3. DNA-DNA ハイブリッド値と 16S rRNA 塩基配列の類似度との関係⁷⁾

横軸は DNA-DNA ハイブリッド形成率 (70%以下は別菌種, 70%以上は同じ菌種; うすい水色の縦ラインが境界線), 縦軸には 16S rRNA 遺伝子の類似度を表している。2005 年に記載された新種について各基準株の DNA-DNA ハイブリッド形成の値と 16S rRNA 塩基配列の類似度の関係をプロットしたものである。従来は赤色横ラインの 97%が新種か否かの境界ラインであったが, シークエンスの精度が上がったこともあり, 水色の横ライン 98.7%~99%の類似度以下では別の菌種である。

表1. 細菌の系統解析に用いられる主要なハウスキーピング遺伝子

遺伝子名	正式名/ 機能・活性	塩基数 (bp)* (<i>E. coli</i> K12)	系統解析用 塩基数 (bp)*
16S rRNA	16S ribosomal RNA	1541	>1300
<i>rpoB</i>	RNA polymerase beta-subunit	4029	400~2000
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B, Type II topoisomerase	2415	930~1300
<i>dnaJ</i>	chaperone with DnaK; heat shock protein	1131	230~930
<i>sodA</i>	superoxide dismutase gene	621	360~430
<i>groEL</i> (HSP60)	chaperone, peptide-dependent ATPase, heat shock protein	1647	550~1300
<i>tuf</i>	protein chain elongation factor EF-Tu	1185	800
<i>fusA</i>	GTP-binding protein chain elongation factor EF-G	2115	590
<i>recA</i>	DNA repair protein RecA	1062	530~560
<i>rpoD</i>	RNA polymerase, sigma (70)	1842	510~830
<i>gltA</i>	citrate synthase	1284	320~410
<i>atpD</i>	membrane-bound ATP synthase, beta-subunit	1383	1300
<i>infB</i>	protein chain initiation factor IF-2	2673	460

* The size and locus are different dependent on bacterial group.

に重要なことは、新しい学名（新種）はすべて本命名委員会の公式雑誌である International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) に発表しなければならず、この雑誌に掲載されたものだけを正式な学名とみなすことにした。なお、雑誌名が 2000 年から International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) に変更となった。したがって、細菌のすべての学名を知るには、1980 年の細菌学名承認リストとそれ以降の IJSB もしくは IJSEM 誌に掲載されたものを調べることで可能である。とはいえ、承認リストに掲載された細菌は 290 属 1,922 種（亜種を含む）であったものが、2009 年 4 月現在約 1,800 属、約 7,000 種にまで増えており（図 2）、誌面ベースでの検索は容易ではない。幸い、これら正式に発表された学名はデータベース化されており、インターネット上で検索できるウェブサイトが 2 カ所ある。1 つは、フランスの Euzéby 博士が制作・管理している LPSN : List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>) である¹⁰⁾。もう 1 つのサイトは、ドイツの DSMZ ; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) が管理している Bacterial Nomenclature Up-to-Date (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php) である。どちらも毎月発刊される IJSEM 誌にあわせて毎月データが更新されている。したがって、これらの学名データベースを利用することによって、ある学名が既に使用されているのか、もしくは正式に発表されたものであるかを調べることはできる。しかしながら、現時点である属にはどのような菌種が登録されているかを調べる目的でこれらのデータベースを使用するには注意が必要である。すなわち、IJSEM 誌では新種の登録がされているのみならず、旧分類の見直しによって属の移籍や菌種名の変更なども随時行われており、これらの登録と変更がすべて反映されたデータベースであることに留意すべきである。その具体的な例を示しながら概説する。アルファベット順に掲載されている細菌の属名として最初の *Abiotrophia* は筆者らのグループが新属として提案したものであるが、当初は本属に 4 菌種が登録された

（図 4）。しかし、2009 年 4 月現在は青枠で囲った *A. defectiva* のみとなっている。これは、他の 3 菌種が 2000 年に新設された *Granulicatella* 属へ移籍されたからである。よって、現在は *Abiotrophia* 属には 1 菌種のみが存在するが、データベースには一度登録された履歴も残されるため、現時点での分類だけを反映しているのではない。*A. adiacens* はこれまでに 2 度菌種名の変更がなされた（図 4）。最初は *Streptococcus adiacens* で登録され、その後 *Abiotrophia* 属新設に伴って本属へ移籍、その後、2000 年に新設された *Granulicatella* 属へ移籍して現在に至っている。これら各属（この例では 3 属）における記載もすべて含んだデータベースになっていることに注意しながら現在の菌種名を調べる必要がある。

菌名の正しい表現方法

菌種名が二命名法に基づきラテン語で記載されることは前述のとおりである。菌種名が正式名ではない場合には、“ ” で菌名を囲んで表記する。正式な菌種名とは前述のように、1980 年の細菌学名承認リストとそれ以降の IJSB もしくは IJSEM 誌に記載された菌種名のことであるが、永遠に正しいわけではなく、絶えず新しい分類群の提案がなされ、有効な菌種名はしばしば変更される。

日本語の俗称である黄色ブドウ球菌の学名は、*Staphylococcus aureus* とイタリック体で記載し（手書きの場合にはアンダーライン；*Staphylococcus aureus*）、「*Staphylococcus*」が属名を表し、「*aureus*」が種形容語である。属名が文章中に何度も出てくる場合に混乱のおそれがない時に限り、1 文字に省略して「*S. aureus*」と記載できるが、「*Sta. aureus*」のような省略方法は認められていない。なお、「*S. aureus*」の「*S.*」と「*aureus*」の間にはスペース 1 文字を空けることに注意が必要である。菌名は語源学¹¹⁾に基づいて命名されている。学名をラテン語で表さないといけないが、現在、IJSEM 誌に投稿された論文はドイツの Trüper 博士がチェックしている。投稿前にメールでの相談も可能である（<http://www.bacterio.cict.fr/trueper.html>）。学名の由来として、その形態、どこで見つかったか、ど

属名 基準種	<i>Abiotrophia</i> Kawamura <i>et al.</i> 1995, gen. nov. Typespecies: <i>Abiotrophia defectiva</i> (Bouvet <i>et al.</i> 1989) Kawamura <i>et al.</i> 1995. Reference: KAWAMURA (Y.), HOU (X.G.), SULTANA (F.), LIU (S.), YAMAMOTO (H.) and EZAKI (T.): Transfer of <i>Streptococcus adjacens</i> and <i>Streptococcus defectivus</i> to <i>Abiotrophia</i> gen. nov. as <i>Abiotrophia adiacens</i> comb. nov. and <i>Abiotrophia defectiva</i> comb. nov., respectively. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i>, 1995, 45, 798-803. Original article in IJSEM Online More information (in French)
旧名称	<i>Abiotrophia adiacens</i> (Bouvet <i>et al.</i> 1989) Kawamura <i>et al.</i> 1995, comb. nov. Type strain (see also StrainInfo.net): strain GaD = ATCC 49175 = CCUG 27637 A = CCUG 27809 = CIP 103243 = DSM 9848 = LMG 14496 = NCTC 13000. Basonym: <i>Streptococcus adjacens</i> Bouvet <i>et al.</i> 1989. Reference: KAWAMURA (Y.), HOU (X.G.), SULTANA (F.), LIU (S.), YAMAMOTO (H.) and EZAKI (T.): Transfer of <i>Streptococcus adjacens</i> and <i>Streptococcus defectivus</i> to <i>Abiotrophia</i> gen. nov. as <i>Abiotrophia adiacens</i> comb. nov. and <i>Abiotrophia defectiva</i> comb. nov., respectively. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i>, 1995, 45, 798-803. Original article in IJSEM Online Note: The spelling of the specific epithet is <i>adiacens</i> in <i>Abiotrophia adiacens</i> (new combination) and <i>adjacens</i> in <i>Streptococcus adjacens</i> (basonym). Y. Kawamura <i>et al.</i> used <i>adiacens</i> because the IJSB editor recommended to use <i>i</i> instead of <i>j</i>. Reference: FREDERIKSEN (W.): Personal communication.
移籍	---> <i>Granulicatella adiacens</i> (Bouvet <i>et al.</i> 1989) Collins and Lawson 2000, comb. nov.
移籍	<i>Abiotrophia balaenopterae</i> Lawson <i>et al.</i> 1999, sp. nov. Type strain (see also StrainInfo.net): strain M1975/96/1 = ATCC 700813 = CCUG 37380 = CIP 105938. Reference: LAWSON (P.A.), FOSTER (G.), FALSEN (E.), SJÖDÉN (B.) and COLLINS (M.D.): <i>Abiotrophia balaenopterae</i> sp. nov., isolated from the minke whale (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>). <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i>, 1999, 49, 503-506. Original article in IJSEM Online ---> <i>Granulicatella balaenopterae</i> (Lawson <i>et al.</i> 1999) Collins and Lawson 2000, comb. nov.
移籍	<i>Abiotrophia defectiva</i> (Bouvet <i>et al.</i> 1989) Kawamura <i>et al.</i> 1995, comb. nov. (Type species of the genus). Type strain (see also StrainInfo.net): strain SC10 = ATCC 49176 = CIP 103242 = CCUG 27639 = CCUG 27804 = DSM 9849 = LMG 14740. Basonym: <i>Streptococcus defectivus</i> Bouvet <i>et al.</i> 1989. Reference: KAWAMURA (Y.), HOU (X.G.), SULTANA (F.), LIU (S.), YAMAMOTO (H.) and EZAKI (T.): Transfer of <i>Streptococcus adjacens</i> and <i>Streptococcus defectivus</i> to <i>Abiotrophia</i> gen. nov. as <i>Abiotrophia adiacens</i> comb. nov. and <i>Abiotrophia defectiva</i> comb. nov., respectively. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i>, 1995, 45, 798-803. Original article in IJSEM Online More information (in French)
移籍	<i>Abiotrophia elegans</i> Roggenkamp <i>et al.</i> 1999, sp. nov. Type strain (see also StrainInfo.net): strain B1333 = ATCC 700633 = CCUG 38949 = CIP 105513 = DSM 11693. References: VALIDATION LIST N° 68. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i>, 1999, 49, 1-3. [ROGGENKAMP (A.), ABELE-HORN (M.), TREBESIU (K.H.), TRETTER (U.), AUTENRIETH (I.B.) and HEESEMANN (J.): <i>Abiotrophia elegans</i> sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. <i>J. Clin. Microbiol.</i>, 1998, 36, 100-104.] Validation List N° 68 Published with permission of the IJSEM Editorial Office ---> <i>Granulicatella elegans</i> (Roggenkamp <i>et al.</i> 1999) Collins and Lawson 2000, comb. nov.

図4. 細菌の学名データベースの検索方法

LPNS, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>)
Abiotrophia 属菌を例として

の動物あるいは臓器から分離されたか、どのような栄養分を好むか、最初に誰が分離したか、どのような病気を引き起こすかなどを示していることが多い。例えば、「*Staphylococcus*」の「*Staphylo*」がブドウの房状、「*coccus*」は球状、そして「*aureus*」は金色を意味している。このような視点で菌名をその由来から眺めてみると親しみやすいかもしれない。

菌種から上位レベルへ目を向けてみると、例えば *Staphylococcus* 属がまとめられている科 family は *Staphylococcaceae* であり、さらには属している目 order は *Bacillales* である。これらの科と目の名前の語尾に注目すると、科は *-aceae*、目は *-ales* で終わることを覚えておくと、学名がどの階層であるかを理解しやすい。

菌名の表記で特記すべきは、これまで20年以上もの間、論争が絶えなかった *Salmonella* である。*Salmonella* は2つの種から成り立っていた。すなわち、6つの亜種を含む *S. choleraesuis* と *S. bongori* が属する。*S. choleraesuis* subspecies I には、ヒトに対して病原性を持つほぼすべてのサルモネラの血清型が属していた。*S. choleraesuis* という命名は、種と血清型両方に関連しているため、前述のように国際細菌命名規約では、種(亜種)以上の細菌を取り扱うという規則に反する。最終的に、2002年の国際微生物連盟(IJSEM)の裁定委員会で、医科細菌学上重要な *Salmonella* の血清型はすべて *Salmonella enterica* に統一された¹³⁾。従来の7つの亜群は *S. enterica* の亜種となり、第一亜群に入るヒトに病原性のある菌は次のように記載する。

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhi
Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium
Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Enteritidis

上記の記載方法は冗長であるので実用上は下記のように略記しても問題ない。

Salmonella enterica var. Typhi
Salmonella enterica var. Typhimurium
Salmonella enterica var. Enteritidis

一方、*S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* などの表記は使用するべきではない。

新種の提唱方法

分離菌株の分類学的な特徴づけを行って同定を試みた結果、既存のいずれの菌種にも当てはまらない場合には、新種の可能性を検討する。すなわち、分離株の重要な性状が記載と完全に一致しない場合には、そのもっとも近い菌種の基準株 type strain との定量的な DNA/DNA ハイブリッド試験を実施する。その結果が70%以下の場合には、新菌種と判断して菌種の記載のために特徴的な性状を調べる。あるいは、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長約1,500塩基のシーケンス解析(ATCGの配列を決定すること)を行い、どの菌種の基準株とも97%以下の類似度しかない場合にも新しい菌種である可能性が極めて高い。なお、培養性状、グラム染色所見、生化学性状ほかの表現形質が16S rRNAの結果と合理的であるかを確認することが重要である。

新菌種であることが確定したら、表現形質や化学分類学的な情報を調べて新種の提案を行う。筆者らのような研究室レベルでしか実施できないような情報だけではなく、最終的には一般の検査室でもその新種を他の類縁菌種と識別できるように、キットによる生理・生化学的な性状に基づいた特徴的な基準を明確に提示する必要がある。筆者らのグループが行った新種の記載¹⁴⁾を例に概説する(図5)。記載 description は、国際細菌命名規約に従った新種(新分類群)の定義である。記述する項目は、学名(本例の種形容語の *pleuritidis*; 本菌が胸膜炎 *pleuritis* の患者から初めて分離されたことに由来した命名)、語源学 etymology、細胞の大きさと性状、集落の形態、生理・生化学的な性状と続き、脂肪酸の組成、DNAのG+C含量、場合によっては16S rRNA 遺伝子ほかの塩基配列の accession no. などである。最後に(記載順は慣例的であるが)、基準株 type strain を明記する。「属」や「種」は実体がない概念であるが、種の基準である「株」は細菌の実体である。基準株は分類学上の重要な意味をもち、1菌種に1株しか存在しない。ただ、新種の基準株とすべき株は、IJSEM 誌の投稿規定で異なる国の2カ所以上の保存機関に寄託するように決められているので、基準株が2つ以上の番号で存在する。図4の例では、日本の理化学研

研究所で JCM 14110 の番号で保存されている一方で、スウェーデンの施設では CCUG 54350 という番号で保存されている。これら保存に関する取り決めは、新種が発表された後には常に世界中の研究者が入手できる体制になればいけないこと、そして国を変えて複数の施設への委託を義務としているのは、保存上のアクシデントに対するリスク分散を考慮してのことである。

「基準株」について補足しておきたいことが2点ある。検査室で薬剤感受性試験や菌種同定の精度管理に用いている標準株 standard strain や参照株 reference strain と分類学上の基準株 type strain とは全く異なる概念と実体である。もう1つは、ATCC や DSM などの保存施設の番号がついていても、これらの施設は基準株だけを保存しているわけではないので、その株が必ずしも基準株とは限らないことである。

Description of *Prevotella pleuritidis* sp. nov.

Prevotella pleuritidis (pleu.ri'ti.dis. N.L. gen. fem. n. pleuritidis of/from pleuritis pleuritis, an inflammation of the pleura). Cells are obligately anaerobic, non-spore-forming, non-motile, Gram-negative rods (0.8x1.7–4.2µm). Colonies are 0.5–1.5mm in diameter, grey to off-white-grey, circular, entire, slightly convex and smooth on EG agar plates. Growth is inhibited in the presence of 20 % (w/v) bile. Acid is produced from glucose, lactose, maltose and D-mannose but not from L-arabinose, D-cellobiose, glycerol, D-mannitol, D-melezitose, D-raffinose, L-rhamnose, salicin, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose or D-xylose. Aesculin is not hydrolysed. Indole is not produced. Gelatin is digested. Catalase and urease are not produced. Positive reactions are obtained using Rapid ID 32A for β -galactosidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -fucosidase, alkaline phosphatase, leucyl glycine arylamidase, leucine arylamidase, pyroglutamic acid arylamidase, alanine arylamidase and glutamyl glutamic acid arylamidase. Mannose is fermented. Raffinose is not fermented. All the other tests (urease, arginine dihydrolase, α -galactosidase, 6- β -phospho- β -galactosidase, β -glucosidase, α -arabinosidase, β -glucuronidase, glutamic acid decarboxylase, nitrate reduction, indole production, arginine arylamidase, proline arylamidase, phenylalanine arylamidase, tyrosine arylamidase, glycine arylamidase, histidine arylamidase and serine arylamidase) are negative. The major end products [from 1 % (w/v) peptone/1 % (w/v) yeast extract/1 % (w/v) glucose broth cultures] are succinic and acetic acids. Both non-hydroxylated and 3-hydroxylated long-chain fatty acids are present. The major cellular fatty acids are anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} and C_{18:1} ω 9c. The principal respiratory quinones are menaquinones MK-11 (42 %) and MK-12 (50 %). Minor menaquinones are MK-10 (3 %) and MK-13 (4 %). The G+C content of the type strain is 45.4 mol%. The type strain is GTC 3021^T (=JCM 14110^T=CCUG 54350^T), isolated from pleural fluid of a patient with suppurative.

← 学名

← 語源学 (etymology) ; 学名の由来に関する記述

← 細胞の大きさや形状
コロニー形態

← 生理・生化学的な性状

← 脂肪酸の組成

← DNAのG+C含量

← 基準株の指定

図5. 新種の記載 (国際細菌命名規約に基づいた学名)
(*Prevotella pleuritidis* Sakamoto et al. 2007)

さて、新菌種の記載を行い、基準株が寄託されたことの証明書を添えて、論文として新種の提案、すなわち学名の提唱を実施することになる。原則的に、学名の発表はIJSEM誌上でなければならない。IJSEM誌に投稿して原著論文として採択して掲載されれば、それをもって正式な学名の発表 valid publication となる。なお、他の学術雑誌での発表が有効なケースがある。その手続きは、発表された雑誌の別刷り（現在はPDFでも可能）をIJSEM誌編集部へ送付（送信）する。有効な発表 effective publication の条件を満たしているかが審議された後、認められてIJSEM誌以外で発表された学名を正式に発表するためのリスト validation list に掲載されれば、正式発表したことになる。なお、学名の正式発表の日付は、IJSEM誌に掲載された日付となるので、学名につけられる年号が有効発表の雑誌出版年と異なる場合がある。

病原細菌分類の問題点

病原性細菌には分類の規約が制定された以前に見られた菌種が多く、命名規約にそって菌名を変更すると社会的に大きな影響を及ぼすものがあり、分類学上いくつかの問題をかかえている。16S rRNA塩基配列の類似度による細菌の同定や定量的ハイブリッド形成法により種の概念が確立されたのは前述のとおりであるが、これまで独立した種と考えられてきたいくつかの病原性細菌群が、DNA/DNA 相同性 70% 以上を示すことが判明した。すなわち、*Escherichia coli*（大腸菌）と *Shigella flexneri*（赤痢菌）、*Mycobacterium tuberculosis*（ヒト型結核菌）と *M. bovis*（ウシ型結核菌）、*Bacillus cereus*（セレウス菌）と *B. anthracis*（炭疽菌）、*Yersinia pestis*（ペスト菌）と *Y. pseudotuberculosis*（偽結核菌）、*Clostridium botulinum*（ボツリヌス菌）と *C. sporogenes* はいずれもお互いに 85% 以上の相同性があり、種の定義に基づけば同じ菌種である。

Escherichia coli は *Shigella* 属の 4 菌種（*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*）と 16S rRNA 塩基配列は同じであり、その他の多型の遺伝子解析でも 1 つの種を形成することが実証されている⁸⁾。仮にこれらの菌を再分類する場合には、*Escherichia coli* に

命名の優先権があるため、*Shigella* 属の菌種名が分類学上の地位を失うことになる。しかしながら、*Shigella* 属の菌種名は命名規約（規則 56 b）で保存名 conserved name となっているため、裁定委員会の審議事項として取り上げて規約の変更が行われない限り、変更はできない。なお、裁定委員会は 3 年ごとに開催される国際微生物連盟の会議中に実施されるが、この委員会では 3 年間に生じた問題、すなわち命名規約に違反したものや矛盾したもので IJSEM に request for opinion として採択・掲載されたものが審議される。裁定が行われたケースとしては、先述のとおり *Salmonella* 属の命名がある。チフスやパラチフスを起こすチフス菌やパラチフス菌は、*Salmonella enterica* の特定の血清型が引き起こすという位置づけに落ち着いた。

Mycobacterium tuberculosis complex を形成する 5 菌種（*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*）も、現在の分子系統分類の基準に合わせると 1 つの菌種である。

医科細菌学では、歴史的に菌株が病原因子を保有しているか否かにより菌種を分類してきた経緯がある。しかしながら、現在では上述の種の定義を満たせば、毒素産生の有無は菌種の分類とは無関係であるという認識との相違がある。遺伝学的に同じ菌種に属する *Clostridium botulinum* と *C. sporogenes* が、前者はボツリヌス毒素を産生する株、後者が非産生株として別の菌種でよばれているのがその例である。すなわち、細菌ゲノムは同じであるにもかかわらず、ボツリヌス毒素の産生を支配するプラスミドを保有しているかないかで菌種名が異なるという不思議な状況となっている。

細菌の分類に関係したおもな著書・雑誌・ウェブサイト

- Lapage SP et al. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision) ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=icnb>
- 国際細菌命名規約 1990 年版翻訳委員会. 国際細菌命名規約 (1990 年改訂). 東京: 菜根出版; 2000. 295p. (上記の日本語訳)

- Grarrity CM ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Vol.1. Berlin Germany: Springer ; 2001. 721p, Vol.2. Berlin Germany: Springer ; 2005. 2816p. Springer-Verlag ; 全 5 巻で以下続刊 (Vol.3 は 2009 年内に刊行予定)
- コーワン ST. 微生物分類学事典. 東京 : 学会出版センター ; 1998. 513p.
- 鈴木健一郎, 横田 明, 平石 明 編. 微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に (Springer Lab Manual). 東京 : シュプリンガー・フェアラーク東京 ; 2001. 291p.
- 病原体等安全取扱・管理指針. 日本細菌学会. 2008.
- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) ; <http://ijs.sgmjournals.org/>
- Systematic and Applied Microbiology ; <http://www.sciencedirect.com/science/journal/07232020>
- ナショナルバイオリソースプロジェクト病原微生物 HP ; <http://pathogenic.lab.nig.ac.jp/index.jsp>
- 日本微生物資源学会 HP ; http://www.jbcc-home.jp/jbcc_strain_database.html
- 理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発 (JCM) ; <http://www.jcm.riken.jp/>
- GenBank (NCBI) ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- EMBL (EBI) ; <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>
- DDBJ ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>
- 3) Yarza P et al. The All-Species Living Tree project : A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Syst Appl Microbiol. 2008 ; 31 (4) : 241-250.
- 4) Petti CA et al. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing ; Approved Guideline. Wayne, PA, USA : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2008. 88p.
- 5) 波多宏幸, 大楠清文, 江崎孝行. 感染症診断の迅速化をめざして シークエンス解析. 臨床と微生物. 2007 ; 34 : 487-492.
- 6) Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 1987 ; 51 (2) : 221-271.
- 7) Stackebrandt E, Goebel BM. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol. 1994 ; 44 : 846-849.
- 8) Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards. Microbiol Today. 2006 ; 33 : 152-155.
- 9) Stackebrandt E et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 ; 52 (3) : 1043-1047.
- 10) 江崎孝行, 大楠清文. 病原細菌の正式発表菌名リスト. 日本臨床微生物学雑誌. 2007 ; 17 (2) : 53-108.
- 11) Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature : a folder available on the internet. Int J Syst Bacteriol. 1997 ; 47 : 590-592.
- 12) Truper HG. How to name a prokaryote? Etymological considerations, proposals and practical advice in prokaryote nomenclature. FEMS Microbiol Rev. 1999 ; 23 : 231-249.
- 13) 江崎孝行. 医学細菌の分類・命名の情報 14. *Salmonella* 属の菌種の分類命名に関する裁定委員会の決定事項. 感染症学雑誌. 2002 ; 76 (10) : 839-841.
- 14) Sakamoto M et al. *Prevotella pleuritidis* sp. nov., isolated from pleural fluid. Int J Syst Evol Microbiol. 2007 ; 57 (8) : 1725-1728.

参考文献

- 1) Wayne LG et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Syst Bacteriol. 1987 ; 37 (4) : 463-464.
- 2) 河村好章. 第 18 回日本細菌学会技術講習会テキスト : 細菌の系統分類と同定方法. 日本細菌学会誌. 2000 ; 55 : 545-584.

Taxonomy and Identification of Bacteria Based on Molecular Phylogeny

Kiyofumi OHKUSU and Takayuki EZAKI

Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194

Key Words

Bacteria, Classification, Identification, International Code of Nomenclature of Bacteria, Molecular Phylogeny
