

医学的に重要な細菌についての分類学

抗酸菌の分類と同定のアップデート

Update on Classification and Identification of Mycobacteria

おお くす きよ ふみ
大 楠 清 文
Kiyofumi OHKUSU

はじめに

抗酸菌は結核菌群と非結核性抗酸菌、培養不能ならい菌に大別される。結核菌群は、以前はヒトの結核の主要な原因菌である *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌)、“*M. bovis*” (ウシ菌)、“*M. africanum*” (アフリカ菌)、“*M. microti*” (ネズミ菌)、“*M. caprae*” (カブレ菌)、“*M. pinnipedii*” (アシカ菌) の 6 菌種が記載されていた。これらの菌種は動物に対する病原性が異なるが、DNA レベルの相同性では区別がつかないため「結核菌群」としてまとめられている。非結核性抗酸菌は、発育速度、発育集落の性状および光照射後の発色変化によって、いわゆる Runyon の I～IV 型に分類されている。本分類は非定型抗酸菌をグループに分けて、ある程度の菌種を推定できるので、現在でもその有用性は変わっていない。

一方、1990 年代に PCR が発明されて以降、PCR は遺伝子工学を飛躍的に発展させて、基礎生命科学の分野だけでなく、感染症や様々な疾患の診療にも現在、頻用されている。実際、結核や *M. avium*、*M. intracellulare* による感染症を検体から直接、数時間のうちに診断できるようになった。さらには、近年、核酸抽出から増幅反応、検出までをすべて自動で行う次世代型の遺伝子検査システムが実用化されている。

客観的なゲノム情報が菌株レベルで蓄積されるにつれ、病原性細菌の菌種内での株間あるいは類縁菌種間での遺伝子情報の比較が容易となった。高速な自動 DNA シークエンサーの普及とあいまって、DNA 塩基配列解析による細菌の同定が数時間で実施できるようになった。さらに、次世代型シークエンサー

の台頭により 1～2 日間で細菌の全ゲノムの配列を比較できるようになり、新たな菌種の登録が急激に増加している。事実、非結核性抗酸菌にも、この 20 年ほどで 100 菌種以上が新種として仲間入りした。

そして、「ポストゲノム時代」を迎えた今日、病原体に由来したタンパク質成分の分子量情報 (マスペクトル) のパターンから、前処理の時間を含めて 60 分足らずで抗酸菌株の同定ができるようになった。すなわち、微生物の新しい同定法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOF MS) が主流になりつつある。

I. 細菌の分類と新種の登録状況

1. 細菌の分類体系

細菌の分類は、国際原核生物命名規約 (International Code of Nomenclature of Prokaryotes; ICNP) 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、国際原核生物命名規約では、種あるいは亜種: 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)、形態型 (morphovar)、化学型 (chemovar) 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

表 1 *Mycobacterium abscessus* の分類階級と学名

分類階級	rank	学名 scientific name
門	Phylum	"Actinobacteria"
綱	Class	Actinobacteria
目	Order	Mycobacteriales
科	Family	Mycobacteriaceae
属	Genus	Mycobacterium
種	Species	<i>Mycobacterium abscessus</i>
亜種	Subspecies	<i>S. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>S. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>S. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>

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。

細菌は下位から亜種 (sub species) < 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 (表 1)。例えば、*Mycobacterium* 属がまとめられている科 (family) は *Mycobacteriaceae* であり、さらには属している目 (order) は *Mycobacteriales* 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。

細菌 DNA の GC% (グアニンとチミンの割合) は 25% から 80% まで分布する幅広い生物集団である。*Mycobacterium* 属菌の GC% は 61% から 71% で、いわゆる GC リッチなゲノムを有する。

2. 種の定義と今後の展開

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 (DDH) 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°C 以内におさまる菌株の集まり」としている¹⁾。近年、客観的なゲノム情報が菌株レベルで蓄積されるにつれ、病原性細菌の菌種内での株間あるいは類縁菌種間での遺伝子情報の比較が容易となった。つまり、次世代型シーケンサーの台頭により 1~2 日間で細菌の全ゲノムの配列を決定・比較できるようになった。このような背景のなか、全ゲノムの類似度 average nucleotide identity (ANI) によって菌種を同定あるいは新種か否かの判断を行うことが提案²⁾されている (図 1)。全ゲノムの配列を約 1,000 塩基に論理上切断して、類縁種も同じようにデータ処理を行って類似度を計算する。これらお互い全ての断片の類似度を平均した値が ANI である。種の定義の

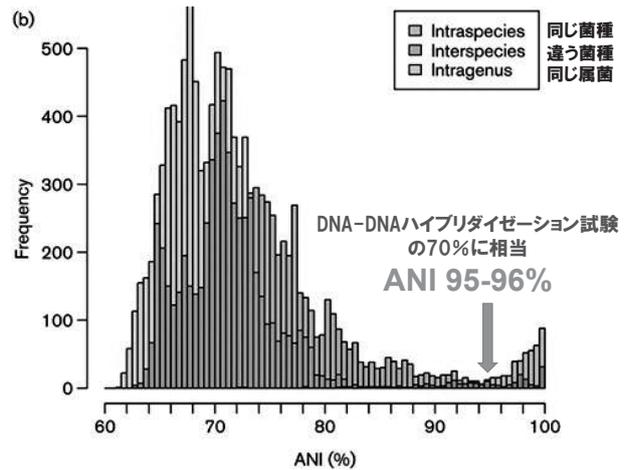


図 1 全ゲノム解析に基づいた ANI (%) の分布

種の定義のゴールドスタンダードは DNA/DNA ハイブリッド法で測定される 70% 類似度であるが、これは ANI で 95~96% に相当する。

(文献 2) より転載、一部改変)

(図 1 は巻末にカラーで掲載しています)

ゴールドスタンダードは上述のとおり、DDH で測定される 70% 類似度であるが、これは ANI で 95~96% に相当することが報告²⁾されている。すなわち、ANI > 95~96% の株は DDH > 70% に対応するため同一種に属し、逆に ANI < 95% の株は異なる種に属することが多くの研究で実証されている³⁾。DDH は大量のゲノム DNA を必要として、操作が煩雑でエラーが発生しやすいため、確信のある結果を得るためには何度も繰り返す必要がある。一方、ゲノム間距離 Genome to Genome Distance (GGD) はゴールドスタンダードとされている DDH に相当するもので、DDH と同等の割合に換算できる結果が得られる⁴⁾。近い将来、新種の提案では全ゲノム配列を利用した ANI や GGD が主流となる可能性がある。

3. 抗酸菌新種の記載状況

細菌は現在、約 18,000 種以上が記載されており、毎年 100 菌種以上が新たな菌種として登録されている。1986 年に発刊された細菌分類のバイブルとされる Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (第 1 版) に記載されていた *Mycobacterium* 属菌は 54 菌種であった。ところが、1990 年代以降、後述するような遺伝子学的な解析の普及とあわせて、新たな非結核性抗酸菌 (NTM) が爆発的に増加している。2021 年 9 月現在、*Mycobacterium* 属菌 194 菌種 (13 亜種) を一覧表にまとめたので参照いただきたい (表 2)。

表 2 *Mycobacterium* 属の菌種一覧 (194 菌種 13 亜種 ; 2021 年 9 月現在)

Year	Species	Growth rate	Year	Species	Growth rate	Year	Species	Growth rate
1880	<i>M. leprae</i>	S	1996	<i>M. conspicuum</i>	S	2010	<i>M. paraffinicum</i>	S
1883	<i>M. tuberculosis</i>	S		<i>M. lentiflavum</i>	S		<i>M. paraseoulense</i>	S
1889	<i>M. smegmatis</i>	R		<i>M. hodleri</i>	R	2011	<i>M. sherrisii</i>	S
1899	<i>M. phlei</i>	R	1997	<i>M. hassiacum</i>	R		<i>M. europaeum</i>	S
1901	<i>M. avium</i> (<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ; 1990)	S		<i>M. mageritense</i>	R		<i>M. algericum</i>	S
1912	<i>M. lepraemurium</i>	S		<i>M. triplex</i>	S		<i>M. shinjukuense</i>	S
1923	<i>M. chelonae</i> → <i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> ; 2017	R		<i>M. novocastrense</i>	R	2012	<i>M. litorale</i>	R
	<i>M. paratuberculosis</i> → <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ; 1990	S	1998	<i>M. bohemicum</i>	S		<i>M. koreense</i>	S
1926	<i>M. marinum</i>	S		<i>M. heidelbergense</i>	S		<i>M. bacteremicum</i>	R
1938	<i>M. fortuitum</i> (<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> ; 1986)	R	1999	<i>M. goodii</i>	R	2013	<i>M. minnesotense</i>	S
1949	<i>M. intracellulare</i> (<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> ; 2018)	S		<i>M. murale</i>	R		<i>M. yongonense</i> → <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i> ; 2018	S
1950	<i>M. ulcerans</i>	S		<i>M. tusciae</i>	S		<i>M. engbaekii</i>	S
1953	<i>M. abscessus</i> (<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ; 2011)	R		<i>M. wolinskyi</i>	R		<i>M. heraklionense</i>	S
1955	<i>M. kansasii</i>	S		<i>M. elephantis</i>	R		<i>M. longobardum</i>	S
1956	<i>M. scrofulaceum</i>	S		<i>M. kubicae</i>	S		<i>M. iranicum</i>	R
1957	<i>M. microti</i> → <i>M. tuberculosis</i> ; 2018	S		<i>M. septicum</i>	R		<i>M. parakoreense</i>	S
1959	<i>M. xenopi</i>	S	2001	<i>M. doricum</i>	S		<i>M. fragae</i>	S
1962	<i>M. flavescens</i>	S		<i>M. frederiksbergense</i>	R		<i>M. sediminis</i>	R
	<i>M. gordonae</i>	S		<i>M. heckeshornense</i>	S		<i>M. arabiense</i>	R
1964	<i>M. vaccae</i>	R		<i>M. immunogenum</i>	R		<i>M. bourgelatii</i>	R
1965	<i>M. simiae</i>	S	2002	<i>M. holsaticum</i>	R	2014	<i>M. paragordoniae</i>	S
	<i>M. nonchromogenicum</i>	S		<i>M. lacus</i>	S		<i>M. hippocampi</i>	R
	<i>M. parafortuitum</i>	R		<i>M. palustre</i>	S	2015	<i>M. celeriflavum</i>	R
1966	<i>M. gastri</i>	S		<i>M. vanbaalenii</i>	R		<i>M. paraseoulense</i>	S
	<i>M. terrae</i>	S		→ <i>M. austroafricanum</i> ; 2019	R		<i>M. franklinii</i>	R
	<i>M. thermoresistibile</i>	R	2003	<i>M. caprae</i> → <i>M. tuberculosis</i> ; 2018	S		<i>M. anyangense</i>	R
	<i>M. aurum</i>	R		<i>M. montefiorensis</i>	S		<i>M. saopaulense</i>	R
1967	<i>M. chitae</i>	R		<i>M. pinnipedii</i> → <i>M. tuberculosis</i> ; 2018	S		<i>M. angelicum</i>	S
1969	<i>M. africanum</i> → <i>M. tuberculosis</i> ; 2018	S		<i>M. shottsii</i>	S	2016	<i>M. alsense</i>	S
1970	<i>M. bovis</i> → <i>M. tuberculosis</i> ; 2018	S	2004	<i>M. boenickei</i>	R		<i>M. paraintracellulare</i>	S
	<i>M. triviale</i>	S		<i>M. brisbanense</i>	R		→ <i>M. intracellulare</i> ; 2019	S
1971	<i>M. asiaticum</i>	S		<i>M. canariense</i>	R		<i>M. lutetiense</i>	R
	<i>M. duvalii</i>	R		<i>M. chimaera</i> → <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i> ; 2018	S		<i>M. montmartrense</i>	R
	<i>M. gilvum</i>	R		<i>M. cosmeticum</i>	R		<i>M. arcueilense</i>	R
	<i>M. obuense</i>	R		<i>M. houstonense</i>	R		<i>M. sarraceniae</i>	R
1972	<i>M. szulgai</i>	S		<i>M. nebraskense</i>	S		<i>M. helvum</i>	R
	<i>M. neoaurum</i>	R		<i>M. neworleansense</i>	R		<i>M. oryzae</i>	R
1973	<i>M. farcinogenes</i>	R		<i>M. parascrofulaceum</i>	S		<i>M. paraterrae</i>	S
	<i>M. senegalense</i>	R		<i>M. parmense</i>	S	2017	<i>M. malmesburyense</i>	R
1974	<i>M. gadium</i>	R		<i>M. psychrotolerans</i>	R		<i>M. persicum</i>	S
1977	<i>M. malmoense</i>	S		<i>M. pyrenivorans</i>	R		<i>M. talmoniae</i>	S
1978	<i>M. haemophilum</i>	S		<i>M. saskatchewanense</i>	S		<i>M. stephanolepidis</i>	R
1979	<i>M. komossense</i>	R	2005	<i>M. florentinum</i>	S		<i>M. eburneum</i>	R
1980	<i>M. sphagni</i>	R		<i>M. pseudoshottsii</i>	S		<i>M. aquaticum</i>	R
1981	<i>M. aichiense</i>	R	2006	<i>M. arubense</i>	S		<i>M. aquaticum</i>	R
	<i>M. agri</i>	R		<i>M. aubagnense</i>	R		<i>M. virginienne</i>	S
	<i>M. chubuense</i>	R		<i>M. bolletii</i>	R		<i>M. chelonae</i> subsp. <i>bovis</i>	R
	<i>M. rhodesiae</i>	R		→ <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> ; 2011	R		<i>M. aquiterrae</i>	R
	<i>M. tokaiense</i>	R		<i>M. colombiense</i>	S		<i>M. lehmannii</i>	R
1982	<i>M. shimoidi</i>	S		<i>M. conceptionense</i>	R		<i>M. neumannii</i>	R
1983	<i>M. austroafricanum</i>	R		<i>M. fluoranthenvivorans</i>	R		<i>M. grossiae</i>	R
	<i>M. diernhoferi</i>	R		<i>M. massiliense</i> → <i>M. bolletii</i>	R	2018	<i>M. komaniense</i>	R
	<i>M. fallax</i>	R		→ <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> ; 2017	R		<i>M. shigaense</i>	S
	<i>M. porcinum</i>	R		<i>M. monacense</i>	R		<i>M. decipiens</i>	S
	<i>M. pulveris</i>	R		<i>M. phocaicum</i>	R		<i>M. syngnathidarum</i>	R
1986	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	R	2007	<i>M. kumamotoense</i>	S		<i>M. kyogaense</i>	R
	<i>M. chlorophenolicum</i>	R		<i>M. salmoniphilum</i>	R		<i>M. chelonae</i> subsp. <i>gwanakae</i>	R
	<i>M. morioakaense</i>	R		<i>M. seoulense</i>	S	2019	<i>M. pseudokansasii</i>	S
1987	<i>M. poriferae</i>	R	2008	<i>M. arostiense</i>	S		<i>M. innocens</i>	S
1990	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	S		<i>M. llatzerense</i>	R		<i>M. attenuatum</i>	S
	<i>M. cookii</i>	S		<i>M. senuense</i>	S		<i>M. basiliense</i>	S
1992	<i>M. peregrinum</i>	R		<i>M. setense</i>	R		<i>M. neglectum</i>	R
	<i>M. alvei</i>	R		<i>M. stomatepieae</i>	S		<i>M. palauense</i>	R
	<i>M. confluentis</i>	R	2009	<i>M. aromaticivorans</i>	R		<i>M. stelleriae</i> (orphaned species; <i>Mycobicibacterium stelleriae</i>)	R
	<i>M. madagascariense</i>	R		<i>M. bouchedurhonense</i> → <i>M. avium</i> ; 2019	S	2021	<i>M. helveticum</i>	S
1993	<i>M. brumae</i>	R		<i>M. crocinum</i>	R		<i>M. nivoides</i> (orphaned species; <i>Mycobicibacterium nivoides</i>)	R
	<i>M. celatum</i>	S		<i>M. insubricum</i>	R		<i>M. vicinigordoniae</i>	S
	<i>M. genavense</i>	S		<i>M. kyorinense</i>	S			
	<i>M. hiberniae</i>	S		<i>M. mantanii</i>	S			
	<i>M. intermedium</i>	S		<i>M. marseillense</i>	S			
1995	<i>M. branderi</i>	S		<i>M. noviomagense</i>	S			
	<i>M. interjectum</i>	S		<i>M. pallens</i>	R			
	<i>M. mucogenicum</i>	R		<i>M. riyadhense</i>	S			
				<i>M. rufum</i>	R			
				<i>M. rutilum</i>	R			
				<i>M. timonense</i>	S			
				<i>M. vulneris</i>	S			

II. 抗酸菌学名の調べ方

これら分類群の変更が行われた菌種が、現在どのような菌名になっているかを調べるには、ウェブサイト LPSN (<https://lpsn.dsmz.de/>) からアルファ

ベット順に菌種が掲載されているので、閲覧したい菌種名をクリックすると基準株、菌名の由来（語源学）、記載された論文などを閲覧できる（図 2, 3）。このサイトは元々、フランスの Jean P. Euzéby 博士が制作・管理していたが、2019 年からはドイツの DSM ; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

Genus *Mycobacterium* parent « siblings » children »

① **Name:** *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980)

① **Category:** Genus

① **Proposed as:** gen. nov.

① **Etymology:** *My.co.bac.te'ri.um* Gr. masc. n. *mykēs*, a fungus; *L. neut. n. bacterium*, a small rod; *N.L. neut. n. Mycobacterium*, a fungus rodlet

① **Gender:** neuter

① **Type species:** *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf 1883) Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980)

① Conduct genome-based taxonomy of genus at TYGS **TYGS**

① **16S rRNA gene:** Analyse **FASTA**

① **Original publication:** Lehmann KB, Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 1st ed. J.F. Lehmann, München, 1896.

① **IJSEM list:** Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 1980; **30**:225-420.

① **Nomenclatural status:** validly published

① **Taxonomic status:** correct name

① **Synonyms:**

Name	Kind
<i>Mycobicacterium</i> Gupta <i>et al.</i> 2018	heterotypic synonym, validly published
<i>Mycolicibacillus</i> Gupta <i>et al.</i> 2018	heterotypic synonym, validly published
<i>Mycolicobacter</i> Gupta <i>et al.</i> 2018	heterotypic synonym, validly published
<i>Mycobacteroides</i> Gupta <i>et al.</i> 2018	heterotypic synonym, validly published

① **Emendations:**

Gupta *et al.* 2018 Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol* 2018; **9**:67. **PubMed** **Oren A, Garrity GM.** List of changes in taxonomic opinion no. 28. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; **68**:2137-2138. **PubMed**

図 2 *Mycobacterium* 属菌の検索サイト

<https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium>

Subspecies *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* parent « siblings » children »

① **Name:** *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* (Adékambi *et al.* 2006) Leao *et al.* 2011

① **Category:** Subspecies

① **Proposed as:** comb. nov.

① **Basonym:** *Mycobacterium bolletii* Adékambi *et al.* 2006

① **Etymology:** *bol.let'i.i* N.L. gen. masc. n. *bolletii*, of Bollet, to honour Claude Bollet, a famous clinical microbiologist and taxonomist

① **Gender:** neuter

① **Type strains:** BD; CCUG 50184; CIP 108541; DSM 45149; JCM 15297

① See detailed strain information at **BacDive**

① Conduct genome-based taxonomy at **TYGS**

① **16S rRNA gene:** AY859681 Analyse **FASTA** **ENA** **NCBI**

① **Valid publication:** Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; **61**:2311-2313. **PubMed**

① **IJSEM list:** Euzéby JP. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 61, part 9 of the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; **61**:2797-2798. **PubMed**

① **Nomenclatural status:** validly published

① **Taxonomic status:** correct name

① **Risk group:** 2

① **Synonyms:**

Name	Kind
<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (Adékambi <i>et al.</i> 2006) Gupta <i>et al.</i> 2018	homotypic synonym, validly published
<i>Mycobacterium bolletii</i> Adékambi <i>et al.</i> 2006	homotypic synonym, validly published, distinct rank

図 3 *Mycobacterium* 属の亜種の情報サイト

<https://lpsn.dsmz.de/subspecies/mycobacterium-abscessus-bolletii>

(図 2, 3, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.01>.)

und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) が管理している⁵⁾。毎月発刊される International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) にあわせてほぼ毎月データが更新されている。したがって、これらの菌名データベースを利用することによって、ある菌名がすで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。さらに、菌名が「記載」された IJSEM の論文もリンクされているので、詳細な性状等も確認できる。なお、記載 (description) とは、国際原核生物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、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) が明記されている。

Basonyms は旧名称のことで Synonym (異名あるいは別名) とほぼ同義語である。new combinations (comb. nov.) は新しい組み合わせを意味しており、nomina nova (nom. nov.) は復活名のことである。

なお、gen. nov. は新属名、sp. nov. は新種名を意味する。

Ⅲ. 抗酸菌分類の再編

1. 結核菌群の 6 菌種は *M. tuberculosis* に統一

Mycobacterium tuberculosis complex を形成する 6 菌種 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*) は、現在の分子系統分類の基準に合わせると 1 つの菌種であることは認識されていたが、2018 年 1 月発刊の IJSEM 誌でこれら全ての菌種は、正式に *M. tuberculosis* に統一された⁶⁾。その根拠として、これらの 6 菌種はお互いに ANI が 96% 以上であることが提示された (図 4)。なお、本論文⁶⁾では、あくまでも推奨のレベルではあるが、例えば、“*M. bovis*” を *M. tuberculosis* var. *bovis* と表現することも提案している (表 3)。なお、var. は variant 変種を意味する。特に、ワクチンに使用されている BCG 株は、小児のリンパ節炎や骨髄炎で分離・同定されることもあり、膀胱癌患者の治療にも使用されており、実際に感染症を起こすこ

	Species/ Strain	dDDH		MTBC1	MTBC2	MTBC3	MTBC4	MTBC5	MTBC6	MTBC7	MTBC8	MTBC9	OUT1	OUT2
		ANI	Self-Comparison											
MTBC1	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv ¹		100	97.7	97.5	97.9	98.7	97.3	91.2	97.9	97.6	22.1	18.8	
MTBC2	<i>M. africanum</i> ATCC® 25420 ¹	99.88	100	98	98.5	98.9	98.2	92.2	98.9	98.4	22.2	18.8		
MTBC3	<i>M. bovis</i> ATCC® 19210 ¹	99.78	99.82	100	98.2	98.2	97.8	91.6	98.1	97.8	22.3	19		
MTBC4	<i>M. caprae</i> ATCC® BAA-824 ¹	99.86	99.87	99.83	100	98.8	97.7	91.7	98.6	98.2	22.1	18.8		
MTBC5	<i>M. microti</i> ATCC® 19422 ¹	99.89	99.89	99.79	99.91	100	99.2	93.3	99	98.9	22.3	18.9		
MTBC6	<i>M. pinnipedii</i> ATCC® BAA-688 ¹	99.84	99.86	99.78	99.84	99.92	100	91.6	98.3	97.6	22.1	18.8		
MTBC7	" <i>M. canettii</i> " CIPT 140010059	99.25	99.28	99.21	99.26	99.36	99.26	100	92.5	91.8	22.2	19		
MTBC8	" <i>M. mungii</i> " BM22813	99.88	99.91	99.81	99.88	99.92	99.89	99.31	100	98.6	22.2	18.8		
MTBC9	" <i>M. orygis</i> " 112400015	99.85	99.87	99.80	99.87	99.91	99.86	99.28	99.88	100	22.1	18.8		
OUT1	<i>M. pseudoshottsii</i> L15 ¹	79.33	79.27	79.21	79.34	79.34	79.25	79.29	79.25	79.37	100	19.2		
OUT2	<i>Nocardia asteroides</i> NBRC 15531 ¹	70.92	70.76	70.96	70.94	70.88	71.02	70.99	71.00	70.84	70.75	100		

Color Key	
ANI	dDDH
Self-Comparison	Self-Comparison
96 – 100	80 – 100
< 96	< 80

図 4 *Mycobacterium tuberculosis* complex のゲノム相同性

Mycobacterium tuberculosis complex を形成する 6 菌種 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*) はお互いに ANI が 96% 以上であることが提示されたので、正式に *M. tuberculosis* に統一された。

文献6)より転載、一部改変

表3 *Mycobacterium tuberculosis* complex の旧菌名と推奨菌名

Current Name	Recommended Name	Reference Strain
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>tuberculosis</i>	H37Rv ^T (ATCC 27294 ^T) (type strain of species)
<i>M. africanum</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>africanum</i>	ATCC 25420
<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i>	ATCC 19210
<i>M. bovis</i> BCG	<u><i>M. tuberculosis</i> var. BCG</u>	-
<i>M. caprae</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>caprae</i>	ATCC BAA-824
<i>M. microti</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>microti</i>	ATCC 19422
<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>pinnipedii</i>	ATCC BAA-688
' <i>M. canettii</i> '	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>canettii</i>	CIPT 140010059
' <i>M. mungi</i> '	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>mungi</i>	BM22813
' <i>M. orygis</i> '	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>orygis</i>	112400015
' <i>M. suricattae</i> '*	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>suricattae</i>	-
Dassie bacillus*	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>dassie</i>	-
Chimpanzee bacillus*	<i>M. tuberculosis</i> var. <i>chimpanzee</i>	-

var.; variant 変種

文献6)より転載、一部改変

とがある。したがって、「*M. tuberculosis* var. BCG」のように結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* とは異なる菌株であることを明示して臨床の混乱を避けるべきである(表3、アンダーライン)。

2. NTM が当初 5 属に再編されたが、再度 *Mycobacterium* 属に統一

非結核性抗酸菌 (NTM) の細菌は、2018 年に Gupta らが *Mycobacterium* 属の他、*Mycobacteroides* 属、*Mycolicibacillus* 属、*Mycolicibacter* 属、*Mycolicibacterium* 属の 4 属の新設を提唱して各々に移籍された⁷⁾。しかし、同年末に *Actinobacteria* 門におけるゲノムベースの分類の再編⁸⁾が行われ、これらの 4 属の細菌はすべて 2019 年に再度 *Mycobacterium* 属へ戻された⁹⁾。

Gupta らは、全ゲノム配列の比較による新種の確立や既存種を再分類するための科学的根拠に基づいて、これら新属名を提唱したが、臨床的あるいは実用的な観点からは、*Mycobacterium* 属菌の分類学上の呼称を変更することに異議を唱えた論文¹⁰⁾も発刊された。すなわち、属名変更の問題として、要約すると以下の 3 点を指摘している。①ヒトの疾患との関連性や治療法について特徴づけられている NTM の菌名変更は、臨床医に大きな混乱を招くだけでなく、患者の治療に関してもほとんど何の利益ももたらさない。②逆に、単一の属、既存の菌名を使用することで、臨床検査技師や臨床医が同定法や

疾患を持つ患者を評価するための標準的な方法を維持することができる。③単一属の使用を継続することは、教育的、財政的に貴重な資源を節約することができる。例えば、微生物検査室の標準操作手順や検査アルゴリズムの全面的な見直しと変更、検査室の電子情報システムの再構築、臨床検査技師や臨床医のトレーニングなどが必要となる。

新たな属名や菌種が提案・記載された後に、再度、元の属名や菌名に戻ることがあると確かに臨床現場や検査室のデータベース変更等で混乱をまねくことから、現在 CLSI が作成している新たなドキュメント M64: Taxonomy Changes (分類の変更) では、IJSEM 誌で新種や再編等が発表された後、1~2 年間は変更までの待機・準備期間に当てて、2~3 年後に実際に変更を行い、その後 1 年間で教育・啓蒙を実施することを推奨している。

3. *Mycobacterium abscessus* の分類と特徴 (図 5; 現在 3 亜種)

M. abscessus は Runyon 分類の IV 群菌、迅速発育菌 (1 週間以内に集落形成) である。1992 年に *M. cheilonae* subsp. *abscessus* から独立した菌種で種形容語の *abscessus* は膿瘍 abscess から分離されたことに由来する。現在、3 亜種; *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* が記載されている¹¹⁾。水、土壌から多く検出され、外傷に随伴した皮膚・軟部組織感染症が多

く報告されていたが、近年、肺感染症例が増加している¹²⁾。本邦では肺NTM症でMAC、*M. kansasii*に次いで第3位の頻度を占めている（欧米ではMAC症に次いで第2位）。肺*M. abscessus*症は中年以降の特に基礎疾患のない非喫煙女性に多い。一般的な治療は、キードラックであるCAMの内服とAMKとIPM/CSの点滴で行う（限局性病変であれば外科切除術も適用される）。ただし、亜種によって、マクロライド系薬による治療反応性が異なる。すなわち、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*はマクロライド系薬に対して誘導耐遺伝子 *erm* (41) を持っているのに対し、*M. abscessus* subsp. *massiliense*では *erm* (41) 遺伝子が機能していないので、両者の薬剤感受性が大きく異なるためである。したがって、*M. abscessus* 菌株の同定は亜種までの確定が治療予後の判定に重要であるが、*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* であっても *erm* (41) のプロモーターに点変異 (T28C) がある場合はマクロライド系薬に感性を示すことから、薬剤感受性試験の実施が重要であることに変わりはない¹³⁾。なお、

M. abscessus subsp. *bolletii*は誘導耐遺伝子 *erm* (41) を持っているが、本邦における分離は極めて稀である¹³⁾。

4. *M. intracellulare* の分類変遷 (図6；現在2亜種)

2013年に記載された“*M. yongonense*”はこの非結核性抗酸菌は、韓国の肺疾患患者から初めて培養され、当初は1つの特定の株から得られたいくつかのハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づいて、*M. intracellulare*とは別種であると報告¹⁴⁾された。その後、2018年にCastejonら¹⁵⁾が全ゲノム配列の解析を行い、*M. intracellulare*とANI値97%、DDH値70%であったことから、“*M. yongonense*”は*M. intracellulare*の亜種として位置づけられた。その後、Nouiouiら⁸⁾による分類学的なゲノムベースの解析では、*M. intracellulare* subsp. *yongonense*は*M. intracellulare* subsp. *chimaera*と同一亜種であることが示され、発表年の関係から*M. intracellulare* subsp. *chimaera*の亜種名が優先された¹⁶⁾。

*M. intracellulare*と*M. chimaera*は後述の質量分

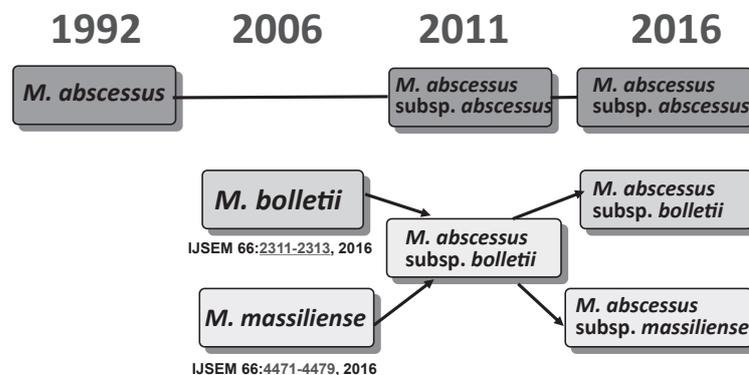


図5 *M. abscessus* の分類変遷

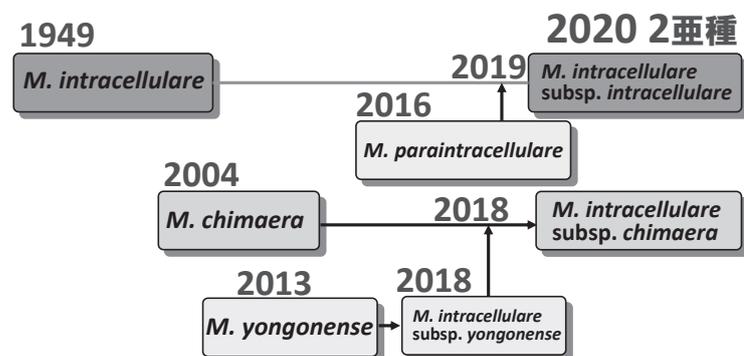


図6 *M. intracellulare* の分類変遷

析法による同定では鑑別できなかったため、*M. chi-maera*/*M. intracellulare* と報告されていた。今後は、両菌種が亜種レベルになったことから、両亜種を鑑別できなくても、単に *M. intracellulare* と同定・報告できるようになる。

5. *Mycobacterium kansasii* complex の構成菌種 (図7；現在7菌種)

M. kansasii はこれまでに *hsp65* 遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) 分析に基づいて7つの近縁の亜型に分類されてきたが、これらは表現型の特徴や従来の生化学的検査では実質的に区別することができなかった。*M. kansasii* のサブタイプ間の ANI 値は 88.4 ~ 94.2% であり、95 ~ 96% のカットオフ値よりも低いので、これらのサブタイプは異なる種である¹⁷⁾。サブタイプ1と2は、臨床疾患との関連が最も多く、サブタイプの中で最も病原性が高いと推定されている。サブタイプ3、4、5、6は患者から分離されることがなく、比較的非病原性であると考えられている。サブタイプ7はこれまでに1つの分離株しか報告されていないため、その病原性や臨床疾患は不明である。これらの7つのサブタイプに加えて、*M. gastri* と *M. persicum* の2つの近縁種が報告されており、これらを合わせて *M. kansasii* complex を形成している¹⁸⁾。

サブタイプ2は2017年に記載された *M. persicum* と 99.77% の ANI を共有していたことが判明したので、*M. persicum* に変更されることが示唆された¹⁸⁾。2018年には、サブタイプ3、4、5が各々、*M. pseudokansasii*、*M. innocens*、*M. attenuatum* と命名さ

れた¹⁷⁾。

以上のように、比較的非病原性であると考えられていたサブタイプが別々の種に命名されたことによって、最も病原性の高いサブタイプ1である *M. kansasii* を同定することが容易となる。菌種と病態との関係性が明確となって、よりよい治療方針の決定に結びつけることができるようになるであろう。

IV. 抗酸菌分類の今後の展開

今日では、ゲノムを比較するために、信頼性が高く客観的な計算技術が Web でも利用可能である。先述のように、ANI や GGD を用いることで DDH と同等のレベルで菌種の異同を判定できるようになった。実際、*Mycobacterium* 属菌株のゲノムを解析した結果、同一菌種と思われる種や亜種が多数存在することが報告¹⁹⁾されている。今後、菌種や亜種の変更と再編が実施される可能性の高い菌種 (菌群) をいくつかご紹介したい (表4)。

M. fortuitum には *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* と *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* の2つの亜種が単一の分類群への融合が示唆されている。したがって、*M. fortuitum* という菌種には、もはや亜種が含まれない可能性が高い。

M. avium には、*M. avium* subsp. *avium*、*M. avium* subsp. *paratuberculosis*、*M. avium* subsp. *silvaticum* の3つの亜種がある²⁰⁾ (図8)。なお、Mijsら²¹⁾が提唱した第4の亜種 "*M. avium* subsp. *hominissus*" も記載されているが、命名規約上の正式な位置づけはない。上記のすべての亜種は、ANI と GGD

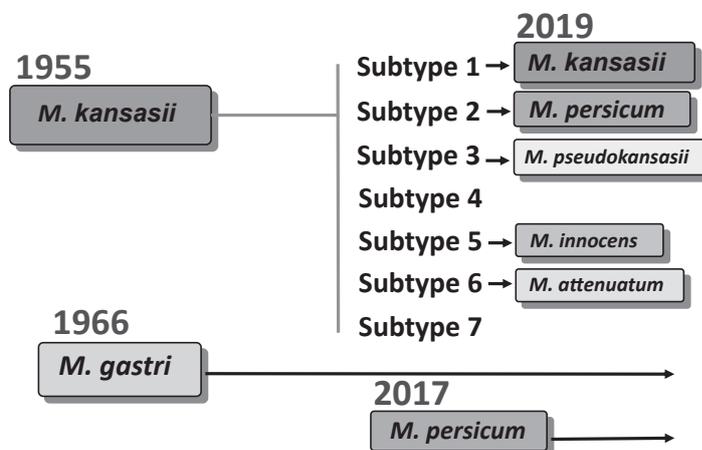


図7 *M. kansasii* complex の分類変遷

表 4 菌名や亜種名が変更・再編される可能性がある抗酸菌

Taxon A	Taxon B	ANI% ^a	GGD% ^b
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	97.40	77.30
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	97.23	75.40
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	97.16	75.50
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>bovis</i>	95.63	64.40
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>bovis</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>gwanakae</i>	98.39	87.10
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>gwanakae</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	95.94	66.30
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	98.99	88.40
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	" <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> "	99.13	93.70
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	" <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> "	98.79	89.20
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	98.67	87.30
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	" <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> "	99.19	93.40
<i>M. lepraemurium</i>	" <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> "	97.27	74.60
<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	97.08	72.80
<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	97.08	73.20
<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	97.03	73.00
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	98.67	87.80
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	99.92	99.30
<i>M. kyogaense</i>	<i>M. obuense</i>	96.19	68.10

Taxon A	Taxon B	ANI% ^a	GGD% ^b
<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i>	<i>M. paraintracellulare</i>	98.71	89.90
<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>yongonense</i>	97.81	81.90
<i>M. paraintracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i>	97.61	79.20
<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>yongonense</i>	<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i>	97.57	78.10
<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i>	97.57	78.70
<i>M. paraintracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>yongonense</i>	97.63	78.60
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. vanbaalenii</i>	98.71	88.80
<i>M. conceptionense</i>	<i>M. senegalense</i>	99.36	90.70
<i>M. senegalense</i>	<i>M. farcinogenes</i>	98.34	85.10
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. conceptionense</i>	98.35	85.40
<i>M. crocinum</i>	<i>M. pallens</i>	98.36	81.90
<i>M. crocinum</i>	<i>M. aromaticivorans</i>	86.00	32.00
<i>M. pallens</i>	<i>M. aromaticivorans</i>	96.54	78.00
<i>M. eburneum</i>	<i>M. talmoniae</i>	99.73	100
<i>M. hiberniae</i>	<i>M. engbaekii</i>	95.12	60.60
<i>M. marinum</i>	<i>M. pseudoshottsii</i>	98.21	81.90
<i>M. pseudoshottsii</i>	<i>M. ulcerans</i>	99.07	89.90
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i>	98.03	80.70

^a ANI <95% diverse species; ≥96% synonymous species; ≥98% synonymous subspecies.

^b GGD <70% diverse species; ≥70%: synonymous species; ≥80% synonymous subspecies.

文献19)より転載、一部改変

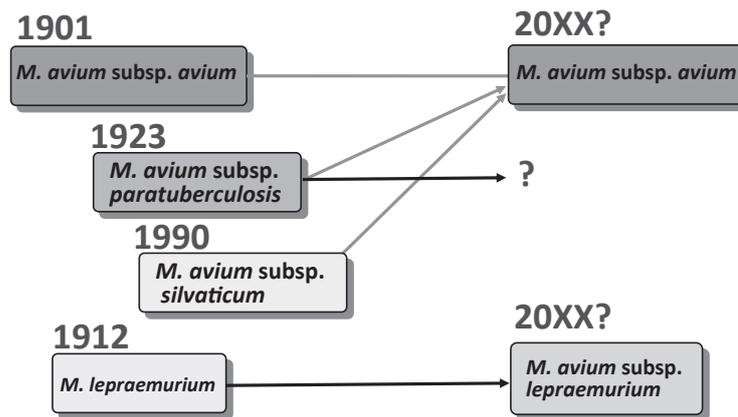


図 8 *M. avium* の亜種と今後の展開

の値が非常に高く、亜種の基準値をはるかに超えていることが特徴である。このことから、これらの亜種は一つの分類群に統合されるであろう。さらに、以前は *M. leprae* に近縁であると考えられていた培養不可能な種 *M. lepraemurium* が *M. avium* との驚くべき類似性が明らかになった²²⁾。さらに、*M. lepraemurium* が *M. avium* の亜種として再分類されることを示唆されている。したがって、*M. avium* は今後、2つの亜種 *M. avium* subsp. *avium* と *M. avium* subsp. *lepraemurium* に再編される可能性がある。一方、*M. M. avium* subsp. *paratuberculosis* については、疫学、病原性、進化等で他の亜種と大きく異なるので、例外的に亜種の地位を維持する可能性

もある¹⁹⁾。

M. vanbaalenii (2002年記載) と *M. austroafricanum* (1983年記載) は同じ菌種を支持する ANI 値と GGD 値であり、記載された年の早い *M. austroafricanum* の菌名が優先される。

M. conceptionense、*M. farcinogenes*、*M. senegalense* はお互いに ANI 値と GGD 値から同一菌種の可能性がある。

M. talmoniae (IJSEM, 2017年8号 pp. 2640-2645) と *M. eburneum* (IJSEM, 2017年9号 pp. 3174-3181) は実質的に同じ菌種である。興味深いことに、*M. eburneum* は迅速発育菌(7日)、*M. talmoniae* は遅発育菌(7~10日)と記載されていた。両菌種は同

一年に記載されているが、IJSEM 誌に掲載のページ数が早い（掲載号の早い）*M. talmoniae* が優先される。

M. marinum、*M. ulcerans*、*M. pseudoshottsii* の3菌種はANI 値とGGD 値からは明らかに同一菌種である。しかしながら、*M. marinum* と *M. ulcerans* とは感染症の背景や臨床像が全く異なるため、これらの分類群を1つの種に統合することは、臨床医にとって大きな混乱の原因となる。このケースでは変更が推奨されないであろう¹⁹⁾。

V. 質量分析法による抗酸菌同定

1. 質量分析法の原理

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOF MS) による微生物の新しい同定法が実用化されている。病原体に由来したタンパク質成分の分子量情報 (マススペクトル) のパターンから、わずか10分足らずで分離菌株の同定ができるようになった。MALDI-TOF MS は一般細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定も実施できることが大きな利点である²³⁾。さらに、血液培養陽性時の培養液から直接の菌種同定も臨床的な有用性が高い。

質量分析法による菌株の同定は3つのステップからなる。①菌体とマトリックス試薬を混ぜて乾燥させる、②MALDI-TOF MS でマススペクトルを取得する、そして③そのマススペクトルをデータベースに照合してパターンマッチングを行う。一般の細菌は新鮮な集落を直接サンプルプレートに載せて解析を行うが、抗酸菌では菌体からタンパク質を抽出する操作 (ギ酸溶液を使用して約50分) が必要である (図9)。マトリックス試薬を滴下して乾燥する時間を含めて、約60分で同定結果が得られる。1検体あたりのランニングコストは20~50円ほどである。なお、測定機器・システムは2社から販売されており、定価はMALDI Biotyper (ブルカー・ダルトニクス社) が2,800万円、VITEK MS (バイオメリュース社) は2,980万円と公開されている。

2. 質量分析法による抗酸菌同定

MALDI-TOF MS を用いて実際に *M. avium* と *M. intracellulare* 菌体のタンパクをそのまま飛ばしたマススペクトルのパターンを図10に示す。いわば、この波形が *M. avium* や *M. intracellulare* の「指紋」のようなものである。どの分子量にどのくらいの強度でピークが観察されるか、またそのピークのパターンがどの菌種のマススペクトルのパターンと一致しているか (指紋の照合のイメージ) が同定のポ

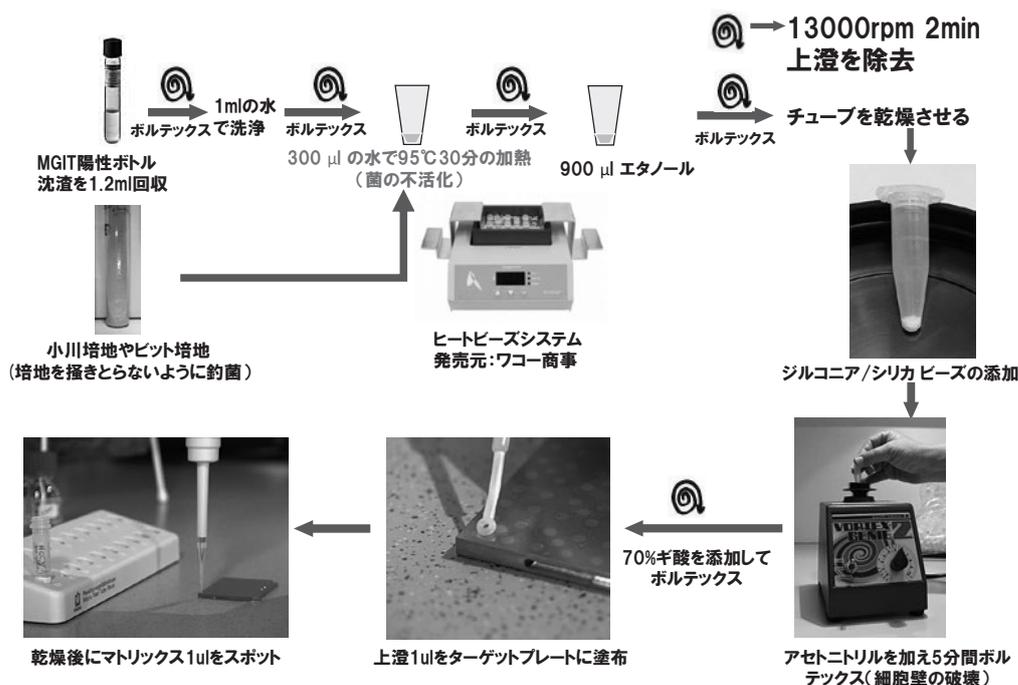


図9 抗酸菌同定のための前処理法

イントである。

1) MALDI Biotyper を用いた抗酸菌同定の実際

MALDI Biotyper は、同定したい菌株がこのデータベースのどの菌株（菌種）と近縁であるかをスコア値で表現し、このスコア値が高い順に候補の菌種名が表示される（図 11）。スコア値が 2.0 以上であれば菌種レベルで信頼性が高く（緑色：ここではグレイ）、1.7 以上 2.0 未満では属レベル（赤色：こ

は濃いグレイ）での一致と判断される。同じ菌種でも複数の株が登録されているので、株間にパターンが多様性があっても正確な同定が可能とされている。

2021 年 6 月現在、178 菌種（9 亜種）の *Mycobacterium* 属菌がライブラリー（Ver. 6.0）に登録されている（表 5）。注意すべきは、ライブラリーに登録されている菌種すべてを同定できるとは限らない。例えば、図 12 のように同一グループの複数菌まで

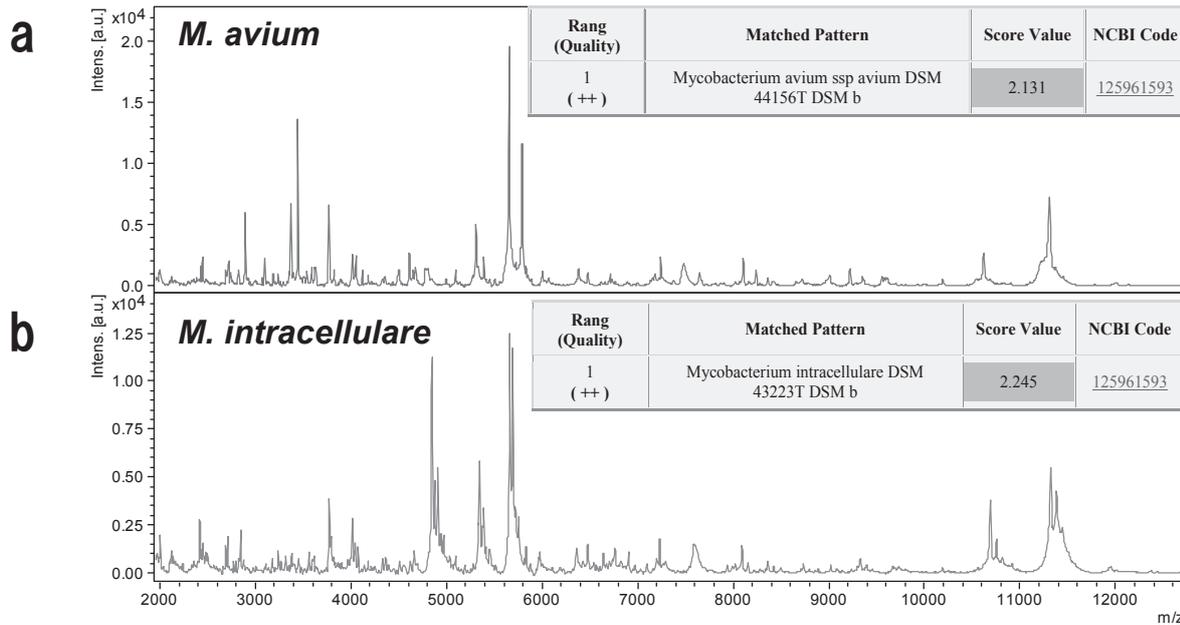


図 10 *M. avium* (a) と *M. intracellulare* (b) のマススペクトル

*M. avium*や*M. intracellulare*のマススペクトル「指紋」を示す。どの分子量にどのくらいの強度でピークが観察されるか、またそのピークのパターンがどの菌種のマススペクトルのパターンと一致しているかが同定のポイントである。

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	<i>Mycobacterium shinjukuense</i> DSM 45663T DSM b MGIT	2.273	126717510
2 (++)	<i>Mycobacterium shinjukuense</i> DSM 45663T DSM b LJ	2.086	126717510
3 (-)	<i>Enterobacter cloacae</i> MB_5277_05 THL	1.336	550
4 (-)	<i>Tsukamurella</i> sp RV_Feb_05 MLD	1.276	2060
5 (-)	<i>Mycobacterium gordonae</i> DSM 44160T DSM b	1.269	126717510
6 (-)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 10942 CHB	1.26	40324
7 (-)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> LDW 03L LDW b)	1.237	126341005
8 (-)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 03L LDW b)	1.237	126717510
9 (-)	<i>Clostridium difficile</i> MB_4499_05 THL	1.231	1496
10 (-)	<i>Lactobacillus agilis</i> DSM 20510 DSM	1.229	1601

図 11 MALDI バイオタイパーによる測定例①

Rank1と2位にスコア値が2.0以上で*Mycobacterium shinjukuense*の2菌株が表示され、以下8菌株はスコア値が低いので本菌種と同定された。

表 5 MBT Mycobacteria Library ver. 6.0 菌種リスト

No.	Species	No.	Species	No.	Species	No.	Species
1	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	42	<i>M. conspicuum</i>	88	<i>M. koreense</i>	134	<i>M. phocaicum</i>
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	43	<i>M. cookii</i>	89	<i>M. kubicae</i>	135	<i>M. porcinum</i>
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	44	<i>M. cosmeticum</i>	90	<i>M. kumamotoense</i>	136	<i>M. poriferae</i>
2	<i>M. africanum</i>	45	<i>M. crocinum</i>	91	<i>M. kyorinense</i>	137	<i>M. pseudoshottsii</i>
3	<i>M. agri</i>	46	<i>M. diernhoferi</i>	92	<i>M. lacus</i>	138	<i>M. psychrotolerans</i>
4	<i>M. aichiense</i>	47	<i>M. doricum</i>	93	<i>M. lehmannii</i>	139	<i>M. pulveris</i>
5	<i>M. algericum</i>	48	<i>M. duvalii</i>	94	<i>M. lentiflavum</i>	140	<i>M. pyrenivorans</i>
6	<i>M. alsense</i>	49	<i>M. eburneum</i>	95	<i>M. litorale</i>	141	<i>M. rhodesiae</i>
7	<i>M. alvei</i>	50	<i>M. elephantis</i>	96	<i>M. llatzerense</i>	142	<i>M. riyadhense</i>
8	<i>M. angelicum</i>	51	<i>M. engbaekii</i>	97	<i>M. longobardum</i>	143	<i>M. rufum</i>
9	<i>M. anyangense</i>	52	<i>M. europaeum</i>	98	<i>M. lutetiense</i>	144	<i>M. rutilum</i>
10	<i>M. aquaticum</i>	53	<i>M. fallax</i>	99	<i>M. madagascariense</i>	145	<i>M. salmophilum</i>
11	<i>M. arabiense</i>	54	<i>M. farcinogenes</i>	100	<i>M. mageritense</i>	146	<i>M. saopaulense</i>
12	<i>M. arcuense</i>	55	<i>M. flavescens</i>	101	<i>M. malmoense</i>	147	<i>M. saraceniae</i>
13	<i>M. aromaticivorans</i>	56	<i>M. florentinum</i>	102	<i>M. mantonii</i>	148	<i>M. saskatchewanense</i>
14	<i>M. arosiense</i>	57	<i>M. fluoranthenivorans</i>	103	<i>M. marinum</i>	149	<i>M. scrofulaceum</i>
15	<i>M. arupense</i>	58	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	104	<i>M. marseillense</i>	150	<i>M. sediminis</i>
			<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>				
16	<i>M. asiaticum</i>	59	<i>M. fragae</i>	105	<i>M. microti</i>	151	<i>M. senegalense</i>
17	<i>M. aubagnense</i>	60	<i>M. franklinii</i>	106	<i>M. minnesotense</i>	152	<i>M. senuense</i>
18	<i>M. aurum</i>	61	<i>M. frederiksbergense</i>	107	<i>M. monacense</i>	153	<i>M. seoulense</i>
19	<i>M. austroafricanum</i>	62	<i>M. gadium</i>	108	<i>M. montefioreense</i>	154	<i>M. septicum</i>
20	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. avium</i> [subsp. <i>hominissuis</i>]	63	<i>M. gastris</i>	109	<i>M. montmartrense</i>	155	<i>M. setense</i>
		64	<i>M. genavense</i>	110	<i>M. morioakaense</i>	156	<i>M. sherrisii</i>
		65	<i>M. gilvum</i>	111	<i>M. mucogenicum</i>	157	<i>M. shimoides</i>
		66	<i>M. goodii</i>	112	<i>M. murale</i>	158	<i>M. shinjukuense</i>
21	<i>M. bacteremicum</i>	67	<i>M. gordonae</i>	113	<i>M. nebraskense</i>	159	<i>M. simiae</i>
22	<i>M. boenickei</i>	68	<i>M. grossiae</i>	114	<i>M. neoaurum</i>	160	<i>M. smegmatis</i>
23	<i>M. bohemicum</i>	69	<i>M. haemophilum</i>	115	<i>M. neumannii</i>	161	<i>M. sphagni</i>
24	<i>M. botniense</i>	70	<i>M. hassiacum</i>	116	<i>M. neworleansense</i>	162	<i>M. stephanolepidis</i>
25	<i>M. bovis</i>	71	<i>M. heckeshornense</i>	117	<i>M. nonchromogenicum</i>	163	<i>M. stomatepiae</i>
26	<i>M. bourgelatii</i>	72	<i>M. heidelbergense</i>	118	<i>M. noviomagense</i>	164	<i>M. szulgai</i>
27	<i>M. branderi</i>	73	<i>M. helvum</i>	119	<i>M. novocastrense</i>	165	<i>M. talmoniae</i>
28	<i>M. brisbanense</i>	74	<i>M. heraklionense</i>	120	<i>M. obuense</i>	166	<i>M. terrae</i>
29	<i>M. brumae</i>	75	<i>M. hiberniae</i>	121	<i>M. pallens</i>	167	<i>M. thermoresistibile</i>
30	<i>M. canariense</i>	76	<i>M. hippocampi</i>	122	<i>M. palustre</i>	168	<i>M. tokaiense</i>
31	<i>M. caprae</i>	77	<i>M. hodleri</i>	123	<i>M. paraense</i>	169	<i>M. triplex</i>
32	<i>M. celatum</i>	78	<i>M. holsaticum</i>	124	<i>M. paraffinicum</i>	170	<i>M. triviale</i>
33	<i>M. celeriflavum</i>	79	<i>M. houstonense</i>	125	<i>M. parafortuitum</i>	171	<i>M. tuberculosis</i>
34	<i>M. chelonae</i>	80	<i>M. immunogenum</i>	126	<i>M. paragordonae</i>	172	<i>M. tusciae</i>
35	<i>M. chimaera</i>	81	<i>M. insubricum</i>	127	<i>M. parakoreense</i>	173	<i>M. vaccae</i>
36	<i>M. chitae</i>	82	<i>M. interjectum</i>	128	<i>M. parascrofulaceum</i>	174	<i>M. vanbaalenii</i>
37	<i>M. chlorophenicum</i>	83	<i>M. intermedium</i>	129	<i>M. paraseoulense</i>	175	<i>M. virginense</i>
38	<i>M. chubuense</i>	84	<i>M. intracellulare</i>	130	<i>M. paraterreae</i>	176	<i>M. vulnerans</i>
39	<i>M. colombiense</i>	85	<i>M. iranicum</i>	131	<i>M. parmense</i>	177	<i>M. wolinskyi</i>
40	<i>M. conceptionense</i>	86	<i>M. kansasii</i>	132	<i>M. peregrinum</i>	178	<i>M. xenopi</i>
41	<i>M. confluentis</i>	87	<i>M. komossense</i>	133	<i>M. phlei</i>		

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46622 DSM b + <i>Mycobacterium porcinum</i> DSM 44242T DSM b	2.628	124909396
2 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46622 DSM b + <i>Mycobacterium senegalense</i> DSM 43656T DSM b	2.563	124909396
3 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46623 DSM b + <i>Mycobacterium porcinum</i> DSM 44242T DSM b	2.529	124909396
4 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46623 DSM b + <i>Mycobacterium senegalense</i> DSM 43656T DSM b	2.526	124909396
5 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 43482 DSM b + <i>Mycobacterium senegalense</i> DSM 43656T DSM b	2.473	124909396
6 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 43220 DSM b + <i>Mycobacterium senegalense</i> DSM 43656T DSM b	2.461	124909396
7 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46622 DSM b	2.374	124909396
8 (+++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 43477 DSM b	2.36	124909396
9 (++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 46623 DSM b	2.287	124909396
10 (++)	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp <i>fortuitum</i> DSM 43220 DSM b	2.269	124909396

図 12 MALDI バイオタイパーによる測定例②

M. fortuitum groupの7菌種 (*M. alvei*, *M. farcinogenes*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*) は菌種の鑑別が困難であるため、同一グループの複数菌までの同定にとどまる。

の同定にとどまる場合もある。近縁菌種あるいはコンプレックスに属するために鑑別が困難な菌種のグループを示す(表6)。なお、新たな菌種は随時、ライブラリーに追加されていくので、自施設あるいは同定を依頼した外注検査所がどのバージョンのデータベースを使用しているかに留意しながら、同定結果を解釈することが大切である。

2) VITEC MS を用いた抗酸菌同定の実際

VITEC MS による抗酸菌の同定では「VITEK® MS

抗酸菌／ノカルジア用前処理キット」を使用して菌体から蛋白質を抽出する。この操作は菌の不活化も兼ねている。VITEK® MS では、2021年6月現在、49菌種の *Mycobacterium* 属菌がライブラリー (Ver. 3.0 KB 3.2) に登録されている(表7)。ただし、*M. alvei*, *M. farcinogenes*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense* の7菌種は *M. fortuitum* group として同定されるため、これらの菌種の鑑別は困難である。同じく、結核菌群の

表6 質量分析法で同定が難しい菌種のグループ

1. 系統的に近い菌種 (スコア2.1以上で複数菌の候補)
<i>M. chubuense</i> / <i>M. chlorophenicum</i> / <i>M. psychrotolerans</i>
<i>M. crocinum</i> / <i>M. pallens</i>
<i>M. fortuitum</i> / <i>M. farcinogenes</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M. senegalense</i>
<i>M. gadium</i> / <i>M. tusciae</i>
<i>M. sherrisii</i> / <i>M. simiae</i>
<i>M. lehmannii</i> / <i>M. neumannii</i>
<i>M. arcueilense</i> / <i>M. peregrinum</i>
<i>M. aquaticum</i> / <i>M. brisbanense</i>
2. 系統的に非常に近い菌種 (スコア2.3以上で複数菌の候補)
<i>M. austroafricanum</i> / <i>M. vanballenii</i>
<i>M. canariense</i> / <i>M. cosmeticum</i>
<i>M. murale</i> / <i>M. tokaiense</i>
<i>M. eburneum</i> / <i>M. talmoniae</i>
3. グループまたはコンプレックスに属する菌種 (スコア2.45以上で複数菌の候補)
<i>M. intracellulare</i> subsp. <i>intracellulare</i> / <i>M. intracellulare</i> subsp. <i>chimaera</i>
<i>M. mucogenicum</i> / <i>M. phocaicum</i>

表7 VITEC MS で同定できる菌種一覧

同定菌種名 (グループ)	菌種名	同定菌種名 (グループ)	菌種名
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium agri</i>	<i>Mycobacterium agri</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium arupense</i>	<i>Mycobacterium arupense</i>	<i>Mycobacterium kubicae</i>	<i>Mycobacterium kubicae</i>
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>Mycobacterium aurum</i>	<i>Mycobacterium aurum</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium nebraskense</i>	<i>Mycobacterium nebraskense</i>
<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	<i>Mycobacterium neoaurum</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium paraffinicum</i>	<i>Mycobacterium paraffinicum</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> group	<i>Mycobacterium alvei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
	<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium shimoidei</i>	<i>Mycobacterium shimoidei</i>
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
	<i>Mycobacterium houstonense</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>
	<i>Mycobacterium porcinum</i>	<i>Mycobacterium triplex</i>	<i>Mycobacterium triplex</i>
	<i>Mycobacterium senegalense</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium gastris</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>		
<i>Mycobacterium genavense</i>	" <i>Mycobacterium canettii</i> "		
<i>Mycobacterium goodii</i>	<i>Mycobacterium microti</i>		
<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>

5菌種も *M. tuberculosis* complex と同定される。従って、VITEC MS では *Mycobacterium* 属の 39 菌種が同定可能である。

VI. 遺伝子解析法による抗酸菌同定

1. ブロード・レンジ PCR とシーケンス解析による菌種同定の実際

菌株あるいは臨床検体から抽出した DNA の鋳型として、細菌に共通な 16S rRNA 遺伝子の領域を PCR で増幅する (図 13)。1組のプライマー (8UA と 1485B) でどのような細菌でも共通に検出できることが最大の利点で「ブロード・レンジ」という名前の由来でもある。アガロース電気泳動法で DNA が増えたことを確認して、増幅産物だけに精製した後、シーケンス反応を行い、シーケンサーで配列を解読する。この約 1,500 bp の配列を、データベースに登録されている菌種の配列との相同性を比較・検討する。類似度が 98.7% 以上の菌種が 1 つしかない場合はその菌種の可能性が高い。従来は 16S rRNA 遺伝子配列の類似度 97% が境界線であった²⁴⁾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²⁵⁾。なお、類似度の比較の対象は必ず「基準株」の配列であることに注意すべきである。

ここで、「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検査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) とはまった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、その株がかならずしも基準株とは限らないことである。繰り返しになるが、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性に基づいた菌種の同定では、比較の対象は必ず「基準株」の配列を用いることに留意すべきである。

2. 16S rRNA 塩基配列の相同性解析による同定の限界

一般的には 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性を決定すれば、非結核性抗酸菌の同定が可能である。しかし、16S rRNA 遺伝子の塩基配列だけでは、相同性の高い 2 菌種あるいは 3 菌種が候補となり、その値の違いが僅かなために菌種レベルまでの正確な同定が困難な場合がある。たとえば、*M. kansasii* と *M. gastri*、*M. mucogenicum* と *M. phocaicum* の各々は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 100% 一致しており、どちらの種であるか識別できない。また、*M. marinum* と *M. ulcerans*、*M. intracellulare* と *M. chimaere*、*M. porcinum* と *M. neworleansense* では

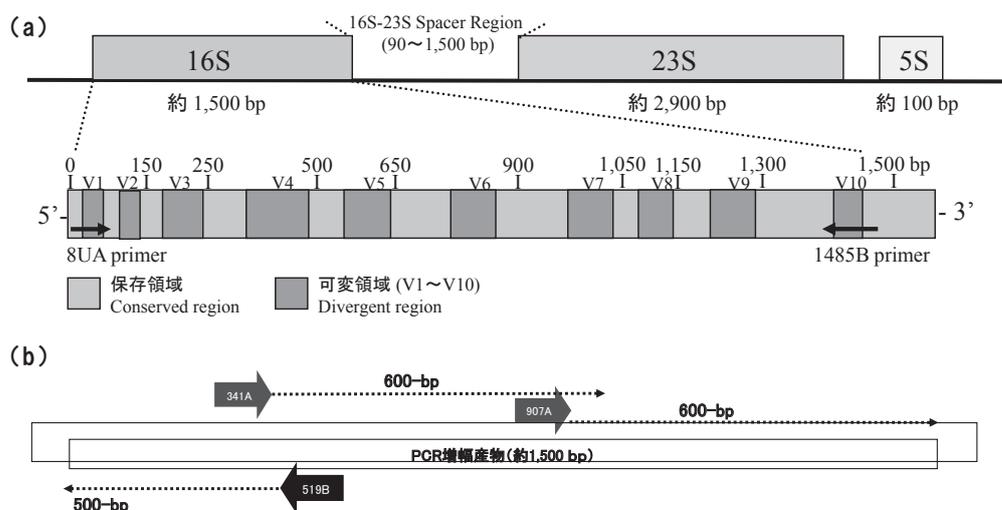


図 13 細菌のリボソームの構造と 16S rRNA 遺伝子の解析用プライマーの位置と配列

細菌のリボソームRNA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。

表8 抗酸菌の菌種間におけるハウスキーピング遺伝子塩基配列の相同性比較

菌種グループ	相同性 (%)			
	16S rDNA	<i>dnaJ1</i>	<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>
<i>M. tuberculosis</i> complex	99.9 - 100	99.9 - 100	100	99.7 - 100
<i>M. kansasii</i> - <i>M. gastri</i>	100	95.5	94.4	97.7
<i>M. marinum</i> - <i>M. ulcerans</i>	99.9	98.8	99.3	99.4
<i>M. intracellulare</i> - <i>M. chimaera</i>	99.9	98.2	100	99.1
<i>M. szulgai</i> - <i>M. malmoense</i>	99.7	86.4	91.0	93.7
<i>M. mucogenicum</i> - <i>M. phocaicum</i>	100	95.8	98.7	100
<i>M. porcinum</i> - <i>M. neworleansense</i>	99.9	96.0	97.0	96.9

各々で16S rRNA 遺伝子配列の相同性がきわめて高く(99.9%)、お互いを区別することは難しい(表8)。このようなケースではお互いの菌種でDNA配列の違いが多いハウスキーピング遺伝子(*rpoB*、*hsp65*など)の塩基配列を解析して、その相同性を含めて総合的に菌種を同定することになる。

3. *rpoB* や *hsp65* 遺伝子のシーケンス解析の併用

筆者は非結核性抗酸菌を同定する際には、16S rRNA、*rpoB*、*hsp65* 遺伝子を各々増幅後、各塩基配列のシーケンス解析とデータベースによる相同性の検索を実施している。すなわち、これら3つの遺伝子の系統的な位置から総合的に判断して菌種の同定を行うのが理想的である。しかしながら、3つすべての遺伝子を解析することは費用対効果の観点から困難であることもまた事実である。したがって、まずは16S rDNAと*hsp65* 遺伝子の両方の相同性を解析することを勧めたい。つまり、著者の経験では、これらの2つの領域の塩基配列の相同性によって、大半の非定型抗酸菌株を菌種レベルで同定できる。どうしても同定ができない場合には、鑑別すべき菌種に相同性の違いを見い出せる*rpoB*、*dnaJ*、ITS領域のどれかを追加的に解析するとよい。なお、具体的なシーケンス解析とデータベースによる相同性の検索の手順とノウハウは拙著²⁶⁾で紹介しているので参考にされたい。

おわりに

近年、NTMの新菌種が急増しており、2021年9月現在、抗酸菌は、194菌種(13亜種)が記載されている。日常検査におけるNTMの同定では、MALDI-TOF MSを用いた微生物の新しい同定法が実用化されており、外注検査所への同定依頼も可能性が

ある。NTM菌種の同定が正確かつ迅速になってきているので、微生物検査室(外注検査所)との緊密なコミュニケーションによって、起炎菌を迅速に把握して、適切な抗菌薬治療に繋げていただきたい。ただし、MALDI-TOF MSにも技術的な課題があり、系統的に類縁のコンプレックスやグループに属する菌は、菌種レベルとしてスコア値の高い菌種が複数菌存在するので、コンプレックスやグループとして報告されることがある。

今後は、ゲノムの識別力が高まったことで、どの菌種がヒトの疾病に関与しているかについての理解が深まり、その後の病原性や疫学に関する検討が可能になるであろう²⁷⁾。すなわち、新たな菌種が発見されたり、既存の種が細分化されたり、再分類されたりすることで、ヒトの疾患におけるそれぞれの種や亜種の役割についての理解が深まる可能性がある。NTMという大きな枠組みでの病態の把握だけでなく、MALDI-TOF MSや遺伝子解析によって同定された個々の菌種と病態との関係を明らかにして、よりよい治療方針の策定に結びつけていくことが今後の重要な課題である。

文 献

- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; **37**: 463-464.
- Kim M, Oh H, Park S, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 2014; **64**: 346-351.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; **57**: 81-91.

- 4) Meier-Kolthoff JP, Auch, AF, Klenk HP, et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinforma.* 2013; **14**: 60.
- 5) Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2020; **70**: 5607-5612.
- 6) Riojas MA, McGoughet KJ, Rider-Riojas CJ, et al. Phylogenomic Analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; **68**: 324-332.
- 7) Gupta RS, Lo B, Son J. et al. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* 2018; **9**: 67.
- 8) Nouioui I, Carro L, Garcia-Lopez M, et al. Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum *Actinobacteria*. *Front Microbiol.* 2018; **9**: 2007.
- 9) Garrity GM. List of changes in taxonomic opinion no. 29. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019; **69**: 13-32.
- 10) Tortoli E, Brown-Elliott BA, Chalmers JD, et al. Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur Respir J.* 2019; **54**: 1900795.
- 11) Tortoli E, Kohl TA, Brown-Elliott BA, et al. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; **66**: 4471-4479.
- 12) Morimoto K, Hasegawa N, Izumi K, et al. A Laboratory-based analysis of nontuberculous mycobacterial lung disease in Japan from 2012 to 2013. *Ann Am Thorac Soc.* 2017; **14**: 49-56.
- 13) Yoshida S, Tsuyuguchi K, Kobayashi T, et al. Discrepancies between the genotypes and phenotypes of clarithromycin-resistant *Mycobacterium abscessus* complex. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2018; **22**: 413-418.
- 14) Kim BJ, Math RK, Jeon CO, et al. *Mycobacterium yongonense* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species closely related to *Mycobacterium intracellulare*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; **63**: 192-199.
- 15) Castejon M, Menéndez MC, Comas I, et al. Whole-genome sequence analysis of the *Mycobacterium avium* complex and proposal of the transfer of *Mycobacterium yongonense* to *Mycobacterium intracellulare* subsp. *yongonense* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; **68**: 1998-2005.
- 16) Oren A, Garrity GM. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019; **69**: 13-32.
- 17) Tagini F, Aeby S, Bertelli C, et al. Phylogenomics reveal that *Mycobacterium kansasii* subtypes are species-level lineages. Description of *Mycobacterium pseudokansasii* sp. nov., *Mycobacterium innocens* sp. nov. and *Mycobacterium attenuatum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019; **169**: 1696-1704.
- 18) Jagielski T, Borowka P, Bakula Z, et al. Genomic insights into the *Mycobacterium kansasii* complex: an update. *Front Microbiol.* 2020; **10**: 2918.
- 19) Tortoli E, Meehan CJ, Grottola A, et al. Genome-based taxonomic revision detects a number of synonymous taxa in the genus *Mycobacterium*. *Infect. Genet. Evol.* 2019; **75**: 103983.
- 20) Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; **40**, 254-260.
- 21) Mijs W, de Haas P, Rossau R, et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; **52**, 1505-1518.
- 22) Benjak A, Honap TP, Avanzi C, et al. Insights from the genome sequence of *Mycobacterium lepraemurium*: massive gene decay and reductive evolution. *mBio.* 2017; **8**: e01283-17.
- 23) 大楠清文. いま知りたい臨床微生物検査 実践ガイドー 珍しい細菌の同定・遺伝検査・質量分析ー. 医歯薬出版. 2013; 120-135.
- 24) Stackebrandt E, Goebel BM. A place for DNA – DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; **44**: 846-849.
- 25) Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Micobiology Today* 2006: 148-155.
- 26) 大楠清文. いま知りたい臨床微生物検査 実践ガイドー 珍しい細菌の同定・遺伝検査・質量分析ー. 医歯薬出版. 2013; 110-117.
- 27) Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, et al. The rise of non-tuberculous mycobacterial lung disease. *Front Immunol.* 2020; **11**: 303.

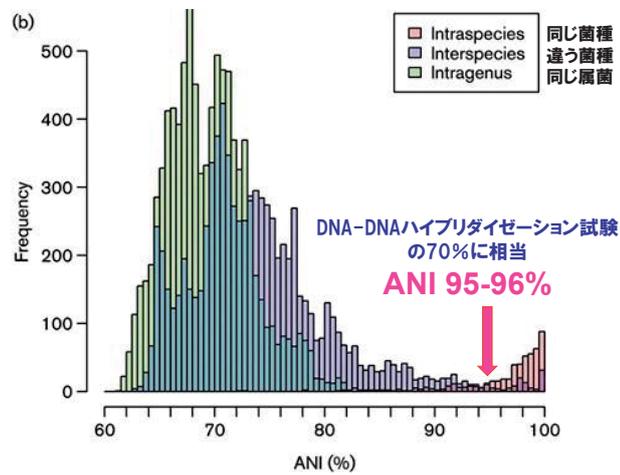


図1 全ゲノム解析に基づいた ANI (%) の分布

種の定義のゴールドスタンダードはDNA/DNAハイブリッド法で測定される70%類似度であるが、これはANIで95~96%に相当する。
(文献2)より転載、一部改変)