

博士論文

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法
(MALDI-TOF MS) を応用したウマ由来細菌の同定に関する研究

内田 英里

目次

緒論	4
図	10
第 1 章 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法によるウマ由来細菌の同定精度	12
緒言	12
材料と方法	14
結果	19
考察	20
小括	22
表	23
第 2 章 ウマ由来細菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の問題点	30
緒言	30
材料と方法	32
結果	34
考察	36
小括	39
表	40
図	50

第3章 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により複数の候補が提示されたウマ由来細菌についての検討	54
緒言	54
第1節 ウマ由来 <i>Enterobacter</i> 属菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の問題点	55
緒言	55
材料と方法	57
結果	59
考察	61
第2節 ウマ由来 <i>Actinobacillus</i> 属菌における MALDI-TOF MS を用いた同定法の問題点	63
緒言	63
材料と方法	65
結果	68
考察	70
小括	72
表	73
図	82

第4章 ウマ由来細菌に特化した MALDI-TOF MS を用いた細菌同定用データベース の作成	84
緒言	84
材料と方法	85
結果	87
考察	88
小括	91
表	92
図	98
総括	99
謝辞	106
参考文献	107

緒論

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS) は、被験物質にレーザーを照射してイオン化させ、イオンの飛行速度から構成物質の質量を計測する分析法である。検出された構成物質は分子ごとに表中の波形として表され、この波形パターンはマススペクトルと呼ばれる (図 I-1)。MALDI-TOF MS の特徴は、レーザー照射前に被験物質に「マトリックス」と呼ばれる試薬を添加することである。この MALDI-TOF MS の技術は、2002 年にノーベル賞を受賞した田中耕一氏の発見である、「生体高分子の質量分析法のための脱離イオン化法」を基にしている (Ohkusu, 2012; Tanaka et al., 1987)。従来の質量分析法では、レーザー熱により分子が分解し、実際の分子量を正確に測定できなかった。一方、MALDI-TOF MS では、レーザーを吸収して検体のイオン化を促進する物質 (マトリックス) を介在させることにより、レーザーによる被験物質の破壊を防ぎながら、質量を測定することが可能となった (Komatsu, 2016)。マトリックスには、コバルト (田中 et al., 1987) やグリセリン (Yoshida et al., 1988) をはじめとした様々な物質が使用される。中でも、1990 年代前半に開発された α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid) はより少ない光量で被験物質をイオン化させることが可能であり (Beavis et al., 1992)、ペプチドや微生物の測定に最もよく用いられる「標準マトリックス」として知られている。

MALDI-TOF MS の技術は、細菌同定法にも応用されている。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、細菌種ごとに異なる構成タンパク質 (このうち 50~70% はリボソーム由来のタンパク質) の測定により得られる波形パターンを、参照データベースと照合することで

菌種を同定する (Lay, 2001; Sekiguchi, 2015)。被験細菌株から MALDI-TOF MS により得た波形パターンについて、参照データベース内から最も近似したパターンをもつ細菌種が選出され、被験細菌株はその選出された菌種と同定される (図 I-2)。日本では 2011 年からヒト医療における臨床微生物同定で本手法が使用されるようになり (Ohkusu, 2012)、近年では複数の細菌同定用機器が市販されている。

細菌種の同定は、古典的にはコロニーの形態やグラム染色像の観察に始まり、分離培地を用いて栄養要求性を調べる方法や、糖やアミノ酸の分解性状などの生化学的性状を分析する方法が一般的に行われるようになった (賀来, 1986)。1970~80 年代に PCR 法やシーケンスの技術が開発されてからは、遺伝学的に菌種を同定する方法が発達した。特に、16S rRNA 遺伝子系統解析による菌種同定法が一般的に用いられている (Clarridge, 2004)。16S rRNA 遺伝子は真正細菌および古細菌のリボソームをコードする遺伝子で、多様な細菌が安定的に保有している上、可変領域を含んでいる (Hiraishi, 1995)。16S rRNA 遺伝子系統解析では、この 16S rRNA 遺伝子をシーケンスし、既知の細菌種と比較することで菌種を同定する。16S rRNA 遺伝子系統解析を行うことで多くの細菌種を菌種まで同定することが可能であるが、一部の細菌種については追加の遺伝学的検討や生化学性状試験の併用など、追加試験が求められる (CLSI, 2008)。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、細菌を構成するタンパク質のパターンから菌種を同定する、これまでの同定法とは全く異なる手法である。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、培養困難菌や発育に時間を要する細菌の同定には向かないが、それ以外の細菌に関しては同定の正確性についての評価が高い (Benagli et al., 2011; van Prehn et al., 2016)。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法による同定結果は 16S rRNA 遺伝子系統解析と高い相同性を示すことが報告されており (Marko et al., 2012)、グラム陽性菌の 90%以上 (Rychert et al., 2013)、グラム陰性菌の 90%程度 (Marko et al.,

2012)の細菌株を正確に同定可能である。また、生化学的な手法では同定困難であった菌株についても、MALDI-TOF MS では同定が可能であったことも報告されている (Bizzini et al., 2011)。一方、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法においても 16S rRNA 遺伝子系統解析と同様に、一部の細菌種については生化学的性状試験や血清型別といった追加試験が必要になることが指摘されている (Komatsu, 2016)。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、迅速かつ簡便な手法であることについても高く評価されている。分離培地を用いた同定や生化学的性状試験の試薬が市販されているが、使用するために専門的な知識が必要になる上、細菌の培養に要する時間が数時間から数日必要であり、迅速性において問題が見られる。16S rRNA 遺伝子系統解析による方法は、細菌の DNA 抽出や核酸増幅、増幅産物のシークエンスに専門的な技術や機器が必要となるという点が課題として挙げられる。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法で必要となる基本的な作業は、培地上のコロニーから少量（約 10^5 個）の細菌を掻き取り、専用のプレートに塗布後マトリックスを加えるのみである。MALDI-TOF MS 機器内で細菌のタンパク質パターンを波形として取得し、参照データベースと照合するまでに要する時間は 5 分程度で、分離培地による方法や生化学性状の分析による方法と比較して迅速に菌種を同定することが可能であり、専門的な技術や知識を必要としない (Fenselau & Demirev, 2001; Holland et al., 1996)。ヒト医療では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を導入したことにより、病原細菌の検索に要する時間が短縮されたことや (Tan et al., 2012)、細菌同定検査に費やす人件費が削減されたことが報告されている (Patel et al., 2017)。また、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は導入費用が大きいものの、使用する試薬が少量であるため、ランニングコストが低いことも特徴である。これらのことから、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、迅速・簡便・安価な方法としてヒト医療では既に広く導入されている。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は獣医療においても導入が進められており、動物由来細菌の同定についても有用性が期待されている (Pavlovic et al., 2015; Randall et al., 2015)。家畜（鶏、牛、羊、山羊）由来の細菌分離株については、90%程度が MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により菌種までの同定が可能であったことが報告されている (Randall et al., 2015)。一方で、本手法を用いる市販システムはいずれもヒトの病原細菌および環境由来菌を中心とした参照データベースを使用しており、ヒトの病原細菌や環境由来細菌とは異なる一部の動物由来細菌については、同定ができない可能性が懸念される。実際に、魚類由来の *Aeromonas* 属菌や、ウマやハト、カモノハシ類への病原性が指摘されている *Staphylococcus delphini* の近縁種など、一部の動物由来細菌については MALDI-TOF MS を用いた同定法では同定が困難であることが報告されている (Canver et al., 2019; Pérez-Sancho et al., 2018)。

ウマにおける獣医療では、監視伝染病の診断や日常診療において細菌同定を必要とする機会が多い。例えば、*Salmonella* 属菌や *Clostridioides difficile* (2016 年に *Clostridium difficile* から菌名が変更となった。) は、腸炎の原因菌として知られている (Diab et al., 2013; Murray, 1996)。特に *C. difficile* については日本国内のサラブレッド競走馬において医療関連感染事例が報告されており (Niwa et al., 2013)、慎重な疫学監視が必要である。*Streptococcus equi* subsp. *equi* は腺疫の原因菌であり感染性が高く、日本国内では日高家畜衛生防疫推進協議会の指針により監視の対象となっている。届出伝染病である馬伝染性子宮炎は *Taylorella equigenitalis* が原因となる (Platt et al., 1977)。これらのウマに関する感染症の監視と診断のためには、正確な細菌種の同定が求められる。また、日常診療においては、感染性角膜炎を中心とした眼科疾患症例 (黒田泰輔, 2017) や、蜂窩織炎や術創感染などの外科疾患といった

細菌感染症症例に遭遇することが多い。*Streptococcus equi*の亜種である *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* はウマの扁桃部に常在すると言われているが、孤発性の肺炎の原因ともなりうる(Rasmussen et al., 2013)。ウマ由来細菌の同定においても MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を導入することにより、分離細菌の菌種同定に要する時間が削減されると予想される。このことにより、監視伝染病の早期摘発や、個体診療における原因細菌の特定、抗菌薬の早期選択が可能となり、疫学監視や病態把握ならびに治療法選択に大きく貢献することが期待される。しかし、これらのウマから分離される細菌はヒトの病原細菌とは異なっており、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法が使用可能であるか検討をする必要がある。ウマの感染症原因菌として知られる細菌のうち、*Burkholderia mallei*（鼻疽の原因細菌）と *Burkholderia pseudomallei*（類鼻疽の原因細菌）(Karger et al., 2012)、*S. equi* subsp. *equi* と *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Mani et al., 2017) については既に検討が行われ、それぞれ高い精度で区別が可能であることが示されている。一方、個体診療で重要となる細菌を中心とした多くのウマ由来細菌については、同定の正確性についての情報は乏しい。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の有用性や特徴を検討することは、ウマの獣医療において本手法を実用化する上で有意義であると考えられる。

また、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、使用者の目的に合わせて細菌の情報を追加することで独自のデータベースを構築し、参照データベースとして利用することが可能である。使用者が検討する必要がある細菌種について独自のデータベースを作成することで、既存のデータベースでは同定ができなかった細菌種まで同定ができるようになり、MALDI-TOF MS の同定精度が向上することが報告されている(Veloo et al., 2018)。ウマから分離される細菌種のうち、既存のデータベースでの同定が困難なものについては、独自の

データベースを構築することにより、同定精度の改善が期待される。

本研究は、MALDI-TOF MS をウマ由来細菌の同定に応用することを目的として、まずウマ由来細菌およびウマ環境由来細菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の有用性を確認した。さらに、本手法では同定できなかった細菌株について精査をすることで、本手法の問題点とその解決法を検討した。第 1 章では、ウマ由来細菌およびウマ環境由来細菌株について MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を行い、同定性能を検討した。第 2 章では、本手法では同定できなかった菌株を 16S rRNA 遺伝子系統解析を用いて同定し、本手法では同定できない細菌株の特徴を検討することで、本手法の問題点を考察した。第 3 章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では複数の候補が提示され、同定結果の信頼性に問題が見られた細菌種について、遺伝学的検索等により精査を行ない、本手法の問題点を異なる側面から考察した。第 4 章では、第 1 章から第 3 章で示された本手法の問題点を踏まえ、ウマ由来細菌に特化した参照データベースを作成し、同定精度向上への寄与について検討した。

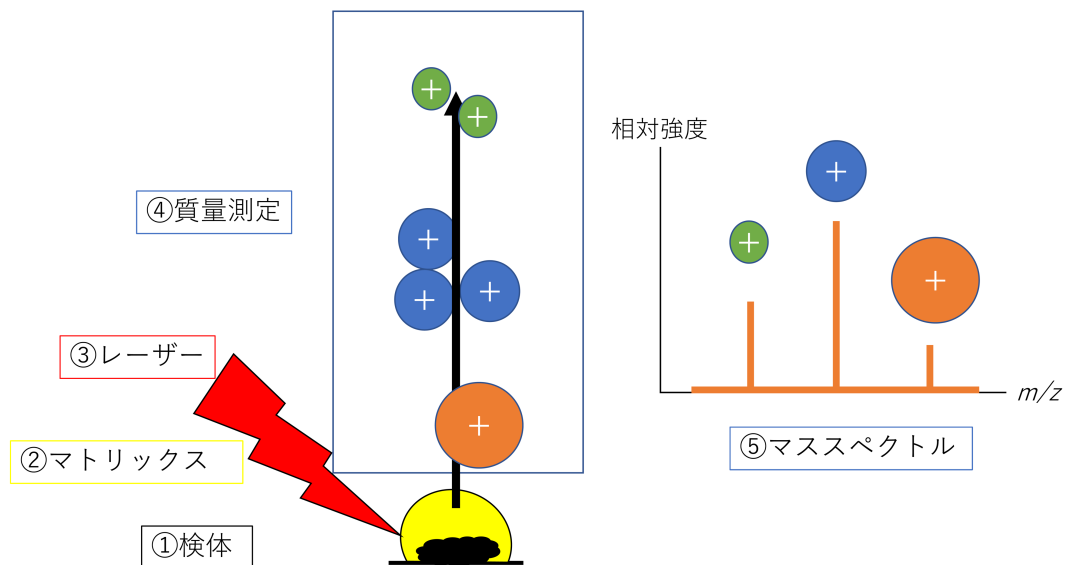


図 I-1 MALDI-TOF MS の原理

MALDI-TOF MS では、検体 (①) にマトリックス (②) を添加したのち、レーザー (③) を照射して物質をイオン化させ、質量を測定する (④)。検出された物質は質量電荷比 (m/z) を x 軸、相対強度を y 軸とする表中で波形として表され、この波形パターンはマススペクトル (⑤) と呼ばれる。

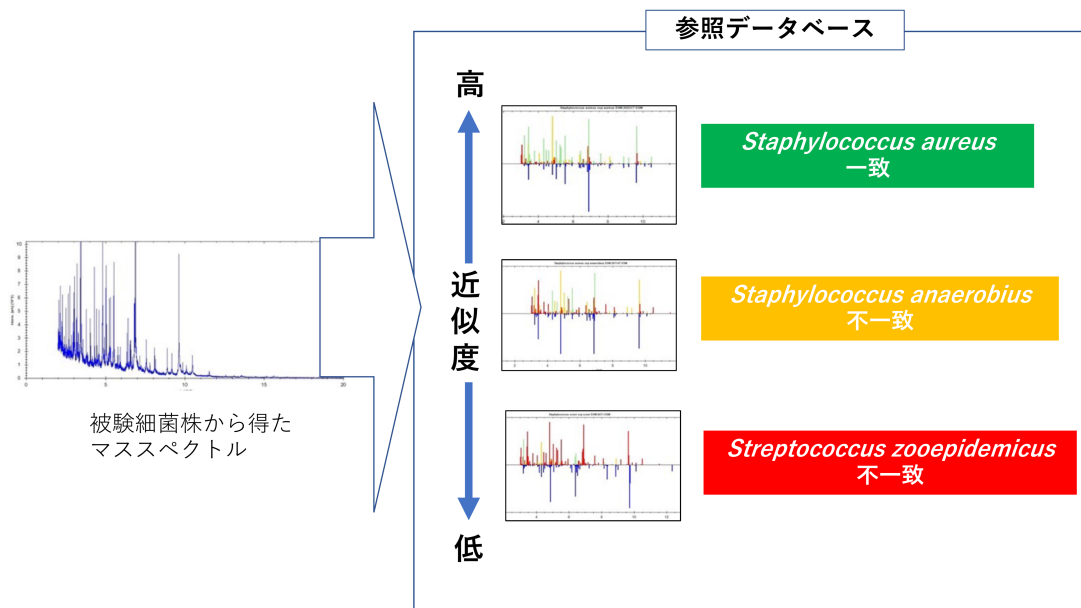


図 I-2 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法のイメージ

被験細菌株から MALDI-TOF MS により得た波形パターンについて、参照データベース内から最も近似したパターンをもつ細菌種が選出される。

第1章 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法によるウマ由来細菌の同定精度

緒言

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) を用いた細菌同定法は、迅速かつ安価に細菌種を同定できる方法として、ヒト医療では広く導入されている。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は獣医療においても導入が進められており、動物由来細菌の同定についても有用性が期待されている (Pavlovic et al., 2015; Randall et al., 2015)。しかし、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法で用いる参照データベースはヒトの病因細菌が中心となっており、動物由来細菌の同定性能については検討が必要である。

ウマにおける獣医療では、疫学監視や個体診療における治療薬選択を目的として、細菌同定を必要とする機会が多い。ウマの獣医療において MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を実用化する上では、ウマから分離される細菌について本手法の同定性能を検討することが必要である。

現在、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法のシステムとしては、Bruker 社の MALDI Biotyper と、Biomerieux 社の VITEK MS が世界的に流通している。MALDI Biotyper と VITEK MS の同定性能について比較した検討では、参照データベースに対象となる細菌種が登録されていない場合に限って、VITEK MS での誤同定が多く見られるものの、その他の細菌種については両機種とも高い割合 (85%以上) で菌種まで同定可能であることが報告されている (Lévesque et al., 2015)。MALDI Biotyper と VITEK MS では、被験菌から得ら

れた波形と参照するデータベースとのマッチングのアルゴリズムが異なっている。MALDI Biotyper では波形の各ピークの出現パターンを用いて系統樹解析を行うのに対し、VITEK MS では菌種特異的なピークをバイオマーカーとして使用する(Ohkusu, 2012)。また、MALDI Biotyper では、使用者が独自の参照データベースを構築することが可能であり、既存のデータベースでは同定困難な細菌種についてもデータベースの補完により同定精度の改善が期待される(Sogawa et al., 2012; Veloo et al., 2018)。自施設でのデータベース構築が可能であることから、今回は MALDI Biotyper を使用機器として選択した。

本章では、MALDI Biotyper を用いてウマ由来およびウマ環境由来細菌の同定を行ない、得られた同定結果から、ウマ由来細菌同定における本手法の有用性を検討した。

材料と方法

1. 検討に使用した細菌株

本検討では、3724 株（グラム陽性菌 1877 株、グラム陰性菌 1847 株）の細菌株を用いた。これらの株は、1980 年から 2016 年に日本のウマおよびウマ環境から分離され、保存されていたものである。分離株は、グラム染色による形態的観察、酸素要求性および市販の生化学試験キット（アピマニユアルキット, bioMérieux, Durham, NC, U.S.A.）を用いた生化学的性状の検索により性状を確認し、ウマの主要な病原細菌の分類に基づいて、*Taylorella* 属菌、腸内細菌科細菌、その他グラム陰性桿菌（*Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌）、レンサ球菌、ブドウ球菌、*Rhodococcus* 属菌、その他グラム陽性桿菌（*Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌）、偏性嫌気性菌に大別した。分離株は純培養後、10%のジメチルスルホキシドを加えた液体培地（基本的にはハートインヒュージョン培地を用いたが、レンサ球菌用には Todd hewitt 培地、偏性嫌気性菌用には Gifu anaerobic 培地を用いた。）に懸濁し、使用時まで-80℃で保存した。

2. MALDI-TOF MS を用いた同定

MALDI-TOF MS を用いた同定に使用するため、細菌種ごとに要求する条件に合わせてコロニーが確認できるまで分離株の培養を行なった。多くの分離株の培養には、5%のウマ血液を加えて作製したコロンビア寒天培地を用い、好気条件下、嫌気条件下および微好気条件下で 37℃にて一晩培養を行なった。*Rhodococcus* 属菌については、5%ウマ血液加コロンビア寒天培地を用い、好気条件下 30℃にて一晩培養を行なった。*Taylorella* 属菌については、ユーゴンチョコレート寒天培地を用い、10%CO₂条件下 37℃にて 72 時間培養を行なった。

培養したコロニーの処理は、以下の方法で行なった。

- a. セルスメア法：適量のコロニーをターゲットプレートに塗布し、細胞破壊を目的として 1 μ L の 70%ギ酸を滴下し、室温で乾燥させたのち、1 μ L のマトリックス試薬 (a-cyano-4 hydroxycinnamic acid matrix solution : HCCA) を加え、室温で乾燥させた。
- b. ギ酸・エタノール抽出法：セルスメア法で解析ができなかった分離株については、本法で処理を行なった。適量のコロニーを 1.2mL の 75%エタノールに懸濁した後、13,000rpm で 2 分間遠心操作を行い、菌体外成分を溶出した。得られた上清を除去し、沈渣を等量の 70%ギ酸およびアセトニトリルに懸濁した。懸濁液を 13,000rpm で 2 分間遠心操作を行い、得られた上清のうち 1 μ L をターゲットプレートに塗布した。室温で乾燥したのち HCCA を加え、再び乾燥させた。

上記の処理を行なった分離株は、市販の同定システム MALDI Biotyper CA 3.2 System (Bruker Japan 社、神奈川、日本) で解析を行い、分離株を構成するタンパク質を示す波形 (マススペクトル) を得た。細菌種の同定には、Bruker Japan 社の提供する参照データベース (ver. 5.0.0) を用いた。

3. MALDI-TOF MS を用いた同定結果の評価

同定結果の評価は、Bruker Japan 社の提供するマニュアルに従い行なった。

a. 正確性の評価

MALDI Biotyper では、分離株から得られたマススペクトルのパターンと、参照データベースに含まれる菌種のマススペクトルのパターンを解析する (Bruker Daltonik GmbH, 2019)。マススペクトルのパターンが最も一致する菌種が参照データベース内

から選出され、best match species として提示される。さらに、分離株のマスペクトルと選出された菌種との相同性は、0.00 から 3.00 までのスコアとして表示される。スコアが高値である場合には、選出された菌種との相同性が高い(Richter et al., 2013)。同定結果の正確性は、スコアの数値により以下のように解釈される。

スコアが 2.00 以上である場合：菌種レベル (species level) での同定

スコアが 1.70 以上 2.00 未満である場合：属レベル (genus level) での同定

スコアが 1.70 未満である場合：同定不可 (non-identification 属に関しても同定ができない)

b. 一貫性の評価

データベース内で最も一致する菌種である best match species と、次いで一致度が高い second best match species の菌種から、同定結果の一貫性が評価される。同定結果の一貫性は、「高」「低」「対応なし」の 3 段階で表現され、それぞれの評価基準は表 1-1 に示す通りである。

4. MALDI-TOF MS を用いた同定結果についての正確性の確認

MALDI-TOF MS を用いた同定法によりスコア 2.00 以上で同定された菌株のうちの 128 株 (表 1-2) について、16S rRNA 遺伝子系統解析による菌種同定を行い、同定結果を比較した。

i. 分離株の DNA 抽出

分離株の DNA は、市販の DNA 抽出キット (InstaGene Matrix, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A) を用いて抽出した。純培養したコロニーを 100 μ L の DNA 抽出キットに懸濁し、56°C で 30 分、100°C で 10 分インキュベートした。懸濁液を 12,000 rpm で 1 分間遠心操作し、上清を DNA 抽出液として用いた。

ii. 16S rRNA 遺伝子の PCR とシーケンス

16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の PCR は既報(Hiraishi, 1992; Hiraishi et al., 1994)に従い、約 1500bp の増幅産物を得た。増幅プライマーには以下を用いた。

27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1525r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

得られた増幅産物は、外部機関 (株式会社ファスマック, 神奈川, 日本) にてシーケンスを行ない、塩基配列を得た。

iii. 16S rRNA 遺伝子系統解析による菌種同定

分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、BLAST データベース (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いて、既知の細菌種との比較を行なった。菌種同定は CLSI の示すガイドライン (MM-18) に従った (CLSI, 2008)。本章の評価で用いられた主な基準は、以下通りである。

菌種レベルでの同定 (Genus and Species での表記)

・特定の菌種の標準菌株、もしくは査読の上公表されている配列と 99.0%以上の相同性があり、他の菌種との相同性と 0.8%以上の差異がある場合

属レベルでの同定（Genus の表記）

- ・標準菌株、もしくは学術的に正当に命名された株の配列との相同性が 97.0-98.9%

である場合

- ・特定の菌種の標準菌株と 99.0%以上の相同性があり、他の菌種との相同性との差異

が 0.8%未満である場合

同定不可

- ・標準菌株もしくは学術的に正当に命名された株の配列との相同性が 97%未満であ

る場合

結果

MALDI-TOF MS を用いた同定法による同定結果を表 1-3 に示す。検討した全 3724 株のうち、best match species の同定正確性が菌種レベル（スコアが 2.00 以上）だったものは 3209 株（86.2%）、属レベル（スコアが 1.70 以上 2.00 未満）は 310 株（8.3%）、同定不可（スコアが 1.70 未満）だったものは 205 株（5.5%）であった。グラム陽性菌 1877 株の中では、菌種レベルの同定だったものは 1597 株（85.1%）、属レベルは 146 株（7.8%）、同定不可だったものは 134 株（7.1%）であった。グラム陰性菌 1847 株の中では、菌種レベルの同定だったものは 1612 株（87.3%）、属レベルは 164 株（8.9%）、同定不可だったものは 71 株（3.8%）であった。

また、ウマの主要な病原細菌の分類別に得られた同定結果を表 1-4 に示す。菌種レベルでの同定ができた株の割合は、腸内細菌科細菌では 98.0%、レンサ球菌では 96.5%と高率であった。一方、偏性嫌気性菌では 58.9%、その他グラム陽性桿菌（*Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌）では 46.5%にとどまり、グループごとに同定結果に差が見られた。

また、best match species の同定正確性が菌種レベル（スコアが 2.00 以上）であった 3209 株のうち、113 株は best match species はスコアが 2.00 以上で提示され、菌種レベルでの同定であったものの、second best match species ではスコアが 2.00 以上で異なる菌種が提示される、結果の「一貫性が低い」状態が見られた。Best match species のスコアが 2.00 以上で *Enterobacter* 属菌と提示された 30 株のうち 18 株、*Actinobacillus* 属菌と提示された 39 株のうち 11 株は、結果の一貫性が低い状態であった（表 1-5、表 1-6）。

また、MALDI-TOF MS を用いた同定法で菌種レベルまでの同定が可能であった株の中の 128 株（表 1-2）は、16S rRNA 遺伝子系統解析による菌種同定結果と菌種まで一致したものは 92 株（71.8%）、属まで一致したものは 36 株（28.1%）であった。

考察

本章の検討では、ウマおよびウマ環境由来細菌株の 86.2%が MALDI-TOF MS による同定が可能であった。ヒト由来細菌については、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により 95%以上が菌種まで同定可能であることが報告されている (Samb-Ba et al., 2014; Seng et al., 2013)。また、家畜（鶏、牛、羊、山羊）由来の細菌分離株についての検討では、90%程度が MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により菌種まで同定が可能であった (Randall et al., 2015)。今回検討を行なったウマおよびウマ由来細菌株の同定結果は、過去の報告と遜色ない程度であった。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、ウマおよびウマ環境由来細菌の同定についても十分に使用可能であると考えられた。

主にヒト由来細菌を対象とした検討では、MALDI Biotyper を用いた細菌同定法を用いて、菌種レベルで 85.6%、属レベルでは 95.1%の株が 16S rRNA 系統解析による同定結果と一致することが報告されている (van Veen et al., 2010)。本章で行った検討では、MALDI Biotyper で菌種レベルまで同定されたウマおよびウマ環境由来細菌のうち、71.8% (92 株 / 128 株) が 16S rRNA 系統解析と完全に菌種まで一致しており、残りの株 (28.1%、36 株 / 128 株) も属までは一致していた。MALDI-TOF MS を用いた同定法では、ウマ由来細菌に関しても、菌種レベルでの同定結果については信頼性が高いと考えられた。

一方で、一部の細菌株では MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法による菌種レベルでの同定は困難であった。特に偏性嫌気性菌、その他グラム陽性桿菌、*Taylorella* 属菌、*Rhodococcus* 属菌については、菌種レベルで同定ができた菌株は 80%未満であった。MALDI-TOF MS を用いた同定法の同定精度は、参照データベースに含まれる菌種の数で変化するとされていることから (van Prehn et al., 2016)、MALDI-TOF MS による同定が困難である株については、まず参照データベースの不足を検討するべきであると言える。特に、馬伝染性子宮炎

の原因菌である *Taylorella equigenitalis* や(Platt et al., 1977)、子馬の敗血症の原因の一つとして知られる *Rhodococcus equi* は(Takai, 1997)、ウマでは重要な細菌種である一方でヒトの病原細菌としては認識されていないため、参照データベースが不足している可能性が考えられる。これらの MALDI-TOF MS による同定が困難であるウマ由来細菌株については、参照データベースの構成を中心として、より詳細な検討を行う必要がある。

また、*Enterobacter* 属菌、*Actinobacillus* 属菌では、結果の「一貫性が低い」状態の株が多く見られ、同定結果の信頼性に疑問が持たれた。*Enterobacter* 属や *Actinobacillus* 属は、属内に遺伝的に近縁な菌種を多く含んでおり(Christensen & Bisgaard, 2004; Mezzatesta et al., 2012)、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を使用しても菌種間の区別が困難である可能性がある。これらの細菌種については、他手法での菌種の再同定を含め、MALDI-TOF MS による同定結果の検証が必要であると考えられた。

小括

本章では、MALDI-TOF MS を用いた市販の同定システム（MALDI Biotyper）を用いて、ウマおよびウマ環境由来細菌の同定を行なった。検討した 3724 株のうち、菌種レベルでの同定が可能だったものは 3209 株（86.2%）、属レベルでは 310 株（8.3%）、同定不可だったものは 205 株（5.5%）であった。この結果は過去の報告と遜色ない結果であり、本システムはウマおよびウマ環境由来細菌の同定に十分活用可能であると考えられた。しかし、MALDI-TOF MS を用いた菌種レベルでの同定が困難であった株や、同定結果の信頼性に乏しい株も見られた。これらの細菌株については、第 2 章以降で詳細な検索を行うこととした。

表

表 1-1 一貫性の評価基準と同定結果の例

	一貫性	同定結果	同定結果の例	
			Best match species (スコア)	Second best match species (スコア)
高		best match species が菌種レベルでの同定、かつ second best match species が菌種レベルでの同定で best match species と同一の菌種である。	Genus (A) species (a) (≥ 2.00)	Genus (A) species (a) (≥ 2.00)
		best match species が菌種レベルでの同定、かつ second best match species が属レベルでの同定で best match species と同一の属である。	Genus (A) species (a) (≥ 2.00)	Genus (A) species (a, b,...) (≥ 1.70 to < 2.00)
		best match species が菌種レベルでの同定、かつ second best match species が同定不可である。	Genus (A) species (a) (≥ 2.00)	(< 1.70)
		best match species と second best match species が菌種レベルでの同定で、属は同一だが菌種が異なる。	Genus (A) species (a) (≥ 2.00)	Genus (A) species (b) (≥ 2.00)
低		best match species と second best match species が属レベルでの同定で、同一の属である。	Genus (A) species (a) (≥ 1.70 to < 2.00)	Genus (A) species (a, b,...) (≥ 1.70 to < 2.00)
		best match species が属レベルでの同定で、second best match species が同定不可である。	Genus (A) species (a) (≥ 1.70 to < 2.00)	- (< 1.70)
対応なし		best match species と second best match species が菌種レベルもしくは属レベルでの同定で、異なる属である。	Genus (A) species (a)	Genus (B) species (b)
		best match species が同定不可である。	(< 1.70)	(< 1.70)

表 1-2 16S rRNA 系統解析により正確性の評価を行なった株

菌種*	株数
<i>Advenella kashmirensis</i>	1
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	2
<i>Aeromonas salmonicida</i>	2
<i>Aeromonas media</i>	1
<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Bacteroides fragilis</i>	11
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	4
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	1
<i>Clostridium perfringens</i>	2
<i>Corynebacterium stationis</i>	1
<i>Curtobacterium albidum</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9
<i>Flavonifractor plautii</i>	1
<i>Fusobacterium varium</i>	1
<i>Fusobacterium equinum</i>	1
<i>Lelliottia amnigena</i>	1
<i>Microbacterium maritopicum</i>	1
<i>Moraxella osloensis</i>	1
<i>Prevotella heparinolytica</i>	5
<i>Propionibacterium acnes</i>	1
<i>Proteus hauseri</i>	1
<i>Pseudomonas synxantha</i>	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
<i>Pseudomonas libanensis</i>	2
<i>Pseudomonas koreensis</i>	7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2
<i>Pseudomonas putida</i>	4
<i>Pseudomonas mosselii</i>	3
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	7
<i>Pseudomonas monteilii</i>	1

<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1
<i>Pseudomonas otitidis</i>	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1
<i>Staphylococcus delphini</i>	3
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	13
<i>Staphylococcus hyicus</i>	11
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus equorum</i>	5
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i>	2
<i>Streptococcus parauberis</i>	1
<i>Streptococcus ovis</i>	1
<i>Streptococcus equi</i>	2

*MALDI-TOF MS を用いた同定法による同定結果

表 1-3 ウマおよびウマ環境由来株 3274 株について MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の結果

	菌種レベルで同定 された株数(%*)	属レベルで同定 された株数(%)	同定不可出会っ た株数(%)
グラム陽性菌 (1877 株)	1597 (85.1)	146 (7.8)	134 (7.1)
グラム陰性菌 (1847 株)	1612 (87.3)	1164 (8.9)	71 (3.8)
合計	3209 (86.2)	310 (8.3)	205 (5.5)

*それぞれの正確性で同定された株の割合

表 1-4 ウマの主要な病原細菌の分類別に示した MALDI-TOF MS を用いた同定結果

分類 (株数)	菌種レベルで同定された株数 (%)	属レベルで同定された株数 (%)	同定不可であった株数 (%)
<i>Taylorella</i> 属菌 (274)	179 (65.3)	93 (33.9)	2 (0.7)
腸内細菌科細菌 (934)	915 (98.0)	16 (1.7)	3 (0.3)
その他グラム陰性桿菌** (483)	412 (85.3)	47 (9.7)	24 (5.0)
レンサ球菌 (936)	903 (96.5)	13 (1.4)	20 (2.1)
ブドウ球菌 (502)	431 (85.9)	54 (10.8)	17 (3.4)
<i>Rhodococcus</i> 属菌 (174)	130 (74.7)	28 (16.1)	16 (9.2)
その他グラム陽性桿菌*** (71)	33 (46.5)	13 (18.3)	25 (35.2)
偏性嫌気性菌 (350)	206 (58.9)	46 (13.1)	98 (28.0)

*それぞれの正確性で同定された株の割合

** *Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌

*** *Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌

表 1-5 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、結果の信頼性が低かった *Enterobacter* 属菌の同定結果

MALDI-TOF MS を用いた同定法による同定結果								
菌株番号	分離年	分離症例	Best match species	スコア	Second best match species	スコア		
E.cloacae-1	1983	不明	<i>E. ludwigii</i>	2.34	<i>E. cloacae</i>	2.28		
E.cloacae-4	1983	不明	<i>E. cloacae</i>	2.35	<i>E. ludwigii</i>	2.2		
E.cloacae-6	1983	不明	<i>E. cloacae</i>	2.44	<i>E. ludwigii</i>	2.30		
E.cloacae-7	1983	不明	<i>E. ludwigii</i>	2.38	<i>E. cloacae</i>	2.38		
E.cloacae-8	1983	不明	<i>E. cloacae</i>	2.38	<i>E. ludwigii</i>	2.38		
E.cloacae-9	1983	不明	<i>E. ludwigii</i>	2.30	<i>E. cloacae</i>	2.22		
E.cloacae-12	1983	不明	<i>E. cloacae</i>	2.38	<i>E. ludwigii</i>	2.34		
E.cloacae-14	1983	不明	<i>E. ludwigii</i>	2.39	<i>E. cloacae</i>	2.32		
E.cloacae-15	1983	不明	<i>E. asburiae</i>	2.29	<i>E. cloacae</i>	2.13		
E.cloacae-10	1983	不明	<i>E. ludwigii</i>	2.35	<i>E. cloacae</i>	2.34		
E.cloacae-5	1983	不明	<i>E. cloacae</i>	2.27	<i>E. asburiae</i>	2.39		
E.cloacae-16	1985	不明	<i>E. asburiae</i>	2.22	<i>E. cloacae</i>	2.16		
E.cloacae-17	1985	不明	<i>E. asburiae</i>	2.23	<i>E. kobei</i>	2.12		
E.cloacae-22	1995	喉嚢炎	<i>E. asburiae</i>	2.34	<i>E. cloacae</i>	2.31		
Entero-15	2000	肺炎	<i>E. asburiae</i>	2.35	<i>E. cloacae</i>	2.20		
Entero-89	2010	肺炎	<i>E. ludwigii</i>	2.36	<i>E. cloacae</i>	2.33		
Entero-92	2011	肺炎	<i>E. asburiae</i>	2.30	<i>E. cloacae</i>	2.09		
Entero-181	2016	蹄膿瘍	<i>E. kobei</i>	2.19	<i>E. asburiae</i>	2.17		

表 1-6 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、結果の信頼性が低かった *Actinobacillus* 属菌の同定結果

MALDI-TOF MS を用いた同定法による同定結果						
菌株番号	分離年	分離症例	Best match species	スコア	Second best match species	スコア
Act.equuli-4	1984	不明	<i>A. ureae</i>	2.00	<i>A. equuli</i>	2.00
Act.equuli-7	1985	関節炎	<i>A. suis</i>	2.15	<i>A. equuli</i>	2.13
Act.equuli-12	1984	関節炎	<i>A. equuli</i>	2.09	<i>A. suis</i>	2.05
Moraxella-2	1985	関節炎	<i>A. equuli</i>	2.21	<i>A. suis</i>	2.09
NE-23	1999	肺炎	<i>A. pleuropneumoniae</i>	2.09	<i>A. lignieresii</i>	2.01
NE-26	2000	輸送熱	<i>A. equuli</i>	2.03	<i>A. suis</i>	2.00
NE-110	2002	肺炎	<i>A. suis</i>	2.18	<i>A. equuli</i>	2.02
NE-119	2003	敗血症	<i>A. equuli</i>	2.10	<i>A. suis</i>	2.07
NE-136	2004	血管炎	<i>A. equuli</i>	2.09	<i>A. suis</i>	2.04
NE-202	2013	肺炎	<i>A. suis</i>	2.06	<i>A. equuli</i>	2.04
NE-204	2013	肺炎	<i>A. suis</i>	2.13	<i>A. equuli</i>	2.08

第2章 ウマ由来細菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の問題点

緒言

第1章にて行なった検討では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、ウマおよびウマ環境由来細菌のうち 86.2%は菌種レベルでの同定が可能であった。一方で、属レベルでの同定にとどまったものは 8.3%、同定不可だったものは 5.5%含まれていた。本章では、これらの MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種レベルでの同定が困難であった株の特徴を明らかにすることを目的とし、16S rRNA 遺伝子を用いた検索を行なった。

16S rRNA は細菌のリボソームを構成する RNA の一種であり、この 16S rRNA をコードする遺伝子である 16S rRNA 遺伝子は、1980 年代から細菌の菌種同定に用いられてきた (Clarridge, 2004)。16S rRNA 遺伝子は真正細菌および古細菌では 1500 塩基程度の大きさで、共通する塩基配列領域が 10 箇所以上存在している (Lane, 1991)。さらに、その両末端に保存性の高い塩基配列領域が存在しており、この保存領域をターゲットとした PCR プライマーを用いることで、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅することが可能である (Hiraishi, 1995)。このように、16S rRNA 遺伝子は細菌が安定的に保有し、かつ可変領域を含むことから、細菌の系統解析では一般的に使用されている (Hiraishi, 1995)。

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) は塩基配列同士を比較し、類似する配列を検索するプログラムである (National Center for Biotechnology Information, 2022)。。National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DNA Data Bank of Japan (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/>) および Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) の Web

ページでは、これらの機関が管理する公共データベースを参照して、BLAST 解析を行うことができる。

本章では、分離細菌の 16S rRNA 遺伝子のシーケンスにより得られた塩基配列を用いて、公共データベースを参照した BLAST 解析を行い、菌種の同定を行なった。さらに、一部の細菌種については 16S rRNA 遺伝子について系統樹を作成し、ウマおよびウマ環境由来細菌について既知の細菌種との遺伝学的関係性を考察した。

材料と方法

1. 検討に使用した細菌株

第1章にて MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を行い、best match species のスコアが 2.00 未満であった株、すなわち、属レベルの同定であった株(310 株)および同定不可であった株(205 株)、計 515 株を用いた。

2. 分離株の DNA 抽出および 16S rRNA 遺伝子系統解析

分離株の DNA は、第1章と同様に市販の DNA 抽出キット (InstaGene Matrix) を用いて抽出された。

16S rRNA 遺伝子の PCR は、第1章と同様に増幅プライマー (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1525r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') を用いて、約 1500bp の増幅産物を得た。得られた増幅産物は、外部機関(株式会社ファスマック)にてシーケンスを行ない、塩基配列を得た。

分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、BLAST データベース (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて、既知の細菌種との比較を行なった。菌種同定は CLSI の示すガイドライン (MM18-A) に従った (CLSI, 2008)。

3. 16S rRNA 遺伝子を用いた系統樹の作成

分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列および、GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録されている既知の細菌種の 16S rRNA 遺伝子について、系統樹を作成した。塩基配列は Clustal W を用いてアライメントし、最尤法系統樹を作成した。ブートストラップサンプリングは 1000 回行なった。アライメントおよ

び系統樹作成には MEGA 7.0 ソフトウェア (Kumar et al., 2016) を用いた。

結果

16S rRNA 遺伝子系統解析の結果、検討した 515 株のうち 273 株は菌種レベルでの同定、131 株は属レベルでの同定、111 株については同定ができなかった。菌種レベルでの同定および属レベルでの同定に至った 404 株の同定結果を表 2-1 に示す。

16S rRNA 系統解析により菌種レベルでの同定が可能であった 273 株のうち、93 株は *Taylorella equigenitalis* (分離年および由来を表 2-2 に示す。)、41 株は *Rhodococcus equi* (分離年および由来を表 2-3 に示す。) と同定された (表 2-1)。16S rRNA 遺伝子系統解析で *T. equigenitalis* と同定された株は、2000 年以前に子宮炎症例から分離された株が大半 (78 株/93 株) であった (表 2-2)。*R. equi* は 41 株中 24 株がウマ由来で、環境由来株は 17 株であった (表 2-3)。他 139 株は、菌種レベルで 56 菌種に同定された。

なお、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では属レベルで同定された 310 株のうち 270 株 (87.0%) については、16S rRNA 遺伝子系統解析の結果と属レベルでの一致が認められた。また、MALDI-TOF MS では同定されなかった 205 株のうち、16S rRNA 遺伝子系統解析により 63 株 (30.7%) が菌種レベル、58 株 (28.3%) が属レベルで同定され、84 株 (41.0%) は同定不可であった。

16S rRNA 遺伝子系統解析で *Actinobacillus* 属菌と同定された株 12 株全て、*Prevotella* 属菌と同定された 12 株中 7 株、*Staphylococcus* 属菌と同定された 50 株中 28 株、*Streptococcus* 属菌と同定された 20 株中 16 株は、菌種レベルでの同定ができなかった。これらの分離株 (分離年、分離症例を表 2-4、2-5、2-6、2-7 に示す。) について、16S rRNA 遺伝子配列を基に系統樹を作成した。

Actinobacillus 属菌 (表 2-4) は、16S rRNA 遺伝子を元にした系統樹では、菌種を区別す

ることができなかった (図 2-1)。 *Prevotella* 属菌、 *Staphylococcus* 属菌および *Streptococcus* 属菌については、一部の分離株は既知の菌種とは遺伝的に離れたクラスターを形成した (図 2-2, 2-3, 2-4)。 *Prevotella* 属菌 (表 2-5) では、4 株 (anaero130、anaero132、anaero72-1、anaer72-2) が既知の菌種から離れたクラスターを形成した (図 2-2)。 *Staphylococcus* 属菌 (表 2-6) では、3 株 (S_hyicus8、stap126、stap131) が既知の菌種から離れたクラスターを形成し、7 株 (S_aureus186、S_intermedius1、S_intermedius11、S_intermedius15、S_intermedius3、S_intermedius5、Stap8) は *S. intermedius*、*S. pseudointermedius*、*S. delphini* を含むクラスターに含まれた (図 2-3)。 *Streptococcus* 属菌 (表 2-7) では、7 株 (G+R17、Strep301、Strep294、anaer55、anaero81、anaero82、anaero143) と 3 株 (G+R58、G+R69、G+R26) がそれぞれ既知の菌種から離れたクラスターを形成した (図 2-4)。

考察

Taylorella equigenitalis や *R. equi* の分離株の多くは、16S rRNA 遺伝子系統解析では菌種同定に至ったものの、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種レベルでの同定が困難であることが明らかとなった。*Taylorella equigenitalis* はウマに特有の生殖器感染症である馬伝染性子宮炎の原因菌として知られており (Platt et al., 1977)、ウマの繁殖領域においては監視が必要とされる細菌である。しかし、今回 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法で使用した市販の参照データベース (ver. 5.0.0.) では、*T. equigenitalis* は 3 株登録されているのみであり、ウマ由来の *T. equigenitalis* の同定には不十分であると考えられた。

R. equi は子馬の敗血症の原因菌として知られており (Takai, 1997)、今回 16S rRNA 系統解析で *R. equi* と同定された株の約 3 分の 1 (12 株/41 株) は肺炎症例の気管洗浄液から分離された株であった。参照データベースには 8 株の *R. equi* が登録されており、このうち 2 株は土壌から分離された株、1 株はウマ肺炎症例から分離された株だが、残りの株については由来が明らかではなかった。*R. equi* の病原性に関しては、病原性関連タンパク質 (Virulence-associated protein antigen: VapA) 産生の有無が関与していると考えられている。*R. equi* は土壌中に常在する細菌だが、ウマから分離される株と比較して、土壌由来株では VapA 産生株が少なく、VapA を産生する一部の *R. equi* 株のみがウマに強い病原性を持つと考えられている (Venner et al., 2007)。MALDI-TOF MS の参照データベース登録されている *R. equi* 株にはウマ由来株が 1 株含まれるのみで、その他の株は産生するタンパク質の構成がウマ症例由来株と異なっている可能性があり、MALDI-TOF MS を用いた同定結果に影響を与えていると考えられた。このことは、MALDI-TOF MS が *R. equi* 株の VapA 産生の有無を区別できる可能性があることを示唆しており、VapA 産生性の有無を含めた *R. equi* 株の解析が必要であると考えられた。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、参照するデータベースに含まれる細菌種や、株のバリエーションが同定精度に影響を与えることが知られている (Khot et al., 2012)。

Taylorella equigenitalis や *R. equi* のように、ウマに特有の感染症原因菌や、ヒトから分離されることが稀である (Cui et al., 2018) 細菌については、データベースに含まれる細菌株の不足や偏りから、市販の参照データベースでは同定が困難な場合があると考えられた。

また、MALDI-TOF MS で属レベルの同定であったものは、属レベルの評価は 16S rRNA 系統解析の結果と概ね一致していた。さらに、MALDI-TOF MS で同定不可であった株の 40% 以上は、16S rRNA 系統解析でも同定ができなかった。この結果は、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は 16S rRNA 系統解析による同定結果と高い相同性を示すという、ヒト由来株に関する報告と一致していた (Marko et al., 2012)。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種レベルまでの同定ができなかった分離株の中には、16S rRNA 塩基配列に基づいた系統樹の中では既知の細菌種とは離れたクラスターを形成している株があった。既知の *Prevotella* 属菌から離れてクラスターを形成した 4 株 (anaero130、anaero132、anareo72-1、anaero72-2) は、肺炎症例のウマから分離されたものであった (図 2-2、表 2-5)。これらはウマの肺炎に関連する未知の *Prevotella* 属菌である可能性が考えられた。*Staphylococcus* 属菌に関しては、既知の *Staphylococcus* 属菌とは別のクラスターを形成していた 3 株 (S_hyicus8、stap126、stap131) は、皮膚炎や下肢部の水腫を呈したウマから分離された (図 2-3、表 2-6)。また、*Staphylococcus* 属菌のうち 7 株 (S_aureus186、S_intermedius1、S_intermedius11、S_intermedius15、S_intermedius3、S_intermedius5、Stap8) は、*Staphylococcus intermedius* group に属する *S. intermedius*、*S. pseudintermedius*、*S. delphini* を含むクラスターに属した。これらの分離株についてさら

に詳細に検索するためには、*Staphylococcus* 属菌の中では多様性を持つとされている *sodA* や *hsp60* 遺伝子（サーモスクレアーゼをコードする遺伝子）のシーケンス (Sasaki et al., 2007) が有効である可能性がある。*Streptococcus* 属菌については、7 株 (G+R17、Strep301、Strep294、anaer55、anaero81、anaero82、anaero143) は、ヒツジから分離された *Streptococcus ovis* (Collins et al., 2001) に遺伝的に近かった (図 2-4)。他の 3 つの *Streptococcus* 分離株 (G+R58、G+R69、G+R26) はいずれも肺炎症例から分離され (表 2-7)、アイベックスから分離され 2016 年に命名された *Streptococcus caprae* (Vela et al., 2016) に近いものであった (図 2-4)。既知の菌種から離れたクラスターを形成する *Streptococcus* 属菌株は、家畜から分離された *Streptococcus* 属菌と遺伝的に近い可能性が考えられた。これらの分離株は遺伝的にはそれぞれ既知の *Prevotella* 属菌、*Staphylococcus* 属菌、*Streptococcus* 属菌に近かったにもかかわらず、16S rRNA 系統解析では既知の菌種と同一菌種であると確認できなかったことから、ウマの疾患に関連した未知の菌種である可能性がある。これらの分離株については、さらなる分類学的検討が必要である。

小括

本章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では同定ができなかったウマおよびウマ由来分離株について、その特徴を検討する目的で 16S rRNA 遺伝子を用いた検討を行なった。ウマに特徴的な病原細菌である *Taylorella equigenitalis* や *Rhodococcus equi* は、既存の MALDI-TOF MS のデータベースを用いた同定では同定が困難な場合があった。これらの細菌種については、参照データベースの不足や偏りが指摘された。また、16S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹解析により、遺伝的に既知の菌種と離れた株が認められた。これらの株については未知の細菌種である可能性があり、より詳細な遺伝学的検討が必要と思われた。また、これらの株はいずれも症状を有するウマの検体から分離されていることから、ウマの疾患との関連についても、今後検討が必要であると考えられた。

表

表 2-1 MALDI-TOF MS による細菌同定法で同定ができなかった分離株の 16S rRNA 系統解析による同定結果

属	菌種	株数
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	1
	<i>lwoffii</i>	2
	<i>pittii</i>	1
<i>Actinobacillus</i>	not identified*	12
<i>Actinomyces</i>	not identified	3
<i>Aerococcus</i>	not identified	3
<i>Agrobacterium</i>	not identified	1
<i>Arthrobacter</i>	<i>mysorens</i>	1
<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	1
	not identified	8
<i>Bacteroides</i>	<i>helcogenes</i>	1
	<i>ovatus</i>	1
	<i>pyogenes</i>	2
	not identified	1
<i>Bordetella</i>	<i>petrii</i>	1
	not identified	1
<i>Brachybacterium</i>	<i>paraconglomeratum</i>	1
	not identified	3
<i>Brevibacterium</i>	<i>luteolum</i>	1
	not identified	3
<i>Brevundimonas</i>	<i>bullata</i>	1
<i>Citrobacter</i>	not identified	1
<i>Clostridioides</i>	<i>difficile</i>	19
<i>Clostridium</i>	<i>argentinense</i>	1
	<i>perfringens</i>	1
	not identified	6

<i>Corynebacterium</i>	<i>stationis</i>	1
	<i>ulceribovis</i>	1
	<i>uterequi</i>	1
	not identified	1
<i>Eggerthella</i>	<i>lenta</i>	1
<i>Erwinia</i>	<i>billingiae</i>	1
<i>Eubacterium</i>	not identified	1
<i>Exiguobacterium</i>	<i>sibiricum</i>	6
<i>Facklamia</i>	not identified	1
<i>Finegoldia</i>	not identified	1
<i>Fusobacterium</i>	<i>equinum</i>	2
<i>Janibacter</i>	not identified	1
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	3
<i>Kosakonia</i>	not identified	1
<i>Lactobacillus</i>	<i>hayakitensis</i>	1
<i>Leucobacter</i>	<i>chironomi</i>	1
<i>Macrococcus</i>	<i>brunensis</i>	1
	<i>caseolyticus</i>	6
<i>Microbacterium</i>	not identified	1
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	3
<i>Moraxella</i>	<i>cuniculi</i>	1
	not identified	1
<i>Moryella</i>	not identified	1
<i>Neisseria</i>	not identified	2
<i>Nicoletella</i>	<i>semolina</i>	6
<i>Oligella</i>	<i>ureolytica</i>	1
<i>Olsenella</i>	not identified	2
<i>Paenibacillus</i>	not identified	1
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	3
	<i>ananatis</i>	1
	<i>deleyi</i>	1
	not identified	2

<i>Paraprevotella</i>	not identified	1
<i>Pasteurella</i>	<i>caballi</i>	4
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>	12
	not identified	2
<i>Prevotella</i>	<i>dentasini</i>	5
	not identified	7
<i>Propionibacterium</i>	not identified	1
<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	<i>chlororaphis</i>	2
	<i>granadensis</i>	1
	<i>monteilii</i>	9
	<i>mosselii</i>	1
	<i>otitidis</i>	1
	<i>teessidea</i>	1
	not identified	8
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	41
<i>Rothia</i>	not identified	5
<i>Staphylococcus</i>	<i>condimenti</i>	2
	<i>equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	2
	<i>hyicus</i>	1
	<i>pasteuri</i>	3
	<i>saprophyticus</i>	1
	<i>saprophyticus</i> subsp.	8
	<i>saprophyticus</i>	
	<i>sciuri</i>	4
	<i>stepanovicii</i>	1
	not identified	28

<i>Streptococcus</i>	<i>canis</i>	1
	<i>equi subsp. equi</i>	1
	<i>pneumoniae</i>	1
	<i>rifensis</i>	1
	not identified	16
<i>Streptomyces</i>	not identified	4
<i>Taylorella</i>	<i>equigenitalis</i>	93
<i>Zimmermannella</i>	not identified	1

* 16S rRNA 系統解析では属レベルで同定ができたものの、菌種レベルでの同定ができなかったもの

表 2-2 16S rRNA 系統解析で *Taylorella equigenitalis* と同定された株の分離年および由来

分離年	由来			
	牝馬生殖器	精液	不明	感染実験における剖検検体
1980~1989 年	47*	1	6	0
1990~1999 年	31	0	6	0
2000~2016 年	0	0	0	2

*株数

表 2-3 16S rRNA 系統解析で *Rhodococcus equi* と同定された株の分離年および由来

分離年	由来			
	気管洗浄液	下痢便	剖検検体	環境
不明(2000 年以前)	0*	0	0	17
1980~1989 年	1	3	2	0
1990~1999 年	5	2	3	0
2000~2005 年	7	0	1	0

*株数

表 2-4 16S rRNA 系統解析で *Actinobacillus* 属菌と属レベルで同定されたウマ由来株の分離年と分離症例

菌株番号	分離年	分離症例
Act.equuli-2	1984	不明
Act.equuli-8	1985	関節炎
Act.equuli-9	1985	関節炎
Moraxella-3	1984	関節炎
Moraxella-4	1984	関節炎
Pasturella-4	1992	関節炎
NE-29	2000	肺炎
NE-2	1996	腸炎
NE-109	2002	喉嚢炎
NE-111	2002	肺炎
NE-151	2007	不明
NE-186	2011	肺炎

表 2-5 16S rRNA 系統解析で *Prevotella* 属菌と属レベルで同定されたウマ由来株の分離年と分離症例

菌株番号	分離年	分離症例
anaero43	2004	肺炎
anaero66	2006	肺炎
anaero72-1	2007	肺炎
anaero72-2	2007	肺炎
anaero130	2010	胸膜肺炎
anaero132	2010	胸膜肺炎
anaero136	2010	肺炎

表 2-6 16S rRNA 系統解析で *Staphylococcus* 属菌と属レベルで同定されたウマ由来株の分離年と分離症例

菌株番号	分離年	分離症例
S_aureus186	1992	子宮炎
S_intermedius1	1987	皮膚炎
S_intermedius3	1989	下痢症
S_intermedius5	1990	下痢症
S_intermedius11	1991	下痢症
S_intermedius15	1991	子宮炎
S_hyicus5	1987	皮膚炎
S_hyicus6	1987	皮膚炎
S_hyicus7	1987	皮膚炎
S_hyicus8	1987	皮膚炎
S_hyicus9	1987	皮膚炎
S_hyicus11	1987	皮膚炎
S_hyicus17	1988	皮膚炎
S_hyicus21	1988	皮膚炎
S_hyicus22	1988	皮膚炎
S_hyicus27	1990	皮膚炎
Stap8	1997	喉嚢炎
stap71	2000	角膜炎
stap126	2008	肢腫れ*
stap131	2009	肢腫れ
stap229	2015	角膜炎
stap252	2016	角膜炎
stap253	2016	腱鞘炎
stap261	2016	肺炎
stap265	2016	急性腹症
stap193	2014	挫跖**
stap214	2015	挫跖

* 下肢部の浮腫・腫脹の総称。

** 蹄球の打撲や、石などを踏むことで生じる蹄の炎症。

表 2-7 16S rRNA 系統解析で *Streptococcus* 属菌と属レベルで同定されたウマ由来株の分離年と分離症例

菌株番号	分離年	症例
S.equi106	2001	腺疫
Strep285	2015	肺炎
Strep294	2016	腸炎
Strep301	2016	皮下膿瘍
stap155	2009	肺炎
G+R7	2000	肺炎
G+R17	2005	肺炎
G+R26	2011	胸膜肺炎
G+R58	2015	肺炎
G+R63	2016	皮下膿瘍
G+R69	2016	胸膜肺炎
G+R25	2011	腹水
anaer55	2006	肺炎
anaero81	2009	肺炎
anaero82	2009	肺炎
anaero143	2010	肺炎

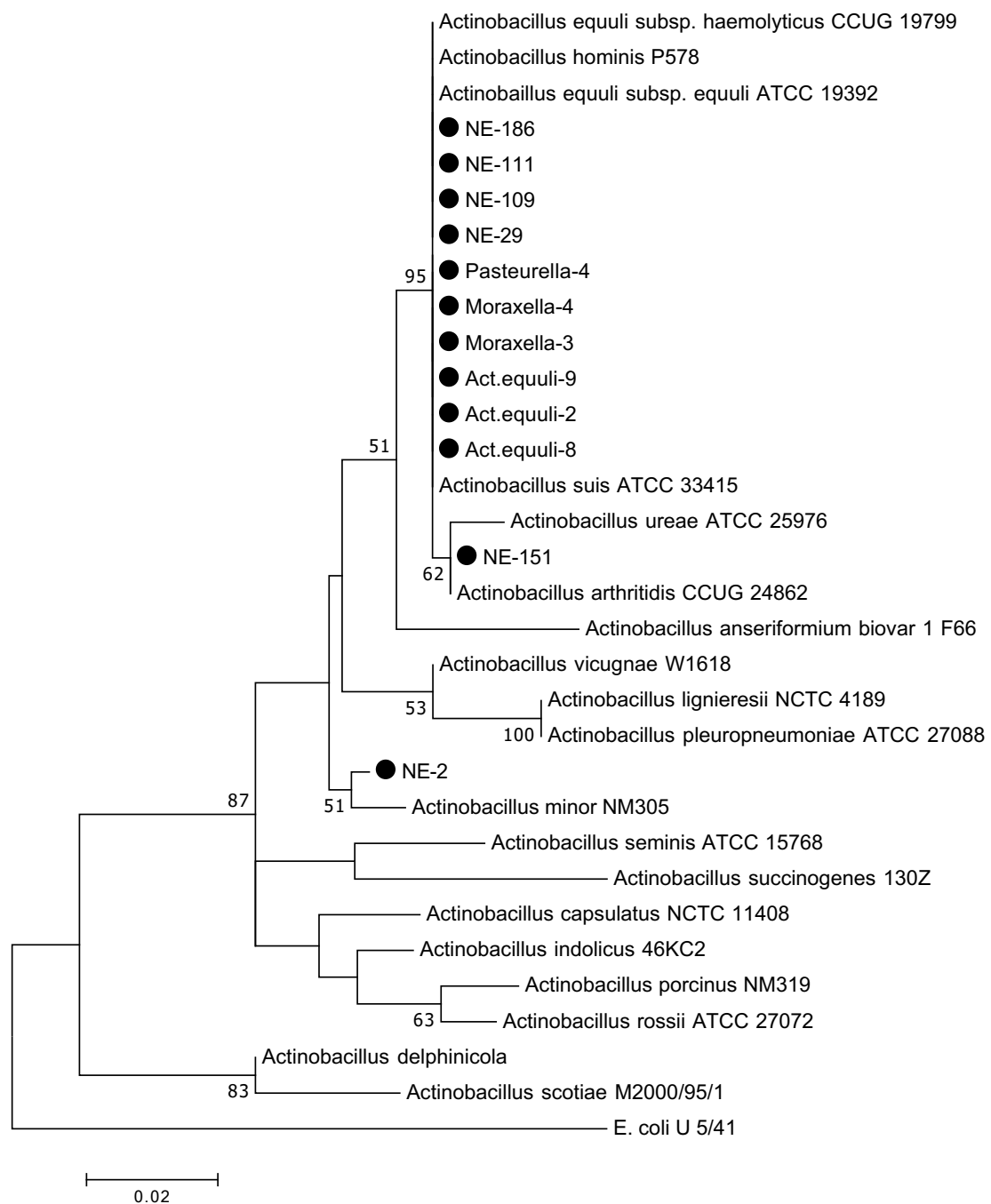


図 2-1 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Actinobacillus* 属菌の代表的な種とウマ由来分離株の系統樹。本研究で検討したウマ由来分離株は、黒丸で示す。

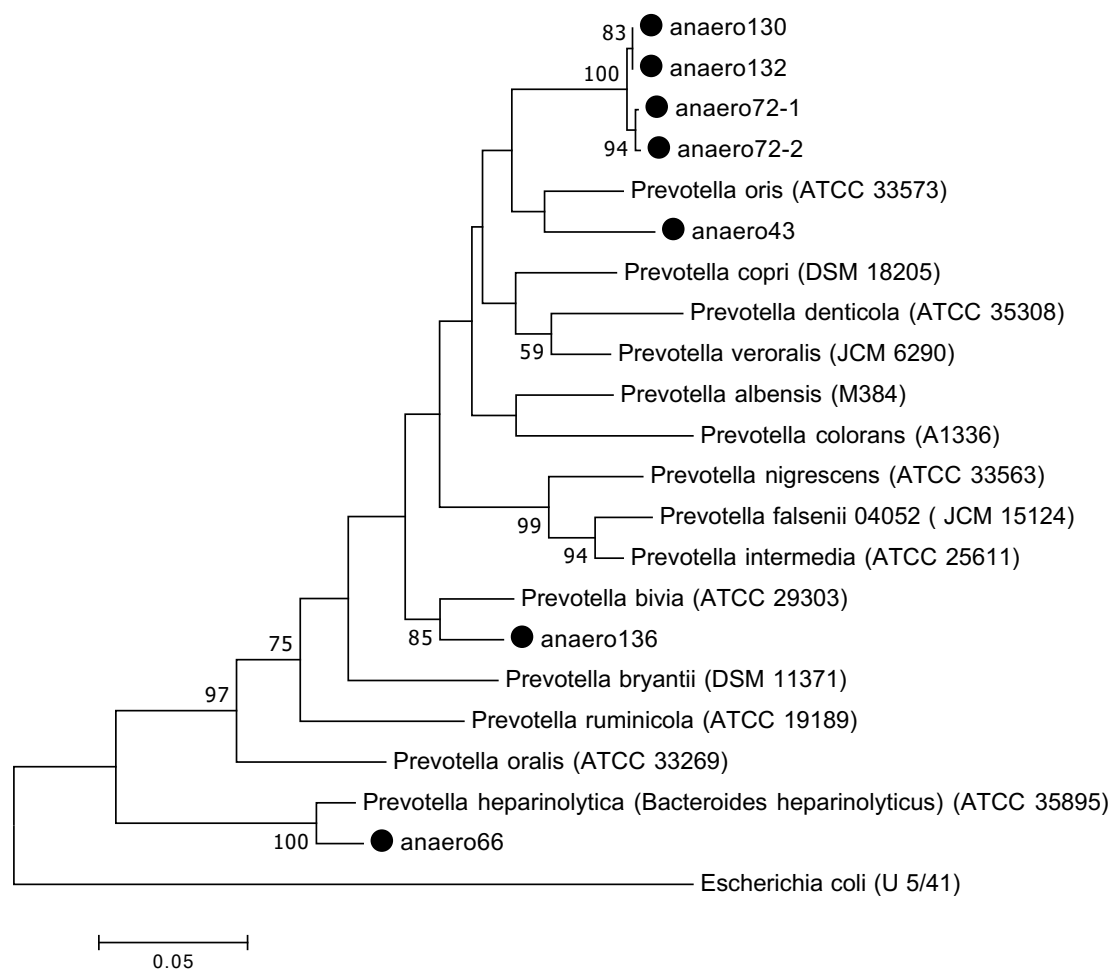


図 2-2 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Prevotella* 属菌の代表的な種とウマ由来分離株の系統樹。本研究で検討したウマ由来分離株は、黒丸で示す。

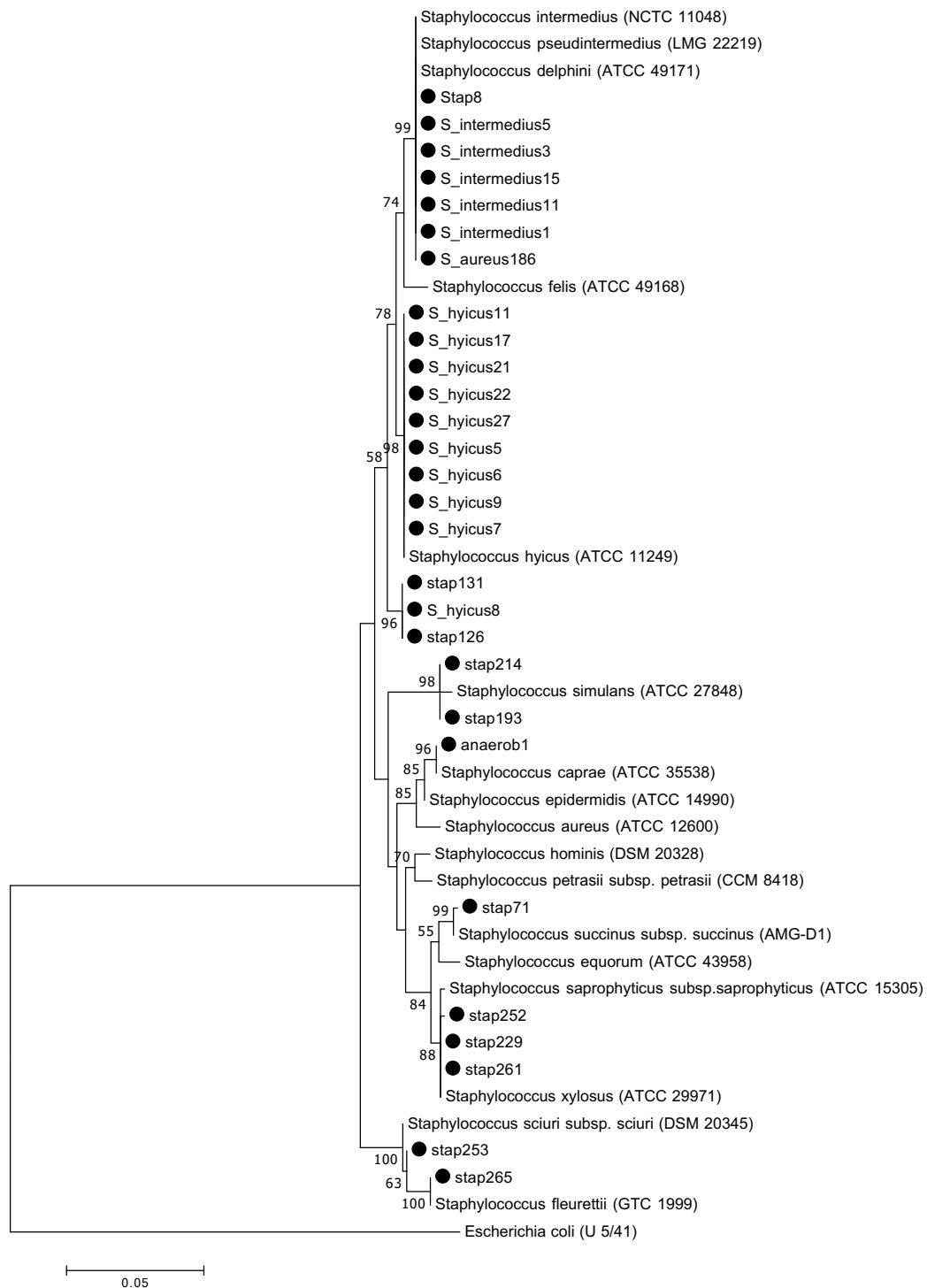


図 2-3 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Staphylococcus* 属菌の代表的な種とウマ由来分

離株の系統樹。本研究で検討したウマ由来分離株は、黒丸で示す。

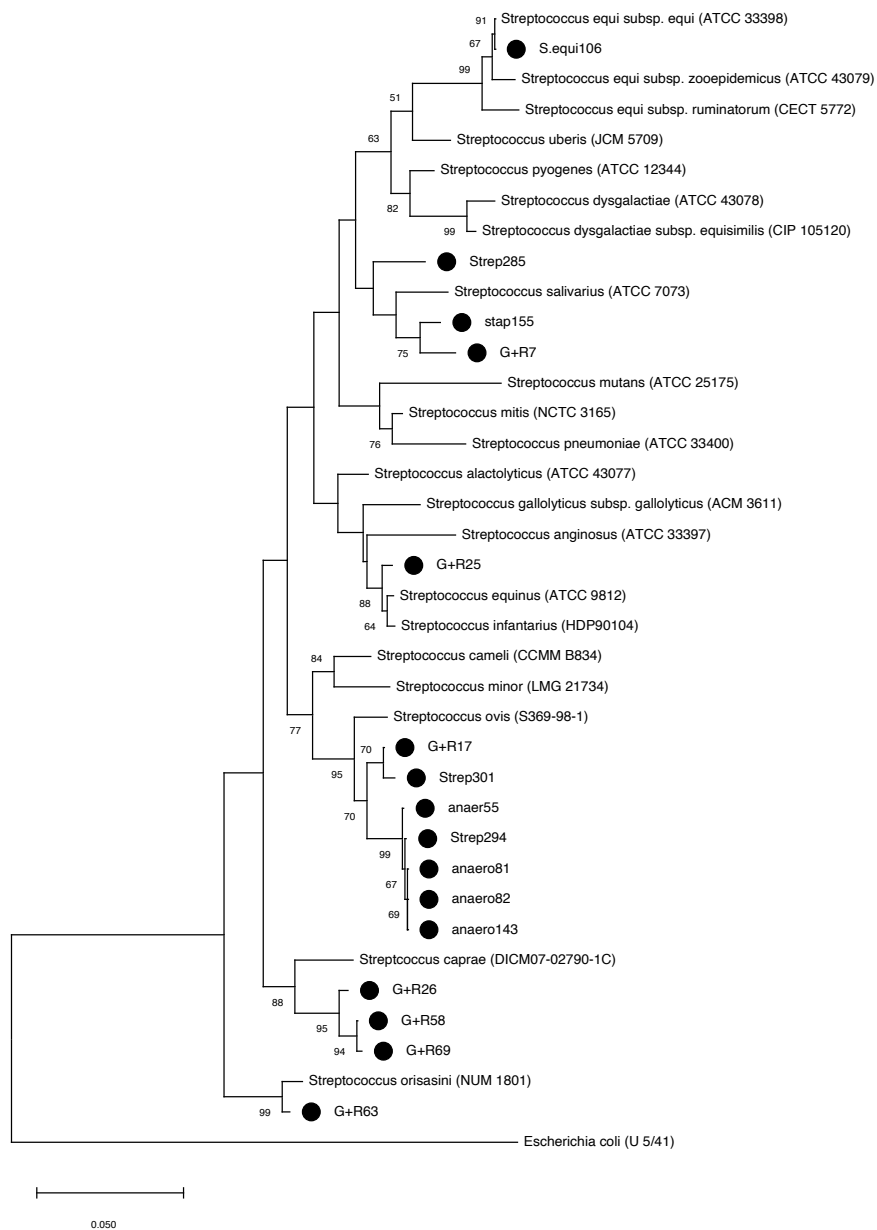


図 2-4 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく *Streptococcus* 属菌の代表的な種とウマ由来分離株の系統樹。本研究で検討したウマ由来分離株は、黒丸で示す。

第3章 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により複数の候補が提示されたウマ由来細菌についての検討

緒言

第1章の検討では、一部のウマおよびウマ環境由来細菌株において、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では複数の候補が提示された。このように複数の候補が提示された場合、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法での同定結果の信頼性が低いと考えられた。本章では、第1章での検討により結果の「一貫性が低い」状態 (best match species はスコアが 2.00 以上で提示され、菌種レベルでの同定であったものの、second best match species では高いスコアで異なる菌種が提示された。) であった株のうち、株数の多かった *Enterobacter* 属菌と *Actinobacillus* 属菌に着目した。*Enterobacter* 属菌および *Actinobacillus* 属菌は、ウマの病原細菌としても重要な細菌種である。このようなことから本章では、第1節において *Enterobacter* 属菌、また第2節において *Actinobacillus* 属菌について、それぞれウマおよびウマ環境由来株の遺伝学的な検索および生化学性状試験を用いた菌種同定を行ない、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の同定結果と比較を行った。

第1節 ウマ由来 *Enterobacter* 属菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の問題点

緒言

Enterobacter 属菌は動物の腸管内や環境中に存在する常在菌であるが(Farmer, 1999)、ウマの感染性関節炎や尿路感染症の原因となることがある(van Spijk et al., 2016)。また、ウマの肺炎症例からの分離も報告されており(Sweeney et al., 1991)、日和見的な感染が問題となる細菌の一つである。

Enterobacter 属菌は、16S rRNA 遺伝子系統解析では菌種を正確に同定できないことが指摘されている(Clarridge, 2004; Janda & Abbott, 2007)。特に、*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter asburiae*、*Enterobacter hormaechei*、*Enterobacter kobei*、*Enterobacter ludwigii* を含む「*Enterobacter cloacae* complex」(Mezzatesta et al., 2012)は、遺伝配列の大部分を共有しているため(Hoffmann et al., 2005)、16S rRNA 遺伝子系統解析による識別は困難である。

また、*Enterobacter* 属菌の生化学性状試験による同定としては、bioMérieux 社のアピ 20 キットを代表とした市販のシステム等が用いられているが(O'hara, 2005)、本キットは 16S rRNA 系統解析に比べて参照データベースが充実しておらず、同定結果に矛盾が生じることがある(Mehnaz, 2010)。

Enterobacter 属菌を菌種レベルまで識別する方法として、多座配列解析 (multilocus sequence analysis: MLSA 法) に基づく分類学的評価が提案されている(Brady et al., 2013)。MLSA 法は、ハウスキーピング遺伝子 (*gyrB*、*rpoB*、*infB*、*atpD*) の配列により、系統関係を検討する(Brady et al., 2013)。MLSA 法は *Enterobacter* 属菌の菌種同定法として実際に使用されている(Iiyama et al., 2017; Liu & Tang, 2016)。

第1節では、ウマおよびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌について、MLSA 法を用いて菌種同定を試みた。また、*Enterobacter* 属菌の一般的な菌種同定法の一つである生化学性状試験を実施した。これらの手法による菌種同定の結果を踏まえ、本菌の MALDI-TOF MS を用いた同定の精度について検討を行なった。

材料と方法

1. 検討に使用した細菌株

第1章にてMALDI-TOF MSを用いた細菌同定法を行い、best match speciesが *Enterobacter* 属菌と提示されたウマおよびウマ環境由来株 30 株（1983 年～2016 年分離）を用いた（表 3-1）。MALDI-TOF MS による同定は第1章と同様に行ない、スコアは2回施行した平均値を求めた。

2. 分離株の DNA 抽出

分離株の DNA は、第1章と同様に市販の DNA 抽出キット（InstaGene Matrix）を用いて抽出された。

3. multilocus sequence analysis: MLSA 法による解析

既報(Brady et al., 2013)に従い、PCR 法により *gyrB*、*rpoB*、*infB*、*atpD* 遺伝子の増幅産物を得た。増幅プライマーには以下を用いた。

gyrB 01-F: 5'-TAA RTT YGA YGA YAA CTC YTA YAA AGT-3'

gyrB 02-R: 5'-CMC CYT CCA CCA RGT AMA GTT-3'

rpoB CM7-F: 5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG-3'

rpoB CM31b-R: 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'

atpD 01-F: 5'-RTA ATY GGM GCS GTR GTN GAY GT-3'

atpD 02-R: 5'-TCA TCC GCM GGW ACR TAW AYN GCC TG-3'

infB 01-F: 5'-ATY ATG GGH CAY GTH GAY CA-3'

infB 02-R: 5'-ACK GAG TAR TAA CGC AGA TCC A-3'

得られた増幅産物は、外部機関（株式会社ファスマック）にてシーケンスを行ない、塩基配列を得た。

得られた 4 遺伝子の塩基配列を統合し、GenBank から得た参照配列（accession number : JX424847-JX424873、JX424882-JX424888、JX424977-JX425003、JX425012-425018、JX425106-JX425132、JX425141-JX425147、JX425236-JX425262、JX425271-JX425277）とともに Clustal W を用いてアライメントし、最尤法系統樹を作成した。ブートストラップサンプリングは 1000 回行なった。アライメントおよび系統樹作成には MEGA 7.0 ソフトウェア (Kumar et al., 2016) を用いた。

4. 生化学性状試験

生化学性状試験には、市販のキット（アピ 20、bioMérieux）を用いて、市販データベース（アピウェブ; bioMérieux）から菌種の同定を行なった。なお、アピウェブには 7 種（*E. aerogenes*, *E. amnigenus* 1、*E. amnigenus* 2、*E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. gergoviae*）の *Enterobacter* 属菌が参照菌種として登録されている。

5. 菌種の同定

本節では、MLSA 法による解析で作成した系統樹から、菌種同定の最終的な判断を行なった。

結果

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法による同定結果および、MLSA 法を用いて作成した系統樹（図 3-1）による同定結果を表 3-2 に示す。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、30 株中 12 株は結果の一貫性が高い状態（第 1 章 表 1-1）で *E. cloacae* と同定されたが、残る 18 株は best match species と second best match species のスコアがともに 2.00 以上で異なる菌種が提示され、結果の一貫性が低い状態であった。

MLSA 法による検討では、30 株中 9 株 (*E. cloacae*-1、*E. cloacae*-4、*E. cloacae*-6、*E. cloacae*-7、*E. cloacae*-8、*E. cloacae*-9、*E. cloacae*-12、*E. cloacae*-14、Entero-89) は *E. ludwigii* の標準菌株 (LMG 23768^T) を含むクラスターに含まれていたことから、*E. ludwigii* と同定された。Entero-41 は *E. cloacae* の標準菌株 (LMG 2783^T) を含むクラスターに含まれ、*E. cloacae* と同定された。*E. cloacae*-15 は *E. asburiae* の標準菌株 (DSM 17506^T) を含むクラスターに含まれ、*E. asburiae* と同定された。15 株は、4 つのクラスターに分けられ、それぞれ Clade 1 (*E. cloacae*-5、*E. cloacae*-17)、Clade 2 ((*E. cloacae*-21、*E. coli*-160、Entero-17、Entero-19、Entero-157、Entero-191)、Clade 3 (*E. cloacae*-18、*E. cloacae*-20、Entero-3、Entero-194)、Clade 4 (*E. cloacae*-22、Entero-15、Entero-92) とした。残る 4 株 (*E. cloacae*-10、*E. cloacae*-16、Entero-181、Entero-190) はいずれのクラスターにも含まれなかった。また、生化学性状試験の結果、30 株はいずれも *Enterobacter cloacae* と同定された。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、一貫性が高い状態で同定された菌種と、MLSA 法による同定結果が一致したものは一株 (Enter-41) のみであった。また、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により best match species として提示された菌種と、MLSA 法

による同定結果が同一のものであった株は7株（E. cloacae-1、E. cloacae-7、E. cloacae-9、
E. cloacae-14、Entero-89、Enter-41、E. cloacae-15）であった。

考察

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、一貫性が高い結果が提示された 12 株は、いずれも *E. cloacae* と同定された。しかし、MLSA 法で *E. cloacae* と同定されたのは 12 株中 1 株 (Enter-41) のみであり、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の結果と矛盾が見られた。また、18 株は MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では一貫性の低い結果が示された。以上のことから、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、ウマおよびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌の同定においては、属までは決定できるものの、菌種間の区別の問題が見られると考えられた。

MALDI-TOF MS による同定に問題が見られる理由として、以下の二点が考えられた。第一に、*Enterobacter* 属菌は菌種同士が遺伝的に近縁であることが挙げられた。特に、*E. ludwigii* と *E. cloacae* を含むクラスターは、MLSA 法の系統樹において root を共有しており (図 3-1)、非常に近縁であると考えられた。遺伝的に近い *Enterobacter* 属菌同士は、MALDI-TOF MS が標的としているタンパク質の構造も類似していると考えられる。実際、市販のデータベースに登録されている *Enterobacter cloacae* complex に属する菌種 (*E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*) の波形は互いに類似している (図 3-2)。*Enterobacter* 属菌については、タンパク質構造の類似性が高いことから、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では区別ができない可能性が考えられた。第二に、参照データベースの不足が挙げられる。既存の参照データベース (ver. 5.0.0) には、*E. cancerogenus*, *E. hormaechei*, *E. cowanii*, *E. helveticus*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. radicincitans*, および *E. turicensis* について、それぞれ 1 種類の波形のみ登録されている (表 3-3)。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、一つの菌種内で複数のパターンの波形が含まれている参照データベースは、遺伝学的に類似した種を区別することができるが (van Prehn et al., 2016)、

データベースの構成によっては同定の信頼性が損なわれることが知られている (Khot et al., 2012)。現在の MALDI-TOF MS の参照データベースは、遺伝的に近縁である *Enterobacter* 属菌の同定には内容が不足している可能性が考えられた。

MLSA 法により作成した系統樹により Clade 1、2、3 および 4 に含まれた 15 株は、菌種の同定には至らなかったものの、既知の *Enterobacter* 属菌の近縁種と考えられた。Clade 1 および Clade 4 に含まれる分離株は、*E. cloacae* および *E. asburiae* の標準菌株を含むクラスターから分離した枝に分類されていたが、それぞれ root を共有していた。これらの株はそれぞれの種と近縁であり、*E. cloacae* 関連株または *E. asburiae* 関連株と考えられた。Clade 2 および Clade 3 に含まれる分離株は、*E. hormaechei* の標準菌株 (CCUG 27126^T) を含むクラスターから分離された枝に分類されたものの、root を共有していることから、*E. hormaechei* の近縁種であると考えられた。

生化学性状試験では 30 株全てが *E. cloacae* と同定されたが、うち一株 (*E. cloacae*-15) は MLSA 法により *E. asburiae* と同定された。*Enterobacter asburiae* の表現型は *E. cloacae* と類似しており、*E. asburiae* 分離株は生化学性状試験でしばしば *E. cloacae* と誤同定されるという報告がある (Miki et al., 1988)。この株についても、生化学性状試験では誤同定されたと考えられた。

今回の結果から、ウマおよびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌に関しては、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では属までの同定は可能であり、菌種まで同定を行うためには MLSA 法を用いた追加検査が必要であると考えられた。また、MALDI-TOF MS では菌種を区別できない理由の一つにデータベースの不足が挙げられることから、*Enterobacter* 属菌についてデータベースを充実させることで MALDI-TOF MS による菌種同定が可能となると考えられた。

第2節 ウマ由来 *Actinobacillus* 属菌における MALDI-TOF MS を用いた同定法の問題点

緒言

Actinobacillus 属菌は、動物の呼吸器や生殖器の常在細菌だが、一部の菌種については粘膜面の創などから組織に侵入し、病原性を示すと考えられている (Mutters, 1999)。中でも、*Actinobacillus pleuropneumoniae* は、ブタの胸膜肺炎の原因菌として有名である (Sebunya & Saunders, 1983)。

ウマから分離される *Actinobacillus* 属菌としては、*Actinobacillus equuli* subsp. *equuli*, *Actinobacillus equuli* subsp. *haemolyticus* が知られており、*Actinobacillus lignieresii* や *Actinobacillus pleuropneumoniae* も稀に分離されるという報告がある (Layman et al., 2014)。これらの *Actinobacillus* 属菌は、呼吸器感染症、敗血症、腹膜炎、乳房炎、関節炎、心内膜炎、髄膜炎、流産等、様々なウマの疾患を引き起こしうる (Kuhnert, Berthoud, Christensen, et al., 2003)。*A. equuli* subsp. *equuli* は、新生子馬の敗血症の原因である (Huang et al., 2015)。*A. equuli* subsp. *haemolyticus* は、成馬で致死性の肺出血を引き起こしたことが報告されている (Pusterla et al., 2008)。ウマにおいて、*Actinobacillus* 属菌は注意すべき病原細菌の一つと言える。

Actinobacillus 属菌の菌種同定については、表現型のみでの判別は困難であるが (Christensen & Bisgaard, 2004)、Repeat Toxin (RTX) ファミリーに属する毒素の解析が有効である場合がある。RTX ファミリーに属する毒素は、一部の *Actinobacillus* 属菌が産生し、溶血性および細胞毒性を示す (Berthoud et al., 2002; Kuhnert, Berthoud, Straub, et al., 2003)。*A. equuli* subsp. *haemolyticus* は、*aqx* 遺伝子がコードする *A. equuli* 毒素 (Aqx) を産生する点で、*A. equuli* subsp. *equuli* と区別することが可能である (Kuhnert, Berthoud,

Christensen, et al., 2003)。また、*apxICABD* 遺伝子、*apxIIICA* 遺伝子、*apxIIICABD* 遺伝子、*apxIVA* 遺伝子がコードする *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin I (Apx I)、Apx II、Apx III、ApxIV は、*A. pleuropneumoniae* の病原性に関係している (Schaller et al., 2000)。PCR 法による *apx* 遺伝子の解析は *A. pleuropneumoniae* の同定および型別に用いられてきた (Zhou et al., 2008)。また、*Actinobacillus suis* は Apx I と Apx II を産生することや (Kamp et al., 1994)、*A. lignieresii* は *apxICABD* を有しているが通常のプロモーター配列を持たないため Apx I の発現を欠いていることから (Schaller et al., 2000)、*apx* 遺伝子の解析はこれらの *Actinobacillus* 属菌の菌種同定にも使用されてきた。また、RTX ファミリーに属する毒素を産生する *Actinobacillus* 属菌について Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) 試験を行うと、陽性を示すことが知られている (Kuhnert, Berthoud, Straub, et al., 2003)。

第二節では、ウマ由来 *Actinobacillus* 属菌について、RTX 遺伝子の検索、CAMP 試験、生化学性状試験を行い、菌種同定を試みた。この結果を踏まえ、本菌の MALDI-TOF MS を用いた同定の精度について検討を行なった。

材料と方法

1. 検討に使用した細菌株

第 1 章にて MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を行い、best match species が *Actinobacillus* 属菌と提示されたウマおよびウマ環境由来株 51 株（1984 年～2015 年分離）を用いた（表 3-4）。MALDI-TOF MS による同定は第 1 章と同様に行なった。

2. 分離株の DNA 抽出

分離株の DNA は、第 1 章と同様に、市販の DNA 抽出キット（InstaGene Matrix）を用いて抽出された。

3. 16S rRNA 遺伝子系統解析

分離株の 16S rRNA 遺伝子系統解析は、第 2 章と同様に行った。

4. RTX ファミリーに属する毒素遺伝子の解析

既報(Berthoud et al., 2002)に従い、*aqx* 遺伝子に基づく Aqx 特異的 PCR を行った。増幅プライマーには以下を用いた。

AQXAPCR-L: 5'-ATT AGC GCA AGC AGG TAT CAA-3'

AQXAPCR-R: 5'-ATT GCC GGA CCA GTT GTA GAT A-3'

また、*apxI-apxIV* 遺伝子に基づく ApxI-ApxIV 特異的 PCR を既報(Frey et al., 1995; Zhou et al., 2008)に従って行った。増幅プライマーには以下を用いた。

apxICA 特異的プライマー

XICA-L: 5'-TTG CCT CGC TAG TTG CGG AT-3'

XICA-R: 5'-TCC CAA GTT CGA ATG GGC TT-5'

apxIIICA 特異的プライマー

XIICA-L: 5'-CCA TAC GAT ATT GGA AGG GCA AAT-3'

XIICA-R: 5'-TCC CCG CCA TCA ATA ACG GT-3'

apxIIICA 特異的プライマー

XIIICA-L: 5'-CCT GGT TCT ACA GAA GCG AAA ATC-3'

XIIICA-R: 5'-TTT CGC CCT TAG TTF GAT CGA-3'

apxIBD 特異的プライマー

XIBD-L: 5'-CTA YCG GCG GGA TTC CGT-3'

XIBD-R: 5'-ATC CGC ATC GGC TCC CAA-3'

apxIIIBD 特異的プライマー

XIIIBD-L: 5'-TCC AAG CAT GTC TAT GGA ACG-3'

XIIIBD2-R: 5'-AAC AGA ATC AAA ATC AGC TTG GTT-3'

apxIV 特異的プライマー

APXIVA1: 5'-TTA TCC GAA CTT TGG TTT AGC C-3'

APXIVA3: 5'-CAT ATT TGA TAA AAC CAT CCG TC-3'

5. Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) 試験

羊血液寒天培地 (Becton, Dickson and Company、Franklin Lakes、New Jersey、U. S. A.)

上に、*Staphylococcus aureus* JCM2874 株および分離株を直角に交差するように画線塗布し、

37℃にて一晩培養後、溶血帯を確認した。

6. 菌種の同定

本節では、16S rRNA 系統解析および RTX ファミリーに属する毒素の解析といった遺伝学的解析により菌種を同定し、CAMP 試験により溶血性を確認した。

結果

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法による同定結果、RTX ファミリーに属する毒素遺伝子の解析、CAMP 試験、16S rRNA 遺伝子系統解析により最も近縁であった菌種、および最終的な同定結果を表 3-5 に示す。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、51 株中 11 株は best match species と second best match species のスコアがともに 2.00 以上で異なる菌種が提示され、結果の一貫性が低い状態であった。

検討した 51 株中、1 株 (Pasteurella-4) は、16S rRNA 遺伝子系統解析から *Actinobacillus arthritidis* と同定された。11 株は、16S rRNA 系統解析で *A. equuli* subsp. *equuli* もしくは *A. equuli* subsp. *haemolyticus* が最も近縁であり、RTX ファミリーに属する毒素遺伝子を保有していないことから、*A. equuli* subsp. *equuli* と同定された。30 株は、*aqxA* 遺伝子を保有することから、*A. equuli* subsp. *haemolyticus* と同定された。2 株 (NE-146、NE-159) は、*apxIBD* および *apxIV* 遺伝子を保有することから、*A. pleuropneumoniae* と同定された。

3 株 (NE-2、NE-23、NE-151) は *Actinobacillus* 属菌ではあるものの、菌種同定には至らなかった。NE-2 は 16S rRNA 系統解析で *Actinobacillus hominis* と相同率 97.6% であり、*apxIBD* 遺伝子のみ保有していた。NE-23 は 16S rRNA 遺伝子系統解析で *A. lignieresii* と相同率 99.2%、*A. pleuropneumoniae* と相同率 99.0% であり、*apIBD* 遺伝子のみ保有していた。NE-151 は 16S rRNA 遺伝子系統解析で *A. hominis* と相同率 98.3% であり、RTX ファミリーに属する毒素遺伝子を保有していないことから菌種同定できなかった。また、16S rRNA 系統解析により、1 株 (NE-71) が *Mannheimia* 属菌、3 株 (NE-144、NE-147、NE-239) が *Pasteurella cabalii* と同定された。

最終的な同定結果と、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により best match species と

して提示された菌種とが同一であった株は、最終的に *A. equuli* subsp. *equuli* と同定された 11 株中 10 株、*A. equuli* subsp. *haemolyticus* と同定された 30 株中 18 株、*A. pleuropneumoniae* と同定された 2 株中 2 株であった。

考察

ウマおよびウマ環境由来 *Actinobacillus* 属菌については、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の結果と、RTX ファミリーに属する毒素遺伝子の解析、CAMP 試験、16S rRNA 遺伝子系統解析による菌種同定の結果が合致しない株が多く見られた。最終的に *A. equuli* subsp. *haemolyticus* と同定された株のうち、5 株 (Act. *equuli*-1、NE-29、NE-110、NE-178、NE-202) は、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、best match species として *A. suis* が提示された。また、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では *Actinobacillus* 属菌と同定されていたもののうち、1 株 (NE-71) は *Mannheimia* 属菌、3 株 (NE-144、NE-147、NE-239) は *Pasteurella caballi* と最終的に同定された。MALDI-TOF MS による細菌同定法は、非常に近縁である *A. equuli* の亜種同士を除けば *Actinobacillus* 属菌を区別することが可能であるという報告もあるが (Kuhnert et al., 2012)、今回の検討では本手法の *Actinobacillus* 属菌の同定精度には限界があると考えられた。

Actinobacillus 属菌の MALDI-TOF MS による同定に問題が見られる理由として、*Enterobacter* 属菌と同様に遺伝的に近縁であること (第 2 章図 2-1)、参照データベースの内容が不足していることが挙げられる。特に、既存の参照データベース (ver. 5.0.0) については、*A. equuli*、*A. lignieresii*、*A. suis* について登録されている波形はそれぞれ一種類のみであった (表 3-6)。また、*Mannheimia* 属菌や *Pasteurella caballi* は、既存の参照データベースは波形が登録されていなかったため、今回の検討では *Actinobacillus* 属菌と誤同定されたと考えられた。*Mannheimia* 属菌や *P. caballi* はいずれも *Pasteurella* 科に属する細菌種であり、特に *P. caballi* はウマの呼吸器や生殖器感染症への関与が示唆されている (Schlater et al., 1989)。ウマ由来の *Actinobacillus* 属菌や *Pasteurella* 科の細菌同定に際しては、既存のデータベースでは登録されている波形が不足していることが考えられた。

RTX ファミリーに属する毒素を産生する *Actinobacillus* 属菌について CAMP 試験を行うと、Apx や Aqx の溶血性が *S. aureus* の産生するスフィンゴミエリナーゼにより増強され、CAMP 活性を示すと考えられている (Berthoud et al., 2002; Frey et al., 1994)。今回検討を行なった株の一部には、*aqx* 遺伝子の PCR 結果と CAMP 試験との結果に矛盾が生じる株が認められた。1 株の *aqx* 陽性株 (NE-60) は CAMP 活性を示さず、*aqx* 陰性株 10 株は CAMP 活性を示した。NE-60 については、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法や 16S rRNA 系統解析では *A. rossii* が提示されており、*A. equuli* subsp. *haemolyticus* の変異株である可能性がある。また、過去には PCR 法では *aqx* 遺伝子が検出されないが CAMP 試験陽性である *A. equuli* subsp. *equuli* 株の存在が報告されており、この株についてはプライマー結合部位の遺伝子変異が指摘されている (Moyaert et al., 2007)。今回認められた *aqx* 陰性 CAMP 活性陽性株についても、*aqx* 特異的 PCR のプライマー結合部位の変異により、*aqx* 遺伝子が検出されなかった可能性がある。CAMP 試験陽性の *A. equuli* subsp. *equuli* 株については、*aqx* 遺伝子周辺のシーケンスも含め、遺伝的な解析を中心とした追加検索が必要であると考えられる。

小括

本章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では結果の信頼性に問題が見られた、ウマおよびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌、*Actinobacillus* 属菌について、他手法による菌種同定を行なった。検討した株の多くで MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法と他手法による同定結果との矛盾が生じていた。これらの細菌種については、菌種同士が遺伝的に近縁であることや、既存のデータベースの不足が指摘された。これらの細菌種を MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法にて同定する際には、生化学性状試験や遺伝学的検索などの追加検査を行うことが、同定精度の向上に必要であると考えられた。

表

表 3-1 ウマおよびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌 30 株の分離年と分離症例

菌株番号	分離年	分離症例
E.cloacae-1	1983	不明
E.cloacae-4	1983	不明
E.cloacae-5	1983	不明
E.cloacae-6	1983	不明
E.cloacae-7	1983	不明
E.cloacae-8	1983	不明
E.cloacae-9	1983	不明
E.cloacae-10	1983	不明
E.cloacae-12	1983	不明
E.cloacae-14	1983	不明
E.cloacae-15	1983	不明
E.cloacae-16	1985	不明
E.cloacae-17	1985	不明
E.cloacae-18	1988	下痢症
E.cloacae-20	1991	子宮炎
E.cloacae-21	1991	子宮炎
E.coli-160	1992	敗血症
E.cloacae-22	1995	喉嚢炎
Entero-3	1999	肺炎
Entero-15	2000	肺炎
Entero-17	2000	喉嚢炎
Entero-19	2000	肺炎
Enter-41	2004	肺炎
Entero-89	2010	肺炎
Entero-92	2011	肺炎
Entero-157	2015	手術部位感染
Entero-181	2016	蹄膿瘍
Entero-190	2016	胸水
Entero-191	2016	手術部位感染
Entero-194	2016	フレグモーン

表 3-2 MLSA 法と MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法による *Enterobacter* 属菌 30 株の同定結果

菌株番号	MLSA 法	MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法			
		Best match		Second best match	
		Species	スコア	Species	スコア
E.cloacae-1	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. ludwigii</i>	2.340	<i>E. cloacae</i>	2.280
E.cloacae-4	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. cloacae</i>	2.345	<i>E. ludwigii</i>	2.285
E.cloacae-6	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. cloacae</i>	2.440	<i>E. ludwigii</i>	2.295
E.cloacae-7	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. ludwigii</i>	2.375	<i>E. cloacae</i>	2.375
E.cloacae-8	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. cloacae</i>	2.380	<i>E. ludwigii</i>	2.375
E.cloacae-9	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. ludwigii</i>	2.295	<i>E. cloacae</i>	2.220
E.cloacae-12	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. cloacae</i>	2.380	<i>E. ludwigii</i>	2.335
E.cloacae-14	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. ludwigii</i>	2.385	<i>E. cloacae</i>	2.320
Entero-89	<i>E. ludwigii</i>	<i>E. ludwigii</i>	2.360	<i>E. cloacae</i>	2.325
Enter-41	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	2.265	<i>E. cloacae</i>	2.195
E.cloacae-15	<i>E. asburiae</i>	<i>E. asburiae</i>	2.290	<i>E. cloacae</i>	2.125
E.cloacae-5	Clade 1	<i>E. cloacae</i>	2.265	<i>E. asburiae</i>	2.390
E.cloacae-17	Clade 1	<i>E. asburiae</i>	2.225	<i>E. kobei</i>	2.115
E.cloacae-21	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.330	<i>E. cloacae</i>	2.215
E.coli-160	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.315	<i>E. cloacae</i>	2.290
Entero-17	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.320	<i>E. cloacae</i>	2.295
Entero-19	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.310	<i>E. cloacae</i>	2.270
Entero-157	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.380	<i>E. cloacae</i>	2.255
Entero-191	Clade 2	<i>E. cloacae</i>	2.335	<i>E. cloacae</i>	2.300
E.cloacae-18	Clade 3	<i>E. cloacae</i>	2.335	<i>E. cloacae</i>	2.200
E.cloacae-20	Clade 3	<i>E. cloacae</i>	2.385	<i>E. cloacae</i>	2.290
Entero-3	Clade 3	<i>E. cloacae</i>	2.285	<i>E. cloacae</i>	2.250
Entero-194	Clade 3	<i>E. cloacae</i>	2.335	<i>E. cloacae</i>	2.315
E.cloacae-22	Clade 4	<i>E. asburiae</i>	2.340	<i>E. cloacae</i>	2.310
Entero-15	Clade 4	<i>E. asburiae</i>	2.345	<i>E. cloacae</i>	2.195
Entero-92	Clade 4	<i>E. asburiae</i>	2.300	<i>E. cloacae</i>	2.085
E.cloacae-10	other isolates	<i>E. ludwigii</i>	2.350	<i>E. cloacae</i>	2.340
E.cloacae-16	other isolates	<i>E. asburiae</i>	2.220	<i>E. cloacae</i>	2.160
Entero-181	other isolates	<i>E. kobei</i>	2.190	<i>E. asburiae</i>	2.170
Entero-190	other isolates	<i>E. cloacae</i>	2.420	<i>E. cloacae</i>	2.335

表 3-3 既存のデータベース内に登録されている *Enterobacter* 属菌の波形の数

菌種	波形の数
<i>Enterobacter amnigenus</i>	6
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1
<i>Enterobacter asburiae</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	14
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1
<i>Enterobacter cowanii</i>	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	11
<i>Enterobacter helveticus</i>	1
<i>Enterobacter kobei</i>	1
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1
<i>Enterobacter pulvenis</i>	3
<i>Enterobacter pyrinus</i>	2
<i>Enterobacter radicincitans</i>	1
<i>Enterobacter turicensis</i>	1

表 3-4 ウマおよびウマ環境由来 *Actinobacillus* 属菌 51 株の分離年と分離材料

菌株番号	分離年	分離症例
Act.equuli-1	1984	不明
Act.equuli-2	1984	不明
Act.equuli-3	1984	不明
Act.equuli-4	1984	不明
Act.equuli-5	1985	関節炎
Act.equuli-6	1985	関節炎
Act.equuli-7	1985	関節炎
Act.equuli-8	1985	関節炎
Act.equuli-9	1985	関節炎
Act.equuli-10	1985	関節炎
Act.equuli-11	1985	関節炎
Act.equuli-12	1984	関節炎
Moraxella-1	1985	不明
Moraxella-2	1985	関節炎
Moraxella-3	1984	関節炎
Moraxella-4	1984	関節炎
Pasturella-4	1992	不明
Pasturella-5	1993	敗血症
NE-1	1996	喉嚢炎
NE-2	1996	腸炎
NE-23	1999	肺炎
NE-26	2000	輸送熱
NE-28	2000	輸送熱
NE-29	2000	輸送熱
NE-60	2000	輸送熱
NE-71	2000	肺炎
NE-72	2000	肺炎
NE-75	2000	肺炎
NE-77	2000	肺炎
NE-87	2001	肺炎

NE-109	2002	喉嚢炎
NE-110	2002	肺炎
NE-111	2002	肺炎
NE-119	2003	敗血症
NE-134	2004	血管炎
NE-135	2004	血管炎
NE-136	2004	血管炎
NE-144	2005	肺炎
NE-146	2006	肺炎
NE-147	2006	肺炎
NE-151	2007	不明
NE-155	2008	血管炎
NE-159	2009	リンパ節炎
NE-178	2010	肺炎
NE-185	2011	心内膜炎
NE-186	2011	肺炎
NE-202	2013	肺炎
NE-204	2013	肺炎
NE-238	2015	膿瘍
NE-239	2015	挫跖
NE-240	2015	挫跖

表 3-5 MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法、RTX ファミリーに含まれる毒素遺伝子の PCR、CAMP 試験、16S rRNA 系統解析による *Actinobacillus* 属菌 51 株の同定結果

菌株番号	最終的な同定結果	MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法							16S rRNA 系統解析(相同性%)	
		Best match	species	species	best	match	スコア	RTX	CAMP	
		species	スコア	Second	best	match	スコア	RTX	CAMP	
Pasturella-4	<i>A. arthritidis</i>	<i>A. ureae</i>	1.87	<i>A. suis</i>			1.75	-	-	<i>A. arthritidis</i> (99.84)
Act.equuli-2	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	1.98	<i>A. suis</i>			1.95	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
Act.equuli-3	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.15	<i>A. suis</i>			1.96	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.52)
Act.equuli-5	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.15	<i>A. suis</i>			1.96	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (100)
Pasturella-5	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.04	<i>A. suis</i>			1.96	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.86)
NE-119	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.10	<i>A. suis</i>			2.07	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
NE-134	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.07	<i>A. ureae</i>			1.93	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.79)
NE-135	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.17	<i>A. ureae</i>			1.96	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.79)
NE-136	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.09	<i>A. suis</i>			2.04	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.72)
NE-155	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.02	<i>A. suis</i>			1.90	-	-	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (100)
NE-185	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. suis</i>	2.00	<i>A. ureae</i>			1.99	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-240	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	<i>A. equuli</i>	2.11	<i>A. suis</i>			1.93	-	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.72)
Act.equuli-1	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.01	<i>A. equuli</i>			1.98	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (100)
Act.equuli-4	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. ureae</i>	2.00	<i>A. equuli</i>			2.00	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.72)
Act.equuli-6	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.02	<i>A. ureae</i>			1.95	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
Act.equuli-7	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.15	<i>A. equuli</i>			2.13	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)

Act.equuli-8	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	1.99	<i>A. suis</i>	1.94	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
Act.equuli-9	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	1.92	<i>A. suis</i>	1.73	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
Act.equuli-10	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. ureae</i>	2.00	<i>A. suis</i>	1.90	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
Act.equuli-11	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.06	<i>A. suis</i>	1.97	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.72)
Act.equuli-12	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.09	<i>A. suis</i>	2.05	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.79)
Moraxella-1	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.05	<i>A. suis</i>	1.95	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
Moraxella-2	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.21	<i>A. suis</i>	2.09	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
Moraxella-3	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	1.91	<i>A. equuli</i>	1.84	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.93)
Moraxella-4	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	1.97	<i>A. suis</i>	1.94	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (100)
NE-1	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.07	<i>A. suis</i>	1.99	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-26	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.08	<i>A. suis</i>	2.00	<i>aqxA</i>	+	<i>A. suis</i> (99.72)
NE-28	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.08	<i>A. suis</i>	1.88	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-29	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	1.98	<i>A. equuli</i>	1.96	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-60	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. rossii</i>	2.38	<i>A. rossii</i>	2.38	<i>aqxA</i>	-	<i>A. rossii</i> (98.93)
NE-72	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.03	<i>A. ureae</i>	1.95	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-75	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.02	<i>A. suis</i>	1.91	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-77	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.04	<i>A. suis</i>	1.94	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-87	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.00	<i>A. equuli</i>	1.95	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-109	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.02	<i>A. suis</i>	1.96	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-110	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.18	<i>A. equuli</i>	2.02	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-111	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	1.93	<i>A. suis</i>	1.89	<i>aqxA</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)

NE-178	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.06	<i>A. equuli</i>	1.95	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.87)
NE-186	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	1.92	<i>A. suis</i>	1.80	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.93)
NE-202	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.06	<i>A. equuli</i>	2.04	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i> (99.86)
NE-204	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. suis</i>	2.13	<i>A. equuli</i>	2.08	<i>aqx4</i>	+	<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i> (99.86)
NE-238	<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	<i>A. equuli</i>	2.03	<i>A. suis</i>	1.98	<i>aqx4</i>	+	<i>A. suis</i> (99.51)
NE-146	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>	2.16	<i>A. lignieresii</i>	1.98	<i>apxIBD,</i> <i>apxIV</i>	-	<i>A. lignieresii</i> (98.89)
NE-159	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>	2.07	<i>A. lignieresii</i>	1.90	<i>apxIBD,</i> <i>apxIV</i>	-	<i>A. lignieresii</i> (98.59)
NE-2	<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>A. lignieresii</i>	1.83	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1.75	<i>apxIBD</i>	-	<i>A. hominis</i> (97.59)
NE-23	<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>A. pleuropneumoniae</i>	2.03	<i>A. lignieresii</i>	2.01	<i>apxIBD</i>	-	<i>A. lignieresii</i> (99.23)
NE-151	<i>Actinobacillus</i> sp.	<i>A. lignieresii</i>	1.77	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1.76	-	-	<i>A. hominis</i> (98.34)
NE-71	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>A. equuli</i>	2.04	<i>A. suis</i>	1.95	-	-	<i>Mannheimia caviae</i> (98.57)
NE-144	<i>Pasteurella cabalii</i>	<i>A. rossii</i>	2.04	<i>A. rossii</i>	2.01	-	-	<i>Pasteurella cabalii</i> (100)
NE-147	<i>Pasteurella cabalii</i>	<i>A. rossii</i>	1.88	<i>A. rossii</i>	1.84	-	-	<i>Pasteurella cabalii</i> (99.61)
NE-239	<i>Pasteurella cabalii</i>	<i>A. rossii</i>	1.87	<i>A. rossii</i>	1.87	-	-	<i>Pasteurella cabalii</i> (100)

表 3-6 既存のデータベース内に登録されている *Actinobacillus* 属菌の波形の数

菌種	波形の数
<i>A. delphinicola</i>	1
<i>A. equuli</i>	1
<i>A. lignieresii</i>	1
<i>A. pleuropneumoniae</i>	2
<i>A. rossii</i>	4
<i>A. suis</i>	1
<i>A. ureae</i>	1

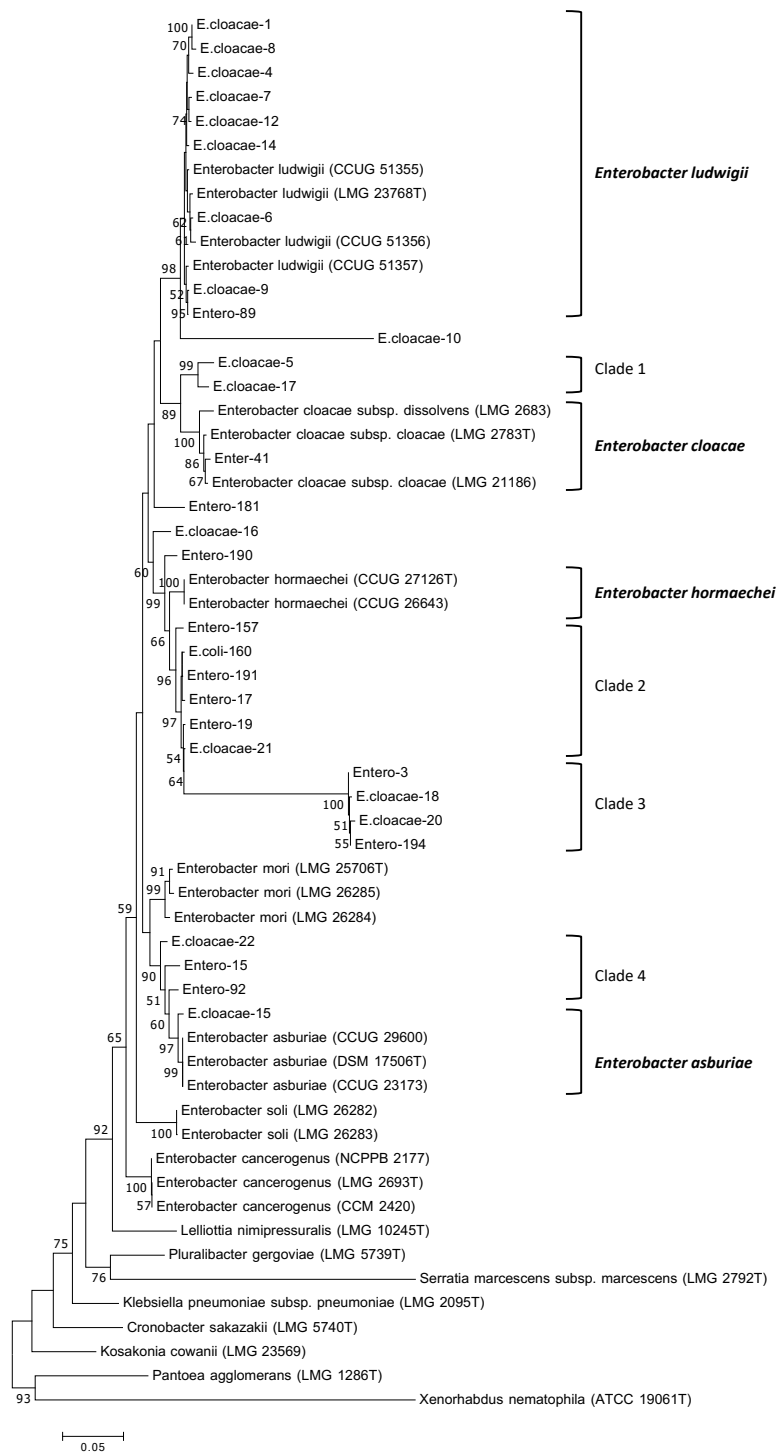


図 3-1 *gyrB*、*rpoB*、*atpD*、*infB* 遺伝子塩基配列に基づく *Enterobacter* 属菌の代表的な種と本研究で検討したウマ由来分離株の系統樹。

第4章 ウマ由来細菌に特化した MALDI-TOF MS を用いた細菌同定 用データベースの作成

緒言

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、同定の正確性は参照データベースに含まれる菌種の数に依存することが知られており、複数の波形を含むデータベースによって遺伝的に近縁な菌種に関しても区別が可能になると考えられている (van Prehn et al., 2016)。反対に、データベースの構成や波形のバリエーションが不足していた場合、信頼性に乏しい同定結果を得る可能性が指摘されている (Khot et al., 2012)。

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、既存のデータベースの他に、使用者の必要に応じて独自のデータベースを構築し使用することが可能である。過去には、偏性嫌気性菌で大規模な独自データベースを作成した例が報告されている (Veloo et al., 2018)。

本研究では、第1章の検討においてウマ由来およびウマ環境由来細菌についても MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により大部分を同定可能であることが示された。一方、一部の菌種については同定に問題が見られたため、第2章および第3章で追加検索を行い、参照データベースの不足が指摘されていた。これらの既存のデータベースでは同定に問題が見られるウマ由来細菌について独自のデータベースを構築することで、より多くのウマ由来細菌について MALDI-TOF MS による同定が可能になると予想される。

本章では、第2章および第3章で追加検索を行った細菌株を用いて、ウマ由来細菌に特化したデータベース (in-house database) を構築した。さらに、新たに得られたウマ由来細菌株を用いて、in-house database の評価を行った。

材料と方法

1. in-house database の構築

in-house database の構築には、第 2 章で菌種を同定した株のうち 230 株、第 3 章第 1 節で菌種を同定した *Enterobacter* 属菌 11 株、第 3 章第 2 節で菌種を同定した *Actinobacillus* 属菌のうち 41 株、計 282 株を用いた（表 4-1）。

各菌種の波形の情報である main spectral profiles (MSPs) を構築するために、各分離株について Bruker Japan 社の推奨する「エタノール・ギ酸抽出法」による処理を行った。まず、各分離株について、新鮮な純培養コロニー 1 μ L 程度を 1.5mL の 75%エタノールに懸濁した。懸濁液は 13,000rpm で 2 分間遠心操作し、上清を取り除いた。沈渣を 20 μ L 程度の 70%ギ酸と等量のアセトニトリルに懸濁し、さらに 13,000rpm で 2 分間遠心操作を行った。

エタノール・ギ酸抽出法により得られた上清は、一株あたりターゲットプレート上 8 スポットに滴下し、風乾後 α -cyano-4 hydroxycinnamic acid matrix solution を加えた。flexControl 3.4 ソフトウェア(Bruker Japan)を用いて各スポットを 3 回ずつ計測し、一株あたり計 24 回の計測を行った。得られた波形は flexAnalysis 3.4 ソフトウェア (Bruker Japan)を用いて確認し、他と大幅に異なる波形は消去した。さらに、MBT Compass Explorer 4.1.7.0. ソフトウェア (Bruker Japan)を用いて MSP を作成した。

2. in-house database を用いたウマ由来株の再同定

in-house database による同定精度の評価のために、2016 年から 2019 年に新たにウマから分離された 568 株のうち、92 株の細菌株について再同定を行った。92 株は、MALDI Biotyper の既存のデータベース (Bruker library ver. 8.0.0) を用いた同定では best match species のスコアが 2.00 未満であり、菌種レベルでの同定に至らなかった株である。分離株

は、グラム染色による形態的観察、酸素要求性および市販の生化学試験キット（アピマニユアルキット、bioMérieux）を用いた生化学的性状の検索により、腸内細菌科細菌（2 株）、その他グラム陰性桿菌（*Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌）（15 株）、レンサ球菌（19 株）、ブドウ球菌（22 株）、*Rhodococcus* 属菌（1 株）、その他グラム陽性桿菌（*Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌）（17 株）、偏性嫌気性菌（16 株）に分類した。

分離株は、in-house database と既存のデータベース（Bruker library ver. 8.0.0）を組み合わせたデータベース（強化データベース）を用いて同定を行った。同定操作および同定結果の評価は、第 1 章と同様に行った。統計学的処理には、EZR ソフトウェア（自治医科大学埼玉医療センター、埼玉、日本）（Kanda, 2013）を用いて、Wilcoxon の符号順位検定を行った。

結果

作成した in-house database は、32 属、77 菌種を含む 282 の MSPs から構成された（表 4-1）。また、既存のデータベース（ver. 8.0.0）は 8603 の MSPs を含んでおり、計 8885 の MSPs を含む強化データベースが作成された。

強化データベースにより、再同定を行った 92 株中 16 株が、菌種レベルでの同定（スコアが 2.00 以上）となった（図 4-1）。16 株の内訳は、その他グラム陰性桿菌（*Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌）15 株中 8 株、レンサ球菌 19 株中 3 株、*Rhodococcus* 属菌 1 株中 1 株、その他グラム陽性桿菌（*Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌）17 株中 4 株であった（表 4-2）。92 株の同定スコア平均値は、既存のデータベース使用時は 1.64 であったが、強化データベース使用時は 1.77 に上昇した（ $P < 0.001$ ）。細菌のグループ別に見ると、強化データベースの使用により、その他のグラム陰性桿菌（ $P = 0.01$ ）、レンサ球菌（ $P = 0.1$ ）、グラム陽性桿菌（ $P = 0.06$ ）の平均同定スコアが上昇した（表 4-3）。92 株中 76 株については強化データベースを用いた際にも菌種同定には至らなかったが、2 株（Strep368 および anaero379）のスコアは上昇した（表 4-2）。残る 74 株については、スコアの変化は見られなかった。

考察

本章では、ウマおよびウマ環境由来細菌株を用いて in-house database を構築し、既存のデータベースでは菌種レベルでの同定ができなかったウマ由来株の再同定を行った。既存のデータベースでは、2016 年から 2019 年にウマから分離された 568 株中 476 株 (83.8%) が同定できたが、強化データベースを用いることで同定可能である株がさらに 16 株増加した。すなわち、強化データベースを用いることで、ウマ由来株 568 株中 492 株 (86.6%) が同定可能となった。強化データベースにより同定可能となった株数は 2.8% であり、大きな変化とは言えないが、in-house database の導入はウマ由来細菌の同定精度向上に貢献すると思われる。

また、強化データベースで同定可能となった株の中には *Actinobacillus* 属が多く含まれた。第 3 章第 2 節でも紹介したように、*Actinobacillus equuli* の亜種はともにウマの病原細菌として知られており、本菌を正確に同定することはウマの病態の理解と治療法の選択に重要であると考えられる。しかし、既存のデータベースには *A. equuli* の登録株は 1 株のみであり、このことは MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では *A. equuli* の同定に問題が見られる原因の一つと考えられた。今回、in-house database に *A. equuli* subsp. *equuli* として 11 の MSP を、*A. equuli* subsp. *haemolyticus* として 29 の MSP を追加した結果、ウマ由来 *A. equuli* 分離株が同定可能となった。in-house database の導入は、ウマ由来細菌の中でも、特にウマ由来 *Actinobacillus* 属菌の同定精度上昇に貢献したと考えられた。

一方、今回検討したウマ由来ブドウ球菌や偏性嫌気性菌は、強化データベースを用いても同定を行うことができなかった。今回作成した in-house database には、16S rRNA 系統解析で菌種を同定可能であったブドウ球菌や偏性嫌気性菌株のみを導入したが、ウマおよびウマ環境由来株の同定には不十分であった可能性が考えられる。*Staphylococcus* 属菌にお

いては、*rpoB* 遺伝子が菌種同定に貢献することが報告されている (Drancourt & Raoult, 2002; Ghebremedhin et al., 2008)。また、16S-23S rRNA 遺伝子の解析は、16S rRNA 遺伝子のみの解析と比較して解像度が高く、近縁種の区別を行うことも可能であることが報告されている (Sabat et al., 2017)。16S rRNA 遺伝子系統解析では菌種を同定できなかった *Staphylococcus* 属菌や偏性嫌気性菌について、*rpoB* 遺伝子や 16S-23S rRNA 遺伝子などの検索により菌種同定ができる可能性がある。さらに、同定された株について MSPs の追加登録をすることで、これらの細菌株についても同定可能なデータベースを構築できると考えられる。

第3章第1節で検討を行ったウマ由来 *Enterobacter* 属菌については、今回再同定を行った 92 株の中に *Enterobacter* 属菌が含まれなかったため、同定精度についての検討ができなかった。本章での検討には含まれなかったが、既存のデータベースでは結果の「一貫性が低い」状態であった (best match species と second best match species のスコアがともに 2.00 以上で異なる菌種が提示された) ウマ由来細菌株について、強化データベースでの再同定を行なった。この結果、best match species と second best match species のスコアがともに 2.00 以上で同一の菌種が提示された株が一株認められた (表 3-4)。今後、新たに分離されるウマ由来 *Enterobacter* 属菌が集積すれば、強化データベースの *Enterobacter* 属菌同定に対する効果についても考察を行うことが可能になると考えられる。

Corynebacterium 属菌の中では、*C. pseudotuberculosis* はウマのリンパ節炎の原因菌として知られている (Corbeil et al., 2016)。本章では、強化データベースによりその他のグラム陽性桿菌のうち 4 株が *Corynebacterium stationis* と同定された。*Corynebacterium stationis* はヒトの臨床検体からの分離報告があるが (Bernard et al., 2010)、ウマの病態との関連性については明らかとなっていない。本章で *C. stationis* と同定された分離株は、い

ずれも感染性角膜炎症例の角膜スワブから分離されていた。一方で、*Corynebacterium* 属菌はウマの眼結膜常在菌でもありと考えられており (LaFrentz et al., 2020; Scott et al., 2019)、*C. stationis* とウマの眼科疾患との関連性については、分離症例を追加して検討を行う必要があると考えられた。

小括

本章では、ウマおよびウマ由来細菌株を用いて、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法における in-house database を構築した。さらに、本データベースを用いて新たに分離されたウマ由来細菌株の再同定を行った結果、既存のデータベースでは同定ができなかった株の一部が in-house database の導入により同定可能になった。in-house database の構築と導入が、MALDI-TOF MS を用いたウマ由来細菌の同定精度の向上に貢献することを示した。

表

表 4-1 in-house database に main spectral profiles(MSPs)として追加された細菌種

属	菌種
<i>Aeromonas</i>	<i>salmonicida</i> (1)*
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i> (1), <i>Iwoffii</i> (1), <i>pittii</i> (1)
<i>Actinobacillus</i>	<i>arthritidis</i> (1), <i>equuli subsp. equuli</i> (11), <i>equuli subsp. haemolyticus</i> (29)
<i>Aeromonas</i>	<i>bestiarum</i> (1)
<i>Arthrobacter</i>	<i>mysorens</i> (1)
<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i> (1)
<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i> (5), <i>helcogenes</i> (1), <i>ovatus</i> (2), <i>pyogenes</i> (1), <i>thetaiotaomicron</i> (1)
<i>Brevibacterium</i>	<i>luteolum</i> (1), <i>bullata</i> (1),
<i>Clostridioides</i>	<i>difficile</i> (19)
<i>Clostridium</i>	<i>argentinense</i> (1), <i>orbiscindens</i> (1), <i>perfringens</i> (3)
<i>Corynebacterium</i>	<i>stationis</i> (2), <i>ulceribovis</i> (1), <i>uterequi</i> (1)
<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i> (1), <i>cloacae</i> (1), <i>ludwigii</i> (9)
<i>Erwinia</i>	<i>billingiae</i> (1)
<i>Exiguobacterium</i>	<i>sibiricum</i> (1)
<i>Fusobacterium</i>	<i>varium</i> (1)
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> (4)
<i>Leucobacter</i>	<i>chironomi</i> (1)
<i>Macrococcus</i>	<i>brunensis</i> (1), <i>caseolyticus</i> (2)
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i> (3)
<i>Moraxella</i>	<i>cuniculi</i> (1)
<i>Nicoletella</i>	<i>semolina</i> (5)
<i>Oligella</i>	<i>ureolytica</i> (1)
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i> (3), <i>ananatis</i> (1), <i>deleyi</i> (1)
<i>Pasteurella</i>	<i>caballi</i> (6)
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i> (12)
<i>Prevotella</i>	<i>dentasini</i> (5), <i>heparinolytica</i> (5)
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> (1)

<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i> (1)
	<i>aeruginosa</i> (1), <i>chlororaphis</i> (2), <i>granadensis</i> (5), <i>jessenii</i> (1),
<i>Pseudomonas</i>	<i>libanensis</i> (1), <i>migulae</i> (1), <i>monteilii</i> (21), <i>mosselii</i> (1),
	<i>oryzihabitans</i> (1), <i>otitidis</i> (3), <i>pseudoalcaligenes</i> (1), <i>teessidea</i> (4)
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i> (42)
	<i>condimenti</i> (1), <i>equorum subsp. equorum</i> (1), <i>hyicus</i> (1),
<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i> (1), <i>saprophyticus subsp. saprophyticus</i> (5), <i>sciuri</i> (2), <i>stepanovicii</i> (1)
<i>Streptococcus</i>	<i>canis</i> (1), <i>equi subsp. equi</i> (1), <i>parauberis</i> (1), <i>pneumoniae</i> (2),
	<i>orisasini</i> (1), <i>rifensis</i> (1),
<i>Taylorella</i>	<i>equigenitalis</i> (24)

* 作成した MSP の数

表 4-2 既存のデータベースに in-house database を加えたもの（強化データベース）による同定で、スコアの上昇が見られたウマ由来細菌株についての同定結果とスコア

同定に使用したデータベース					
分類	菌株番号	既存のデータベース		強化データベース	
		同定結果	スコア	同定結果	スコア
その他グラム陰性桿菌***	Entero231	<i>Actinobacillus</i> sp.*	1.80	<i>Actinobacillus arthritidis</i>	2.31
	NE263	<i>Actinobacillus</i> sp.	1.98	<i>Actinobacillus equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	2.55
	NE274	**	1.50	<i>Nicoletella semolina</i>	2.46
	NE277		1.26	<i>Moraxella cuniculi</i>	2.45
	NE313	<i>Actinobacillus</i> sp.	1.99	<i>Actinobacillus equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	2.56
	NE314	<i>Actinobacillus</i> sp.	1.99	<i>Actinobacillus equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	2.52
	NE318	<i>Actinobacillus</i> sp.	1.89	<i>Actinobacillus arthritidis</i>	2.49
	NE322	<i>Haemophilus</i> sp.	1.91	<i>Pasteurella caballi</i>	2.53
	Strep336	<i>Streptococcus</i> sp.	1.99	<i>Streptococcus orisani</i>	2.72
	Strep340		1.47	<i>Streptococcus rifensis</i>	2.21
レンサ球菌	Strep347	<i>Streptococcus</i> sp.	1.74	<i>Streptococcus rifensis</i>	2.62
	Strep368		1.57	<i>Streptococcus</i> sp.	1.78
	2018-10	<i>Rhodococcus</i> sp.	1.99	<i>Rhodococcus equi</i>	2.25
<i>Rhodococcus</i> 属菌					

その他グラム陽性桿菌****	G+R81	<i>Corynebacterium</i> sp.	1.91	<i>Corynebacterium stationis</i>	2.38
	G+R90		1.52	<i>Corynebacterium stationis</i>	2.44
	G+R103		1.61	<i>Corynebacterium stationis</i>	2.42
	G+R106		1.36	<i>Corynebacterium stationis</i>	2.03
偏性嫌気性菌	anaero379		1.29		1.45

* 属レベルでの同定（スコアが1.70 以上2.00 未満）

**空欄 同定不可（スコアが1.70 未満）

****Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌）

*****Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌）

表 4-3 既存のデータベース（Bruker library）と既存のデータベースに in-house database を加えたもの（強化データベース）を用いて、ウマ由来細菌株 92 株を同定し、分類ごとに平均スコアを算出した

分類(株数)	同定に使用したデータベース	
	既存のデータベース	強化データベース
腸内細菌科 (2)	1.77	1.77
その他グラム陰性桿菌* (15)	1.76	2.13
レンサ球菌 (19)	1.66	1.80
ブドウ球菌 (22)	1.85	1.85
<i>Rhodococcus</i> 属菌 (1)	1.99	2.25
その他グラム陽性桿菌** (17)	1.49	1.66
偏性嫌気性菌 (16)	1.36	1.37
平均	1.64	1.77

* *Taylorella* 属菌および腸内細菌科細菌以外のグラム陰性桿菌)

** *Rhodococcus* 属菌以外のグラム陽性桿菌)

表 4-4 ウマ由来 *Enterobacter* 属分離株について、既存のデータベース (Bruker library) と既存のデータベースに in-house database を加えたもの (強化データベース) による同定結果とスコア

同定に使用したデータベース												
既存のデータベース						強化データベース						
菌株名	Best species	match	スコア	Second species	best match	スコア	Best species	match	スコア	Second species	best match	スコア
Entero-204	<i>Enterobacter cloacae</i>		2.27	<i>Enterobacter ludwigii</i>		2.02	<i>Enterobacter ludwigii</i>		2.44	<i>Enterobacter ludwigii</i>		2.43

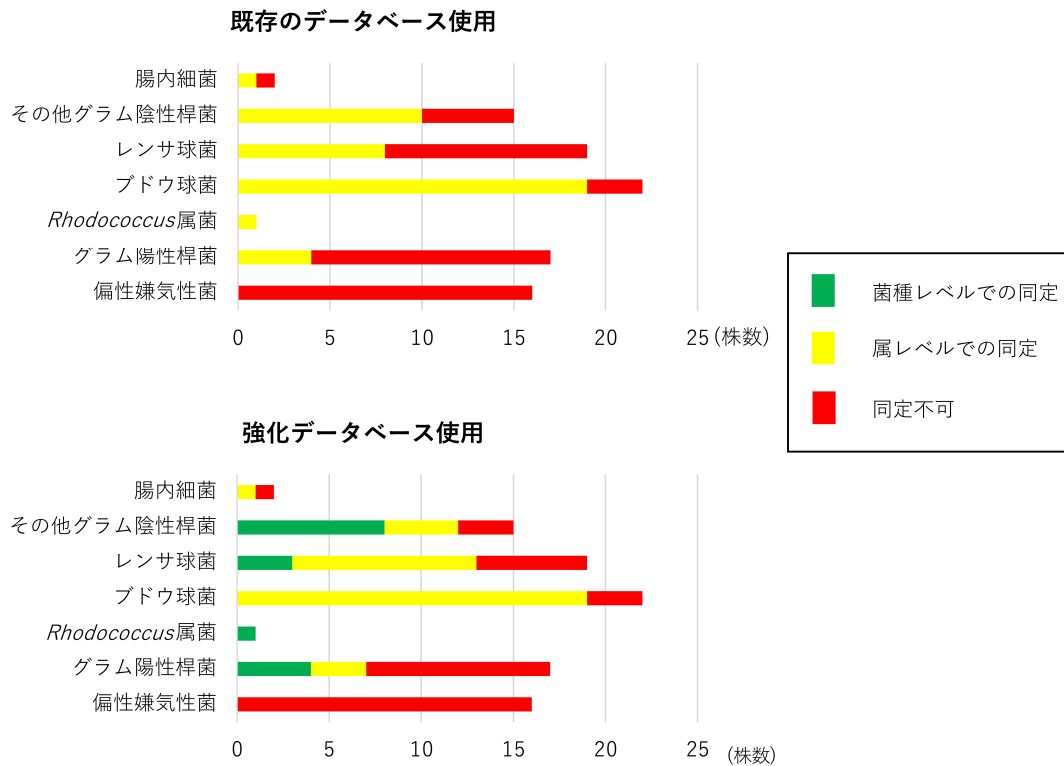


図 4-1 既存のデータベースおよび強化データベース使用時の同定結果

既存のデータベースでは同定できなかった 92 株について、既存のデータベースを使用した場合、および強化データベースを使用した場合の同定結果を細菌の分類別に示す。

総括

MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、迅速かつ安価な方法として獣医療でも導入が進められている。しかし、本手法を用いる市販システムはいずれもヒトの病原細菌および環境由来菌を中心とした参照データベースを使用しており、動物由来細菌についての同定精度については検討を行う必要がある。本研究ではウマ由来およびウマ環境由来細菌における MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の有用性を検討し、加えて本手法の問題点および解決法を示した。

第1章では、MALDI-TOF MS を用いた市販の同定システム（MALDI Biotyper）を用いて、ウマおよびウマ環境由来細菌 3724 株の同定を行なった。その結果、菌種レベルでの同定が可能だったものは 3209 株（86.2%）、属レベルでは 310 株（8.3%）、同定不可だったものは 205 株（5.5%）であり、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により大部分のウマ由来細菌を同定可能であることが示された。また、本検討での同定結果は過去の報告と遜色ない結果であり、本システムはウマおよびウマ環境由来細菌の同定に十分活用可能であると考えられた。一方で、一部の細菌株については MALDI-TOF MS を用いた同定が困難であることも示された。

第2章および第3章では、MALDI-TOF MS では同定が困難だったウマ由来細菌株について、遺伝学的手法を中心とした解析を行った。第2章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種レベルでの同定ができなかった分離株について、16S rRNA 遺伝子を用いた検討を行なった。ウマに特徴的な病原細菌である *Taylorella equigenitalis* や *Rhodococcus equi* は、既存の MALDI-TOF MS のデータベースを用いた同定では菌種レベルでの同定が困難な場合があったことが明らかとなり、これらの細菌種については参照データベースの

不足や偏りが指摘された。第3章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では同定に問題が見られたウマ由来およびウマ環境由来 *Enterobacter* 属菌、*Actinobacillus* 属菌について、遺伝学的な手法や毒素遺伝子の解析による菌種同定を行なった。検討した株の多くで、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法と他手法による同定結果との矛盾が生じていた。これらの細菌種については、菌種同士が遺伝的に近縁であることや、既存のデータベースの不足が指摘され、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法のみでは菌種の同定が困難であると考えられた。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により多くのウマ由来細菌が同定できた一方で、*T. equigenitalis*、*R. equi*、*Enterobacter* 属菌、*Actinobacillus* 属菌など、一部のウマ由来細菌については既存のデータベースを用いた同定では同定が困難な場合が認められた。このような細菌種に関しては、本手法を用いた同定の際には結果の解釈に注意が必要であると考えられた。

第4章では、第2章および第3章で検討を行ったウマ由来およびウマ環境由来細菌株を用いて、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法における新規データベース (in-house database) を構築した。さらに、本データベースを用いて新たに分離されたウマ由来細菌株の再同定を行い、既存のデータベースでは同定ができなかった株の一部が in-house database の導入により同定可能になることを示した。特に、*T. equigenitalis* や *R. equi* は既存の MALDI-TOF MS データベースでは同定に問題が見られていたが、in-house database の作成によりこれらの細菌種の同定精度向上が期待され、ウマにおける伝染性疾患の疫学監視に有用であると考えられた。また、*Actinobacillus* 属菌など、ウマの個体診療において注意を要する細菌についてもデータベースを充実させたことから、個体診療における疾病原因細菌の早期同定および病態の早期把握にも貢献することが期待された。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法において、in-house database を構築および導入することは、本手法の同定精度の改

善につながると考えられた。

従来、細菌同定に多く用いられてきた市販の生化学試験キット（アピマニユアルキット、bioMérieux）では、多くの細菌種で 24 時間程度の培養が必要である。この方法に比較すると、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を用いることで、細菌同定が約 1 日早くなり、個体診療においては早期の抗菌薬選択に直結する。ヒト医療においては、早期の抗菌薬選択は症例の予後改善に貢献することが示されている (Patel et al., 2017)。また、早期に病原細菌を特定することは、不必要な抗菌薬の使用を減らし、抗菌薬の適正使用につながると考えられている (二木, 2016)。抗菌薬の適正使用は、獣医領域においても課題となっている。Center of Disease Control の Web サイト (<https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>) では獣医領域における抗菌薬の適正使用について言及があり、日本における薬剤耐性 (AMR) アクションプランでは、動物における抗菌薬の適正使用に向けて、動物由来薬剤耐性菌のスクリーニングが実施されている (国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議, 2016)。ウマの個体診療においても、治療を目的として早期の抗菌薬選択が必要であるとともに、適正に抗菌薬を使用することが求められる。本研究により、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は、ウマ由来細菌についても大部分の細菌種において正確な菌種同定が可能であり、新規データベースの導入によりさらに多くの細菌種を同定可能であることが明らかとなった。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法をウマの診療現場においても活用することで、速やかに細菌同定結果を得ることができると期待される。MALDI-TOF MS による早期の病原細菌同定は、ウマの個体診療においても、早期の抗菌薬選択や抗菌薬適正使用へ貢献することが期待される。

本研究により、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法はウマ由来細菌の多くを同定可能で

あり、監視伝染病の診断においても有用であると考えられたが、*Taylorella equigenitalis* の同定には注意が必要であることが示された。*T. equigenitalis* が原因となる馬伝染性子宮炎は(Platt et al., 1977)、日本においては監視伝染病（届出伝染病）に指定されており、慎重な疫学監視が必要である。MALDI-TOF MS を用いた *T. equigenitalis* の同定においては、本研究で作成したデータベースを利用し、同定精度を向上させる必要があると考えられる。また、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Abortusequi を原因とする馬パラチフスは日本における監視伝染病（届出伝染病）の一つであるが、本菌について MALDI-TOF MS を用いた同定に関する報告は見られない。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、基本的な操作では *Salmonella* 属菌の血清型を鑑別することができないため(Komatsu, 2016)、*Salmonella* Abortusequi についても血清型まで決定することは困難であると予想される。*Salmonella* Abortusequi の同定に向けては、まずは MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の技術向上や同定アルゴリズムの改善による、菌株識別能力の向上が必要であると考えられる。

ウマ以外の動物由来細菌に関しても、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は大いに活用できると予想される。鶏、牛、羊、山羊などの一部の動物種に関しては既に検討が行われているが(Randall et al., 2015)、それ以外の動物種由来細菌に関しては、本手法の同定精度を確認し、同定が困難な細菌種を認識することが求められる。また、今回の検討では培養した細菌コロニーから菌種を同定したが、MALDI-TOF MS では血液培養陽性となった検体から、継代や純培養を経ずに直接同定を行うことが可能である。血液培養は、被検体を液体培地が入ったボトル内で増菌培養するもので、他の培養法に比較して短時間で多くの菌量を得ることが可能である。血液培養検体について MALDI-TOF MS を用いて同定を行うことで、検体採取から細菌同定までの時間をさらに短縮できると期待される(Ohkusu,

2012)。この際に複数菌種が検体に含まれる場合は、菌数が少ない細菌の見逃しが発生する可能性があるため同定結果の解釈に注意を要するが、主要な感染細菌のスクリーニングには有用である場合がある。今後は獣医領域においても、敗血症を疑うなど緊急性が高い症例に関しては、血液培養と MALDI-TOF MS を用いた菌種同定を組み合わせた診断を試みる価値があると考えられる。一方、獣医領域、特に日本のウマにおける獣医療においては、診療施設と検査施設が地理的に離れていることが多く、検体の輸送に時間を要するという問題点がある。国内であっても検体の輸送に 1 日から数日必要であるため、血液培養と MALDI-TOF MS を組み合わせた細菌検査の特長が生かされない可能性が高い。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法はランニングコストが小さいことが魅力であるが、同定機器本体が高価であり、獣医領域においての導入が進まない一因になっていると考えられる。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法を獣医領域において一般的にかつ有効に使用するためには、獣医領域において使用できる検査施設を増やす必要があり、MALDI-TOF MS 機器本体の小型化およびコストダウンが求められる。

本研究により、ウマ由来細菌に特化したデータベースの作成は、ウマ由来およびウマ環境由来細菌の迅速かつ正確な同定に寄与すると考えられた。本研究により作成した inhouse-database の一部は、世界的な Biotyper のデータベース共有グループである MALDI-UP (<https://maldi-up.ua-bw.de/>) に登録されている。MALDI-UP は、MALDI Biotyper の動物由来細菌や食肉に関するデータベース拡大を目的としたグループであり、グループメンバーがそれぞれ作成したデータベースを共有することができる(Rau et al., 2016)。他施設で作成されたデータベースを我々のデータベースに導入することで、データベースの拡充が容易となり、より多くの細菌種の同定が可能になることが期待される。また、我々のデータ

ベースを他施設と共有することで、他施設においてもウマ由来細菌の正確な同定に貢献すると考えられる。本研究により作成した in-house database のうち *R. equi* の株は、他施設において動物由来株の同定や波形データの比較検討に使用されている (Sting et al., 2022)。また、他施設において作成されたデータベースを我々のデータベースに追加し、既存のデータベースでは同定ができなかった株と比較を行っている。データベースの共有は、菌株の輸送を必要とせずに細菌株同士の比較検討を行う一手段となることも期待される。

また、第 2 章で行った 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹解析により、遺伝的に既知の菌種と離れた株が認められ、これらはウマの疾患に関連した未知の細菌種である可能性が考えられた。これらの菌種レベルでの同定はできないものの一定の遺伝学的類似性を示す株や、今後新たに分離される MALDI-TOF MS では同定できないウマ由来株についても、in-house database に追加をしていくことで、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により同定できるウマ由来細菌の株数が増加すると予想される。また、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では、得られた波形と既知の菌種との波形を比較することが容易であり、既知の菌種とは異なる細菌株を見つけ出しやすくなったと言える。MALDI-TOF MS を用いて細菌株を網羅的に調べることは、新しい菌種の発見にもつながると考えられる。

本研究により、MALDI-TOF MS を用いた同定法はウマ由来およびウマ環境由来細菌の同定においても有用であることが示された。MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法は早期の病原細菌同定を可能とすることから、本手法の導入はウマの防疫、個体診療における抗菌薬選択、さらには抗菌薬の適正使用に貢献すると考えられた。ウマ由来細菌およびウマ環境由来細菌のうち MALDI-TOF MS での同定が困難な株については、本研究で行なったデータベース作成を継続することで、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法の同定精度がさらに

向上することが期待された。加えて、作成したデータベースを他施設と共有することで、他施設や他動物由来細菌における同定精度の向上、および細菌株の比較検討といった細菌学的な知見の獲得にも貢献すると考えられた。

謝辞

本論文の作成にあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜った、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻 感染制御学教室 芳賀猛教授に深く感謝を申し上げます。同専攻 獣医病理学教室 内田和幸教授には、本論文の作成にあたり副査としてご指導を賜りましたこと、深謝の意を表します。同専攻 獣医衛生学教室 桑原正貴教授、同専攻 獣医微生物学教室 堀本泰介教授、同専攻 獣医公衆衛生学教室 平山和宏教授には、本論文の作成にあたり、副査として多大なご助言をいただきましたこと、厚くお礼を申し上げます。動物病院センターPeco 獣医療研究所 中山裕之センター長・東京大学名誉教授には、本研究の遂行および本論文の作成にあたり多大なご助言をいただきましたこと、深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多数の資料をご提供いただいた Bruker Japan 株式会社 藤永あずみ氏に感謝をいたします。Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart Jörg Rau 博士には、本研究の遂行にあたり有益なご助言をいただきましたこと、深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、快く検体を提供してくださった、日本中央競馬会栗東トレーニング・センター競走馬診療所および美浦トレーニング・センター競走馬診療所の皆様に感謝いたします。また、MALDI Biotyper の導入にあたりご尽力いただいた日本中央競馬会 獣医課の皆様、競走馬総合研究所の皆様にお礼を申し上げます。日本中央競馬会 競走馬総合研究所 微生物研究室の皆様には、実験手法から論文投稿まで多大なるご指導をいただきましたこと、厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- Beavis, R. C., Chaudhary, T., & Chait, B. T. (1992). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(2), 156–158. <https://doi.org/10.1002/OMS.1210270217>
- Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M., & Petrini, O. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE*, 6(1), e16424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016424>
- Bernard, K. A., Wiebe, D., Burdz, T., Reimer, A., Ng, B., Singh, C., Schindle, S., & Pacheco, A. L. (2010). Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 874–879. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.012641-0>
- Berthoud, H., Frey, J., & Kuhnert, P. (2002). Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. *Veterinary Microbiology*, 87(2), 159–174. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00048-2)
- Bizzini, A., Jatton, K., Romo, D., Bille, J., Prod, G., & Greub, G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 693–696. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>
- Bruker Daltonik GmbH. (2019). *MBT Compass user manual Revision E* (Issue April).
- Canver, M. C., Tekle, T., Compton, S. T., Callan, K., Burd, E. M., Zimmer, B. L., Bemis, D. A., Carroll, K. C., & Westblade, L. F. (2019). Performance of five commercial identification platforms for identification of *Staphylococcus delphini*. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(11). <https://doi.org/10.1128/JCM.00721-19>
- Christensen, H., & Bisgaard, M. (2004). Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto

- isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. *Veterinary Microbiology*, 99, 13–30. <https://doi.org/10.1016>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- CLSI. (2008). *Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline*. CLSI document MM-18A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collins, M. D., Hutson, R. A., Hoyles, L., Falsen, E., Nikolaitchouk, N., & Foster, G. (2001). *Streptococcus ovis* sp. nov., isolated from sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 3), 1147–1150. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1147>
- Corbeil, L. E., Morrissey, J. F., & Léguillette, R. (2016). Is *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (pigeon fever) in horses an emerging disease in western Canada? *Canadian Veterinary Journal*, 57(10), 1062–1066.
- Cui, L. X., Gu, L. N., Hou, Y. B., Zhang, B. L., & Liu, J. Y. (2018). Purulent meningitis caused by *Rhodococcus equi* A case report. *Medicine (United States)*, 97(24), 23–25. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011156>
- Diab, S. S., Songer, G., & Uzal, F. A. (2013). *Clostridium difficile* infection in horses: A review. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.032>
- Drancourt, M., & Raoult, D. (2002). rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333–1338. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1333-1338.2002>
- Farmer, J. J. (1999). Enterobacteriaceae: Introduction and Identification in Manual of clinical microbiology. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, & R. H. Tenover (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (7th ed., pp. 442–458). American Society of Microbiology.
- Fenselau, C., & Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 157–171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Frey, J., Beck, M., van den Bosch, J., Segers, R., & Nicolet, J. (1995). Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains.

- Molecular and Cellular Probes*, 9(4), 277–282.
- Frey, J., Kuhn, R., & Nicolet, J. (1994). Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiology Letters*, 124(2), 245–251. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1994.TB07291.X>
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & B. König. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.02058-07>
- Hiraishi, A. (1992). Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology*, 5(5), 210–213.
- Hiraishi, A. (1995). Analysis of 16S rRNA gene using PCR and system research.1 Amplification of 16S rDNA fragment analysis of restriction enzyme. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 10(1), 31–42. <https://doi.org/10.1264/microbes1986.10.31>
- Hiraishi, A., Shin, Y. K., Ueda, Y., & Sugiyama, J. (1994). Automated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on ‘Hydrolink’ gels. *Journal of Microbiological Methods*, 19(2), 145–154.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Ludwig, W., Stumpf, A., Mehlen, A., Heesemann, J., Monget, D., Schleifer, K. H., & Roggenkamp, A. (2005). Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.010>
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., & Lay, J. O. (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 10(10), 1227–1232. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6)
- Huang, B. F., Kropinski, A. M., Bujold, A. R., & Macinnes, J. I. (2015). Complete genome sequence of *Actinobacillus equuli* subspecies *equuli* ATCC 19392^T. *Standards in Genomic Sciences*, 10(JUNE2015), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0009-x>

- Iiyama, K., Morishita, M., Lee, J. M., Mon, H., Kusakabe, T., Tashiro, K., Akasaka, T., Yasunaga-Aoki, C., & Miyamoto, K. (2017). A reconsideration of the taxonomic position of two bacterial strains isolated from flacherie-diseased silkworms in 1965. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 86, 35–41. https://doi.org/https://doi.org/10.11416/jibs.86.2_035
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Kamp, E. M., Vermeulen, T. M. M., Smits, M. A., & Haagsma, J. (1994). Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infection and Immunity*, 62(9), 4063–4065.
- Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*, 48(3), 452–458. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.244>
- Karger, A., Stock, R., Ziller, M., Elschner, M. C., Bettin, B., Melzer, F., Maier, T., Kostrzewa, M., Scholz, H. C., Neubauer, H., & Tomaso, H. (2012). Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-229>
- Khot, P. D., Couturier, M. R., Wilson, A., Croft, A., & Fisher, M. A. (2012). Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 3845–3852. <https://doi.org/10.1128/JCM.00626-12>
- Komatsu, M. (2016). A new trend in clinical microbial studies using MALDI-TOF MS From principle to application. *The Journal of the Japanese Society for Clinical Microbiology*, 26(2), 1–11.
- Kuhnert, P., Berthoud, H., Christensen, H., Bisgaard, M., & Frey, J. (2003). Phylogenetic relationship of equine *Actinobacillus* species and distribution of RTX toxin genes among clusters. *Veterinary Research*, 34, 353–359. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Kuhnert, P., Berthoud, H., Straub, R., & Frey, J. (2003). Host cell specific activity of RTX toxins from haemolytic *Actinobacillus equuli* and *Actinobacillus suis*. *Veterinary Microbiology*, 92(1–2), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00353-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00353-X)
- Kuhnert, P., Bisgaard, M., Korczak, B., Schwendener, S., Christensen, H., & Frey, J. (2012).

- Identification of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 89(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.02.001>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- LaFrentz, S., Abarca, E., Mohammed, H. H., Cuming, R., & Arias, C. R. (2020). Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Veterinary Ophthalmology*, 23(3), 480–488. <https://doi.org/10.1111/VOP.12743>
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In E. Tackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic* (pp. 115–175). John Wiley and Sons.
- Lay, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 172–194. <https://doi.org/10.1002/mas.10003>
- Layman, Q. D., Rezabek, G. B., Ramachandran, A., Love, B. C., & Confer, A. W. (2014). A retrospective study of equine actinobacillosis cases: 1999–2011. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(3), 365–375. <https://doi.org/10.1177/1040638714531766>
- Lévesque, S., Dufresne, P. J., Soualhine, H., Domingo, M., Bekal, S., Lefebvre, B., & Tremblay, C. (2015). A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLOS ONE*, 10(12), e0144878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144878>
- Liu, S., & Tang, Y. (2016). Identification and characterization of a new *Enterobacter* onion bulb decay caused by *Lelliottia amnigena* in China. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000114>
- Marko, D. C., Saffert, R. T., Cunningham, S. A., Hyman, J., Walsh, J., Arbefeville, S., Howard, W., Pruessner, J., Safwat, N., Cockerill, F. R., Bossler, A. D., Patel, R., & Richter, S. S. (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative Bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2034–2039. <https://doi.org/10.1128/JCM.00330-12>
- Mehnaz, S. (2010). Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(12), 1614–1623.

- <https://doi.org/10.4014/jmb.1005.05014>
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(7), 887-902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>
- Miki, K., Yoshizaki, E., Tamura, K., & Sakazaki, R. (1988). *Enterobacter asburiae* isolated from clinical specimens. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 62(8), 708-711. <https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.62.708>
- Moyaert, H., Decostere, A., Baele, M., Hermans, K., Tavernier, P., Chiers, K., & Haesebrouck, F. (2007). An unusual *Actinobacillus equuli* strain isolated from a rabbit with Tyzzer's disease. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2), 184-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.013>
- Murray, M. J. (1996). Salmonellosis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(3), 558-560.
- Mutters, R. (1999). *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods. In R. P. Murray & E. J. Baron (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (7th ed., p. 561). American Society for Microbiology.
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *Basic Local Alignment Search Tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Niwa, H., Kato, H., Hobo, S., Kinoshita, Y., Ueno, T., Katayama, Y., Hariu, K., Oku, K., Senoh, M., Kuroda, T., & Nakai, K. (2013). Postoperative *Clostridium difficile* infection with PCR ribotype 078 strain identified at necropsy in five Thoroughbred racehorses. *Veterinary Record*, 173(24), 607-607. <https://doi.org/10.1136/vr.101960>
- O'hara, C. M. (2005). Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 147-162. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.147-162.2005>
- Ohkusu, K. (2012). 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. *モダンメディア*, 58(4), 113-122.
- Patel, T. S., Kaakeh, R., Nagel, J. L., Newton, D. W., & Stevenson, J. G. (2017). Cost analysis of implementing matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry plus real-time antimicrobial stewardship intervention for bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(1), 60-67. <https://doi.org/10.1128/JCM.01452-16>
- Pavlovic, M., Wudy, C., Zeller-Peronnet, V., Maggipinto, M., Zimmermann, P., Straubinger,

- A., Iwobi, A., Märklbauer, E., Busch, U., & Huber, I. (2015). Identification of bacteria isolated from veterinary clinical specimens using MALDI-TOF MS. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 128(1–2), 24–30.
- Pérez-Sancho, M., Cerdá, I., Fernández-Bravo, A., Domínguez, L., Figueras, M., Fernández-Garayzábal, J., & Vela, A. (2018). Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1485–1493. <https://doi.org/10.1111/jfd.12837>
- Platt, H., Atherton, J. G., Simpson, D. J., Taylor, C. E., Rosenthal, R. O., Brown, D. F., & Wreghitt, T. G. (1977). Genital infection in mares. *The Veterinary Record*, 101(1), 20. <https://doi.org/10.1136/vr.101.1.20>
- Pusterla, N., Jones, M. E. B., Mohr, F. C., Higgins, J. K., Mapes, S., Jang, S. S., Samitz, E. M., & Byrne, B. A. (2008). Fatal pulmonary hemorrhage associated with RTX toxin-producing *Actinobacillus equuli* subspecies *haemolyticus* infection in an adult horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 118–121. <https://doi.org/10.1177/104063870802000127>
- Randall, L. P., Lemma, F., Koylass, M., Rogers, J., Ayling, R. D., Worth, D., Klita, M., Steventon, A., Line, K., Wragg, P., Muchowski, J., Kostrzewa, M., & Whatmore, A. M. (2015). Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. *Research in Veterinary Science*, 101, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.018>
- Rasmussen, C. D., Haugaard, M. M., Petersen, M. R., Nielsen, J. M., Pedersen, H. G., & Bojesen, A. M. (2013). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Veterinary Research*, 44, 26. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-26>
- Rau, J., Eisenberg, T., Wind, C., Lasch, P., & Sting, R. (2016). MALDI-UP – An internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra. *Aspects of Food Control and Animal Health, ejournal 1*, 1–17.
- Richter, S. S., Sercia, L., Branda, J. A., Burnham, C.-A. D., Bythrow, M., Ferraro, M. J., Garner, O. B., Ginocchio, C. C., Jennemann, R., Lewinski, M. A., Manji, R., Mochon, A. B., Rychert, J. A., Westblade, L. F., & Procop, G. W. (2013). Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical*

- Microbiology*, 32(12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1912-y>
- Rychert, J., Burnham, C.-A. D., Bythrow, M., Garner, O. B., Ginocchio, C. C., Jennemann, R., Lewinski, M. A., Manji, R., Mochon, A. B., Procop, G. W., Richter, S. S., Sercia, L., Westblade, L. F., Ferraro, M. J., & Branda, J. A. (2013). Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2225–2231. <https://doi.org/10.1128/JCM.00682-13>
- Sabat, A. J., Van Zanten, E., Akkerboom, V., Wisselink, G., Van Slochteren, K., De Boer, R. F., Hendrix, R., Friedrich, A. W., Rossen, J. W. A., & Kooistra-Smid, A. M. D. M. (2017). Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-03458-6>
- Samb-Ba, B., Mazenot, C., Gassama-Sow, A., Dubourg, G., Richet, H., Hugon, P., Lagier, J. C., Raoult, D., & Fenollar, F. (2014). MALDI-TOF identification of the human gut microbiome in people with and without diarrhea in Senegal. *PLoS ONE*, 9(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087419>
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00360-07>
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V. A., Nicolet, J., & Frey, J. (2000). Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Veterinary Microbiology*, 74(4), 365–376. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00204-2)
- Schlater, L. K., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Moss, C. W., Lambert, M. A., & Packer, R. A. (1989). *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(10), 2169–2174. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.10.2169-2174.1989>
- Scott, E. M., Arnold, C., Dowell, S., & Suchodolski, J. S. (2019). Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PloS One*, 14(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0214877>
- Sebunya, T. N., & Saunders, J. R. (1983). *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 182(12), 1331–1337.
- Sekiguchi, S. (2015). The Principles, applications and pitfalls of matrix-assisted laser

- desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry for microbial identification. 腸内細菌学雑誌, 29, 169–176.
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J. M., Colson, P., Lagier, J. C., Gouriet, F., Fournier, P. E., Drancourt, M., Scola, B. La, & Raoult, D. (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: Impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2182–2194. <https://doi.org/10.1128/JCM.00492-13>
- Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Miyabe, A., Murata, S., Saito, T., & Nomura, F. (2012). Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(7), 1811–1822. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-5656-1>
- Sting, R., Schwabe, I., Kieferle, M., Münch, M., & Rau, J. (2022). Fatal Infection in an Alpaca (*Vicugna pacos*) Caused by Pathogenic *Rhodococcus equi*. *Animals*, 12(10), 1303. <https://doi.org/10.3390/ani12101303>
- Sweeney, C. R., Holcombe, S. J., Barningham, S. C., & Beech, J. (1991). Aerobic and anaerobic bacterial isolates from horses with pneumonia or pleuropneumonia and antimicrobial susceptibility patterns of the aerobes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(5), 839–842. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2026535>
- Takai, S. (1997). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Veterinary Microbiology*, 56(3–4), 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00085-0)
- Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., Stamper, P. D., Zhang, S. X., & Carroll, K. C. (2012). Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts : a bench-by-bench study for assessing the impact on. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3301–3308. <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-12>
- Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., & Yoshida, T. (1987). Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *SECOND JAPAN-CHINA JOINT SYMPOSIUM ON MASS SPECTROMETRY ABSTRACT*, 185.
- van Prehn, J., van Veen, S. Q., Schelfaut, J. J. G., & Wessels, E. (2016). MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.012>

- van Spijk, J. N., Schmitt, S., Fürst, A., & Schoster, A. (2016). A retrospective study of bacterial pathogens in an equine hospital (1988–2014). *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 158(6), 423–431. <https://doi.org/10.5167/uzh-135121>
- van Veen, S. Q., Claas, E. C. J., & Kuijper, E. J. (2010). High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 900–907. <https://doi.org/10.1128/JCM.02071-09>
- Vela, A. I., Mentaberre, G., Lavín, S., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2016). *Streptococcus caprae* sp. nov., isolated from Iberian ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 196–200. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000697>
- Veloo, A. C. M., Jean-Pierre, H., Justesen, U. S., Morris, T., Urban, E., Wybo, I., Kostrzewa, M., Friedrich, A. W., Morris, T., Shah, H., Jean-Pierre, H., Justesen, U. S., Wybo, I., Nagy, E., Urban, E., Kostrzewa, M., Veloo, A., & Friedrich, A. W. (2018). Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. *Anaerobe*, 54, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.007>
- Venner, M., Meyer-Hamme, B., Verspohl, J., Hatori, F., Shimizu, N., Sasaki, Y., Kakuda, T., Tsubaki, S., & Takai, S. (2007). Genotypic characterization of VapA positive *Rhodococcus equi* in foals with pulmonary affection and their soil environment on a warmblood horse breeding farm in Germany. *Research in Veterinary Science*, 83(3), 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2007.01.009>
- Yoshida, T., Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., & Yoshida, Y. (1988). Detection of high mass molecular ions by laser desorption time-of flight mass spectrometry. *質量分析*, 36(2), 59–68.
- Zhou, L., Jones, S. C. P., Angen, Ø., Bosse, J. T., Nash, J. H. E., Frey, J., Zhou, R., & Chen, H. C. (2008). Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 800–803. <https://doi.org/10.1128/JCM.01787-07>
- 賀来満夫. (1986). 病院感染対策に必要な微生物検査の解釈 同定検査. *環境感染*, 1, 72–77.
- 黒田泰輔. (2017). 競走馬の潰瘍性角膜炎について. *日本獣医師会雑誌*, 70, 132–138.
- 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. (2016). *薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン2016-2020*. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>
- 田中耕一, 井戸豊, 秋田智史, 吉田佳一, & 吉田多見男. (1987). レーザイオン化飛行時間型

質量分析装置の開発IV－高質量有機化合物からの擬似分子イオンの生成－. 昭和62年度質量分析連合討論会講演要旨集, 22-23.

二木芳人. (2016). 抗菌薬適正使用支援プログラム実践のためのガイダンス. 日本化学療法学会雑誌, 64(3), 379-385.