

肺パスツレラの細菌分類再編と微生物モニタリング

佐々木啓

順天堂大学スポーツ健康科学部健康学科環境衛生学教室

要 約

肺パスツレラ (旧学名:[*Pasteurella*] *pneumotropica*) は, 2017年6月から新しい属種名が与えられ, 1属8種と2種の genomospecies から構成される *Rodentibacter* 属のうちの2種に再編されることが提案された。これまでの属種名が改められ, 遺伝子データベース上の名称も新学名に移行しつつある。今回新設された *Rodentibacter* 属には, これまで暫定的に命名されていた [*P.*] *pneumotropica* のほかに, 属種名を与えられてなかった Bisgaard Taxon 17, 21, 22, 41 ならびに 48 も同属に入ることになった。今回の再編では, 生化学性状よりも遺伝子配列による相同性が重視されている。

本稿では新設された *Rodentibacter* 属の概要を紹介するとともに, 今後考えられる肺パスツレラの微生物モニタリング時の問題点についても述べたい。

1. げっ歯類を宿主とするパスツレラ科再編の流れ

1) パスツレラ科再編

近年, パスツレラ科に属する菌種の分類再編が相次いで進められている。ヒトの病原体では *Actinobacillus* 属であった侵襲性菌周炎の原因菌が *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* へと属名変更され [10], *Pasteurella* 属であったウシ呼吸器病原菌は *Mannheimia haemolytica* へと属名変更された [10]。また, 属種名が与えられなかった菌群についても新属種名が与えられつつある [4, 5, 7, 10]。遺伝子解析による属や種の区別を行なうことにより, パスツレラ科の多様な種をカバー可能な枠組みを再編する必要が生じたものと考えられる。

2) げっ歯類を宿主とする菌群の再編 (肺パスツレラについては後述)

パスツレラ科のなかでもげっ歯類を宿主とする菌種では, 肺パスツレラに近縁な [*Actinobacillus*] *muris* が長らく暫定的な属名 ([]内の属名は暫定名称を示す) が与えられてきたが, 2015年に *Muribacter muris* への属種名変更が提案された [11]。そのほか, 実験動物にも感染する同じパスツレラ科の Bisgaard Taxon 23, 24 ならびに 25 という名称の菌群には, *Mannheimia caviae*, *Necropsobacter rosorum*, *Mesocricetibacter intestinalis* ならびに *Cricetibacter*

osteomyelitis といった学名がそれぞれ与えられた [4, 5, 7]。

3) 肺パスツレラとは

肺パスツレラは従来 [*Pasteurella*] *pneumotropica* とされてきたマウス, ラット, ハムスターを宿主とするグラム陰性短桿菌で, 生物型 (biotype または biovar) Jawetz ならびに Heyl に分けられる。基準株は [*P.*] *pneumotropica* の生物型 Jawetz に設けられたが, 生物型 Jawetz と Heyl とで生化学性状や 16S rRNA 遺伝子 (rDNA) 配列に違いが見られ, 肺パスツレラ同定の際の混乱の一因となっていた。

実際, 筆者が生物型 Jawetz の基準株と生物型 Heyl の代表株のゲノムを解析した結果によると, 両生物型は同一菌種とはいえない配列を保有していた [13, 14]。

4) 肺パスツレラ分類再編の動き

パスツレラ科の再編についてはコペンハーゲン大学を中心とする研究グループが精力的に行っている。肺パスツレラの再編について筆者が2016年末に研究統括の Henrik Christensen 博士に問い合わせたところ, 内容については伏せながら解析は終了し公表できる段階だと回答だった。2017年, およそ400株の詳細な性状解析から導き出された大規模な分類再編案が発表された [1]。それによると肺パスツレラは属名

表 1 *Rodentibacter* 属菌種の旧名称と主要宿主

菌種	旧名称	主要宿主
<i>R. pneumotropicus</i>	[<i>P.</i>] <i>pneumotropica</i> biotype Jawetz	Mouse
	Bisgaard Taxon 21	Rat
<i>R. heyltii</i>	[<i>P.</i>] <i>pneumotropica</i> biotype Heyl	Mouse
		Rat
		Hamstar
<i>R. rattii</i>	[<i>P.</i>] <i>pneumotropica</i>	Rat
	Bisgaard Taxon 22	Mouse
<i>R. heidelbergensis</i>	<i>Haemophilus</i> ? (一部 V 因子要求性)	Rat
<i>R. trehalosifermentans</i>	<i>Haemophilus</i> ? (V 因子要求性)	Rat
<i>R. rarus</i>	Bisgaard Taxon 17	Rat
<i>R. myodis</i>	Bisgaard Taxon 41	<i>Myodes glareolus</i>
<i>R. mrazii</i>	Bisgaard Taxon 21	<i>Apodemus</i> sp.
<i>R. genomospecies</i> 1	Bisgaard Taxon 48	<i>Apodemus</i> sp.
		Rat
<i>R. genomospecies</i> 2	—	<i>Apodemus</i> sp.
		Mouse
		<i>Myodes glareolus</i>

も種名も全く新しいものが提案された。肺パストツレラは、パストツレラ科のRodent clusterと言われたグループの1属1菌種の構成であったが、パストツレラ科*Rodentibacter*属のなかの2菌種へと移行した。

2. *Rodentibacter* 属の概要

表1にAdhikaryらの論文[1]とBootらの解説[3]を参考に*Rodentibacter*属8菌種と2種のgenomospeciesの旧名称と主要宿主を示した。国内で使われる和名の“肺パストツレラ”または“[*P.*] *pneumotropica*”という実験用げっ歯類の微生物モニタリング対象菌種は、*R. pneumotropicus*ならびに*R. heyltii*の2菌種になった。この2菌種はかつての生物型JawetzならびにHeylに相当し、当初は炭素源利用性で区別できるとされていた[9]が、その後は方法の違いや多様な野生株が続々と分離されたことにもなって一律した結果が得られなくなっていた。しかしながら両生物型は遺伝子配列に違いが見られ、現在では16S rDNA配列の違いや、16S rDNAと23S rDNAのスペーサー領域の塩基配列の違いが見出されている[2]。したがって、これらは今回の再編に則した2菌種を同定できる手段にもなり得ると考えられる。これら*R. pneumotropicus*ならびに*R. heyltii*が、マウス、ラット、ハムスターをおもな宿主としており微生物モニタリングの対象となる所謂“肺パストツレラ”になる。

これら2種と比較的近い性状を持つのがおもにラットを宿主とする*R. rattii*である。この種の中にはBisgaard Taxon 22と過去に[*P.*] *pneumotropica*と同定された菌株が編成されたが、後述する遺伝子配列の相同性を考慮してBootらはこれを微生物モニタリングの対象種と考えていない[3]。*R. rattii*の基準株は、16S rDNA配列で*R. pneumotropicus*の基準株との相同性が96% (*R. heyltii*とは95%の相同性)であることから*R. pneumotropicus*や*R. heyltii*とは線引きがなされ、約98%の相同性を持つ*R. heidelbergensis*基準株の方が近縁種であるとされている[1]。

表1に示す*R. heidelbergensis*以下は、遺伝子配列のほかにも基準株の生化学性状や主要宿主が異なる。後述するが複雑な要素として、*R. heidelbergensis*の一部の菌株はNAD (V因子) 要求性を示すことが記載されている。さらに、*R. trehalosifermentans*にはV因子要求性があるが、ポルフィリンを合成するとも記載されており、V因子要求性は見られても*Haemophilus*属のように常に生育のためにX因子とV因子依存性を示さないものと考えられる。

今回の分類で象徴的なのが2種のgenomospeciesの存在である。*Rodentibacter*属に限らず、近年の細菌分類は遺伝子解析が主軸になっている。*Rodentibacter*属は、宿主の違いと16S rDNAとRNAポリメラーゼβサブユニットをコードする*rpoB*遺伝子の塩基配列の違い、ならびにDNA-DNAハイブリ

表2 *Rodentibacter* 属 3 菌種の生化学性状の違い

	<i>R. pneumotropicus</i>	<i>R. heylii</i>	<i>R. ratti</i>
V 因子要求性	-	-	D [-]
リジンデカルボキシラーゼ	-	D [+]	D [-]
オルニチンデカルボキシラーゼ	D [+]	-	D [+]
インドール	D [+]	D [-]	-
アラビノース	-	-	-
リボース	-	-	-
キシロース	-	-	-
イノシトール	D [(+)]	D [-]	D [-]
マンニトール	-	-	-
ラクトース	-	D [(+)]	D [(+)]

+ : 90% 以上陽性, (+): 遅延陽性, -: 10% 以下が陽性, D: 11-89% が陽性, [] は基準株のデータを示す。

ダイゼーションの結果を参考に菌種が区別された。そのため、今回提案された 8 菌種の基準株と 16S rDNA 配列などと相関性が低い菌株は、「遺伝子配列で分類した菌種」という位置付けで *genomospecies* 1 および 2 と名称が与えられた。げっ歯類を宿主とする *Pasturella* 科は、8 菌種ではまかなえないほど遺伝的多様性が高いものと考えられる。これら *genomospecies* 2 種はマウスやラットからも少数分離されているが、ほとんどは野鼠であるアカネズミ属からの分離である。

3. 肺 *Pasturella* の生化学性状について

表 2 に *R. pneumotropicus*, *R. heylii* および *R. ratti* のおもな生化学性状の違いを示した。ここで注目すべきは、生化学性状として“+”や“-”などの表記のほか、脚注にあるように 11-89% が陽性といった“D”で示される“different strains give different reaction”が使われていることである。さらに“D”と示されていても、基準株の性状 ([] 内に表記) が“-”であることもあり、同一菌種内の菌株間で生化学性状に差が生じている。*R. ratti* では、V 因子要求性のように生育に必須なはずの要素も同一菌種内の株間で異なっている。

表 2 に記載されている生化学性状の差を見ると、リジンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼならびにラクトース利用能を調べれば、3 菌種の中から 1 菌種を特定できる可能性があると思われるが、“+”の表示が必ずしも 100% 陽性ではないため生化学性状結果の判断が難しいところである。*Rodentibacter* 属では、これら 3 菌種に“D”や基準株

性状の“[]”の表記が多用されている。したがって、微生物モニタリング時に菌種を絞り込むための目安に生化学性状は有用であるが、確定的な同定的手段としては信頼性という点で遺伝子解析に劣るのは否めない。その一方で、遺伝子解析で明確にならない場合には生化学性状試験を併せて行うことで高いエビデンスが得られ、重要な補助手段となる。

筆者の個人的経験になるが、過去に同定された肺 *Pasturella* やその近縁種を一度グリセロールやスキムミルクで長期的に超低温保存した後に血液成分を含まない培地で復起させると、同一菌株でも様々な大きさのコロニーが 1 枚のプレート上で形成されることがある。おそらく V 因子要求性に不均一性があるため、衛星現象に類似した様相を示すのだろうと考えている。

4. 再編根拠に基づく肺 *Pasturella* 同定の問題点

最初に個人的な見解を述べてしまいが、従来のモニタリング方法を行なう限り、今回再編された *R. pneumotropicus* と *R. heylii* を見逃すことは先ずないと考えられる。ただ、従来のモニタリング方法はこの 2 菌種以外を捕捉する可能性はある。ここでは、筆者の経験と現在公開されている論文について紹介し、その上で考慮したい点を述べたい。

1) 遺伝子配列の相関性を基にした菌種の同定

これまで DNA-DNA ハイブリダイゼーションが細菌分類では重視されてきたが、今回の *Pasturella* 科再編における菌種判別の最大の根拠は、16S rDNA と *rpoB* 遺伝子配列の相関性である [1]。しかし、98%

と高いしきい値を設定しても同一種判定に不十分であるという報告もある [15]。この再編論文 [1] と遺伝子配列データが公開された後に、筆者はワーキング用としてすぐに起こすことができる 12 株だけを簡易的に調べてみた。これらの菌株は、既に複数の PCR 法で肺パスツレラであることを確認している菌株であったが、16S rDNA 塩基解析による種レベルの同定方法 [15] に基づき相同性のみで判定したところ、2 株が *R. pneumotropica* や *R. heylii* と判定できなかった。では *Rodentibacter* 属の他菌種かということ、他菌種の基準株とも相同性が低いので、*Rodentibacter* sp. と同定せざるを得なかった。また、*rpoB* 遺伝子配列の短い領域 (520 bp) [6] を対象に相同性を比較したところ、95% 以上の相同性が確保されるのは 6 株だった。

肺パスツレラ再編データ [1] をもとに菌種同定を行って上記の筆者と同じような状況に陥った海外の事例が、2019 年早々、J Am Assoc Lab Anim Sci のオンライン版アブストラクトとして公開された [8]。遺伝子配列の相同性と、商用モニタリングセンターによる PCR の結果が一致しなかったという事例であり、著者らは PCR に用いるプライマー配列を明記することを提案している。今後、このような報告が多く出てくると予想される。

2) 再編された肺パスツレラの同定にあたって

肺パスツレラを疑う菌の 16S rDNA 全長解析で基準株と BLAST 解析で 99% 以上の相同性があれば肺パスツレラ (*R. pneumotropicus* あるいは *R. heylii*) であると判断できるだろう。菌種によってはマルチコピー rDNA の変異で同一菌株でも 1% を超える差が生じる菌種も存在する [12] が、筆者が調べた限り、肺パスツレラの場合は多くても数塩基変異なので 1% 程度の相同性の違いであれば同種と判断できる可能性は高い。その一方で、基準株の 16S rDNA 全長配列との相同性が 95–98% の場合に被験菌が肺パスツレラ (*R. pneumotropicus* あるいは *R. heylii*) ではないとは結論できないと考えている。もし相同性が低い場合に“肺パスツレラ”ではないとするのであれば、16S rDNA 全長の塩基配列解析のほかに *rpoB* 遺伝子の塩基配列解析、複数のプライマーセットを用いた PCR 結果、生化学性状試験結果、動物の健康状態などを総合して判断する必要があると考えている。同時に、前述の Dafni ら [8] のような事例を公表し、常に同定方法に改良を加えていく必要があるだろう。

参考文献

1. Adhikary S, Nicklas W, Bisgaard M, Boot R, Kuhnert P, Waberschek T, Aalbæk B, Korczak B, Christensen H. *Rodentibacter* gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter rattii* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. 67: 1793–1806.
2. Benga L, Benten WP, Engelhardt E, Bleich A, Gougoula C, Sager M. Development of a multiplex PCR assay based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection and identification of rodent *Pasteurellaceae*. J. Microbiol. Methods. 2013. 95: 256–261.
3. Boot R, Nicklas W, Christensen H. Revised taxonomy and nomenclature of rodent *Pasteurellaceae*: Implications for monitoring. Lab. Anim. 2018. 52: 300–303.
4. Christensen H, Bojesen AM, Bisgaard M. *Mannheimia caviae* sp. nov., isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. 61: 1699–1704.
5. Christensen H, Korczak BM, Bojesen AM, Kuhnert P, Frederiksen W, Bisgaard M. Classification of organisms previously reported as the SP and Stewart-Letscher groups, with descriptions of *Necropsobacter* gen. nov. and of *Necropsobacter rosorum* sp. nov. for organisms of the SP group. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. 61: 1829–1836.
6. Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. 54: 1601–1609.
7. Christensen H, Nicklas W, Bisgaard M. Investigation of taxa of the family *Pasteurellaceae* isolated from Syrian and European hamsters and proposal of *Mesocricetibacter intestinalis* gen. nov., sp. nov. and *Cricetibacter osteomyelitis* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. 64: 3636–3643.
8. Dafni H, Greenfeld L, Oren R, Harmalin A. The Likelihood of misidentifying rodent *Pasteurellaceae* by using results from a single PCR assay. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2019. doi: 10.30802/AALAS-JAA-LAS-18-000049.

9. Heyl JG. A study of *Pasteurella* strains from animal sources. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1963. 29: 79–83.
10. Kuhnert P, Christensen H. 2008. *Pasteurellaceae*: biology, genomics and molecular aspects. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
11. Nicklas W, Bisgaard M, Aalbæk B, Kuhnert P, Christensen H. Reclassification of *Actinobacillus muris* as *Muribacter muris* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. 65: 3344–3351.
12. Onyenwoke RU, Lee YJ, Dabrowski S, Ahring BK, Wiegel J. Reclassification of *Thermoanaerobium acetigenum* as *Caldicellulosiruptor acetigenus* comb. nov. and emendation of the genus description. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. 56: 1391–1395.
13. Sasaki H, Ishikawa H, Asano R, Ueshiba H, Matsumoto T, Boot R, Kawamoto E. Draft genome sequence of the rodent opportunistic pathogen *Pasteurella pneumotropica* ATCC 35149^T. *Genome Announc.* 2014. 2: e00771–14.
14. Sasaki H, Ishikawa H, Terayama H, Asano R, Kawamoto E, Ishibashi H, Boot R. Identification of a virulence determinant that is conserved in the Jawetz and Heyl biotypes of [*Pasteurella*] *pneumotropica*. *Pathog. Dis.* 2016. 74: ftw066.
15. Stackebrandt, E, Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 2006. 33: 152–155.