

## 医学的に重要な細菌についての分類学

ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷  
追補版 (～2013.3)Taxonomic changes of the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus* on this decade  
Follow-up information (～2013.3)かわ むら よし あき  
河村好章  
Yoshiaki KAWAMURAI. 16S rRNA 塩基配列類似度と菌種の  
定義に関する新しいコンセプト

## はじめに

2005年に本誌において、「ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷」という小文を執筆する機会をいただいた<sup>1)</sup>。その後7年間の間に、殊にブドウ球菌・レンサ球菌に関しては、革新的な変化があったわけではないが、毎年、粛々と新しい菌種・亜種などが提案され続けている。さらに16S rRNA類似度と菌種定義に関する新しい情報、Bergey's manual of Systematic Bacteriology 第2版(以下、Bergey's manualと略す)の第3巻“The Firmicutes”の発行、細菌の全染色体塩基配列情報をいっぺんに解明する whole genome sequence が比較的容易に決定できるようになったことなど、細菌分類学として踏まえておかなければならない変化があった。

前回の小文は、実際の同定業務にも役立つ情報を盛り込んだが、今回の小文では前回書けなかった学術的な部分や Bergey's manual の発刊などの新しい情報を中心に記述した。したがって本文は、前回の追補版として捉えていただければ幸いである。基本的には本誌2005年掲載の「ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷」をまずお読みいただき、その上で本小文にて、新たな変化や学術的な記述についてご理解いただければと考えている。

本小文では、まず初めに分類学的な新しいコンセプトについて概説し、続いてブドウ球菌属・レンサ球菌属の中の変化について記述した。

現在のところ、細菌の菌種は“DNA-DNAハイブリッド形成試験において70%以上の再結合率を示し、デルタ Tm 値 (ハイブリッドの温度安定性を図る指標) が5℃以下の幅に入る菌株の集まり”であると公式に定義されていることは周知のとおりである<sup>2)</sup>。さらに現在最も良く使われている16S rRNA塩基配列と菌種の定義との相関については“16S rRNA塩基配列が97%以下の類似度しかない菌株の組み合わせは別菌種として扱ってよいが、それ以上の類似度がある場合には、DNA-DNAハイブリッド形成試験を実施しないと同一菌種であるか別菌種であるかは判定できない”ということになっている<sup>3)</sup>。その後さらに詳細に16S rRNA塩基配列の類似度とDNA-DNA再結合率の関係を調べたところ、図1に示すように16S rRNA塩基配列の類似度98.7～99.0%以下の菌株の組み合わせではDNA-DNA再結合率70%を超えるケースがない事が示された<sup>4)</sup>。このコンセプトに従えば16S rRNA塩基配列の類似度98.7～99.0%以上を示す場合のみDNA-DNAハイブリッド形成試験を実施すれば良いこととなり、実際に分類同定を考える際には大いに役立つだろう。しかしこの発表は、Microbiology Today誌という英国総合微生物学会(SGM)の季刊誌に掲載されたものであり、現在のところ分類学上の如何なる拘束力も持たない点は注意が必要である。将来このコンセプトが国際原核生物分類命名委員会の公式雑誌であるIJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)に掲載されれば、このコンセプトで分類同定が直接できるようになるだろう。

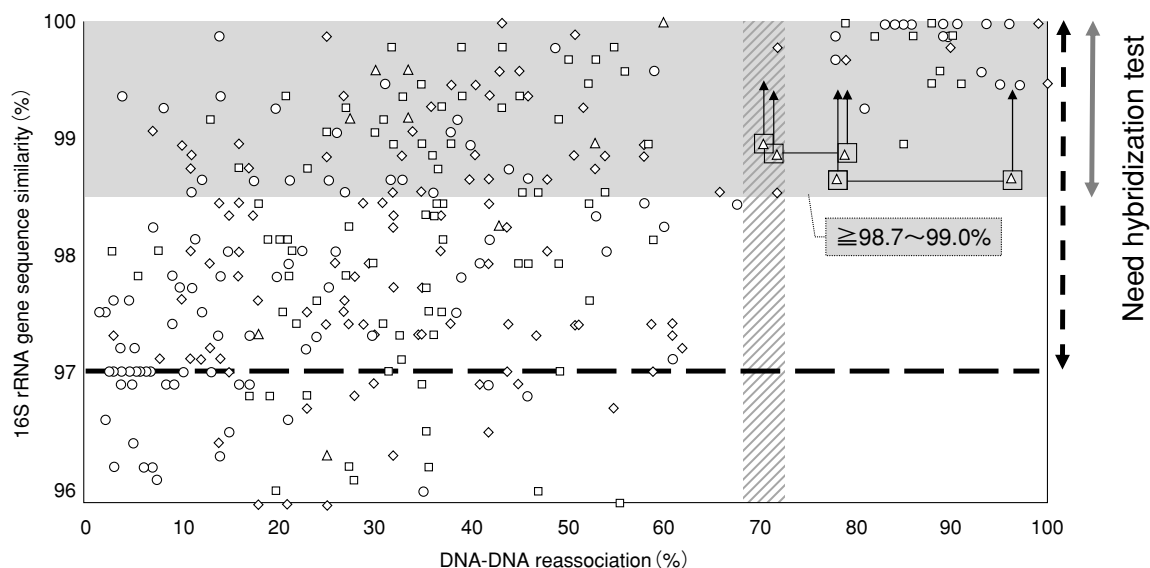


図1 16S rRNA 遺伝子塩基配列類似度が98.7~99.0%を超えた時のみ DNA-DNA 再結合試験が必要 (?)

多数の菌種における 16S rRNA 遺伝子塩基配列類似度と DNA-DNA 再結合 % の関係を示している。再結合試験データは測定法ごとに異なるシンボルで表している：○Microplate 法 (Ezaki et al., 1989<sup>39)</sup>)、◇メンブランフィルター法 (Tourova & Antonov, 1987<sup>40)</sup>)、□分光光度法 (De Lay et al., 1970<sup>41)</sup>)、△他法 (dot hybridization 法 (Amakata et al., 2005<sup>42)</sup>) など) または記載なし。四角で結んだデータは測定法により異なるデータであったことを示す。矢印は 16S rRNA 塩基配列類似度の再計算結果を示している。(Stackebrandt & Ebers, *Microbiology Today* **33**; 152-155, 2006 より改変)

## II. Bergey's manual の第 3 巻 “The Firmicutes” に記載された Firmicutes 門の高次分類

Bergey's manual は、2001 年に第 1 巻 (The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic Bacteria) が発行され、2005 年に第 2 巻 (The *Proteobacteria*)、2009 年に第 3 巻 (The *Firmicutes*)、2011 年に第 4 巻 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), 他)、そして 2012 年に第 5 巻 (The *Actinobacteria*) が発行された。

2001 年の第 1 巻には 16S rRNA 塩基配列による系統分類に基づいた Taxonomic outline of the *Archaea* and *Bacteria* (The road map of the Manual の一部)<sup>5)</sup> が記載されていたが、2009 年の第 3 巻の冒頭には Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*<sup>6)</sup> が記述されており、若干の修正点が記載されている。その中で最も大きな変更点は、*Mollicutes* 綱が *Firmicutes* 門から外れ、新たに *Tenericutes* 門として独立したことである (この門は Bergey's manual 第 4 巻に掲載された)。*Tenericutes* 門 (*Mollicutes* 綱) とは、

細胞壁を欠くマイコプラズマの仲間が含まれている菌群である。これらはペプチドグリカン (細胞壁) を欠いているのでグラム染色操作上は陰性となるが、系統解析の結果、特定の *clostridia* と関連していることから *Firmicutes* 門に含められていた。しかし、これは 16S rRNA 解析の結果のみに基づくこと、他の遺伝子での系統解析では結果が異なること、強固な細胞壁を有していないことなどを総合的に勘案して、*Firmicutes* 門からは独立させることが妥当であるとされたためである。さらに *Mollicutes* 綱が *Tenericutes* 門に昇格して移動してしまったため、それまで *Mollicutes* 綱の中で所属不明な科として記載されていた Family *Erysipelothrichaceae* は、*Erysipelotrichia* 綱、*Erysipelotrichales* 目として記載されるに至った。

若干ややこしい移動があったが、現在の Bergey's manual 第 3 巻の階層分類に従えば、表 1 に示したように、“グラム陽性で染色体 DNA の G+C mol% が低い菌群”である *Firmicutes* 門は、大きく 3 つの綱 (*Bacilli*, *Clostridia*, *Eryshipelotrichia*) から成っている。ブドウ球菌は、*Bacilli* 綱、*Bacillales* 目の中の *Staphylococcaceae* 科としてまとめられている。また

レンサ球菌は、*Bacilli* 綱、*Lactobacillaceae* 目の *Streptococcaceae* 科としてまとめられている。ちなみにレンサ球菌から独立した *Abiotrophia* 属および *Granulicatella* 属は、それぞれ *Aerococcaceae* 科、*Carnobacteriaceae* 科に含められている。

### Ⅲ. ブドウ球菌の分類

前回小文でも記載したようにブドウ球菌属菌種は非常にまとまっており、既存の菌種に対しての変更や亜種の追加などは無い。但し、この7年で9菌種

表1 Phylum *Firmicutes* の高次分類体系

門	綱	目	科	属
Phylum <i>Firmicutes</i>				
Class <i>Bacilli</i>				
Order <i>Bacillales</i>				
Family <i>Bacillaceae</i>				
Family <i>Listeriaceae</i>				
Family <i>Staphylococcaceae</i>				
Genus <i>Staphylococcus</i>				
Genus <i>Jeotgaliococcus</i>				
Genus <i>Macrococcus</i>				
Genus <i>Salinicoccus</i>				
Order <i>Lactobacillales</i>				
Family <i>Lactobacillaceae</i>				
Family <i>Aerococcaceae</i>				
Family <i>Carnobacteriaceae</i>				
Family <i>Enterococcaceae</i>				
Family <i>Leuconostocaceae</i>				
Family <i>Streptococcaceae</i>				
Genus <i>Streptococcus</i>				
Genus <i>Lactococcus</i>				
Genus <i>Lactovum</i>				
Class <i>Clostridia</i>				
Order <i>Clostridiales</i>				
Family <i>Clostridiaceae</i>				
Family <i>Eubacteriaceae</i>				
Family <i>Peptococcaceae</i>				
Family <i>Peptostreptococcaceae</i>				
Family <i>Ruminococcaceae</i>				
Family <i>Veillonellaceae</i>				
Class <i>Erysipelotrichia</i>				
Order <i>Erysipelotrichales</i>				
Family <i>Erysipelothrichaceae</i>				

Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edition, Vol.3目次に拠る。目、科については一部省略した。また属については、ブドウ球菌科、レンサ球菌科に所属する属のみ記載した。

が新菌種として提案(うちヒト由来は3菌種のみ)されており、現在までに45菌種21亜種が承認されている。表2には2005年以降に提案された菌種をリストした。

Bergey's manual 第3巻の Genus *Staphylococcus*<sup>7)</sup> の細胞壁組成の解説で *Staphylococcus succinus* subsp. *succinus* は、他のブドウ球菌属菌種と異なり、テトラペプチド鎖の position 3 にリジンではなく *meso*-ジアミノピメリン酸 (m-Dpm) が存在していると解説されている(図2)。本菌種は、2500~3500万年前のドミニカ産の琥珀に封じ込められた植物・土壌の破片から分離、見出されたもの<sup>8)</sup>であり、映画ジュラシックパークを彷彿とさせる。細胞壁組成の違いは属レベル以上で明らかな差異が見られるのが通常であるので、太古の昔からの細菌の進化を探る上でも非常に興味深かった。原報の論文には、m-Dpm の存在が記載されていたが、残念ながら、その1年後には修正記載が発表され、細胞壁組成は他のブドウ球菌属菌種と同様であることが分かった<sup>9)</sup>。Bergey's manual 第3巻では、この組成は疑わしいとのコメントがされてはいるが、修正報告の引用が無く、間違っただまの記載となっているので注意が必要である。

同じく細胞壁の特徴として、ブドウ球菌属菌種は、架橋鎖にグリシンを5~6個持つものと同時に、グリシン4~5個とセリン1個などを持っている菌種 (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* など)があり、これらは lysozyme に抵抗性であるとの記述がある。核酸 (DNA/RNA) 抽出などのための効率的な溶菌には lysostaphin や achromopeptidase、labiase<sup>10)</sup> などを使う必要があるだろう。

ブドウ球菌属菌種については、これまでに複数の house keeping gene のデータが収集されている。

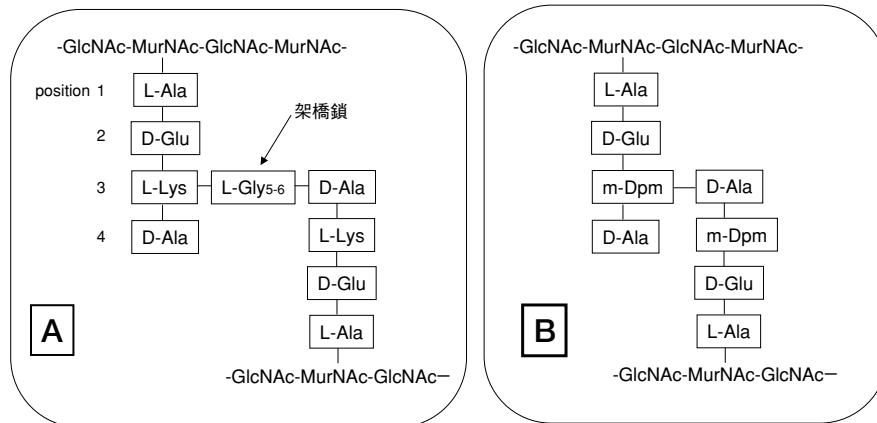
表2 2005年以降に発表された *Staphylococcus* 属の新菌種

菌種番号 <sup>1)</sup>	種名	発表時の分離源	ヒトからの分類	多剤耐性の報告	記載年	他
37	<i>S. pseudintermedius</i>	ネコ・イヌ・ウマ・オウム	× <sup>2)</sup>	○ <sup>3)</sup>	2005	COAG: +, clump: - <sup>4)</sup>
38	<i>S. simiae</i>	リスザル	×		2005	
39	<i>S. pettenkoferi</i>	ヒト	○	○	2007	
40	<i>S. devriesei</i>	ミルク	×		2010	
41	<i>S. massiliensis</i>	ヒト (脳膿瘍)	○	○	2010	
42	<i>S. microti</i>	野ネズミ	×		2010	COAG: d, clump: -
43	<i>S. rostri</i>	ブタ	×		2010	
44	<i>S. agnetis</i>	ウシ	×		2012	
45	<i>S. stepanovicii</i>	野生小動物	×		2012	

- 1) 前回の小文からの続きの菌種通し番号を示す。
- 2) ヒトからの分離頻度があるものに○、無いものには×をつけた。
- 3) 薬剤耐性の報告があるもの / *mec* 遺伝子保有の報告があるものに○をつけた。
- 4) COAG: コアグララーゼ、clump: クランピングファクター。

特に 16S rRNA, *rpoB* (beta subunit of RNA polymerase), *tuf* (elongation factor EF-Tu), *dnaJ* (heat shock protein Hsp40), *hsp60* (60kDa heat shock protein), *sodA* (superoxide dismutase) の 6 つの遺伝子については、ほぼすべての菌種・亜種で、その塩基配列が決まっている。これら各遺伝子配列での系統解析能力について比較したところ、**図 3** のような結果が得られた。解像度はメディアン値で定

義<sup>11)</sup>され、また最大類似度・最小類似度も読み取れる。最大値と最小値の幅がもっとも広い *sodA*、およびメディアン値が低い *dnaJ* の 2 つがより優れている可能性が示唆された。16S rRNA は、これまで指摘されているとおり、系統解析の解像度としては低いので、ブドウ球菌属菌種のような遺伝学的にもまとまっている類縁菌種の解析にはあまり適していないことが見て取れる。

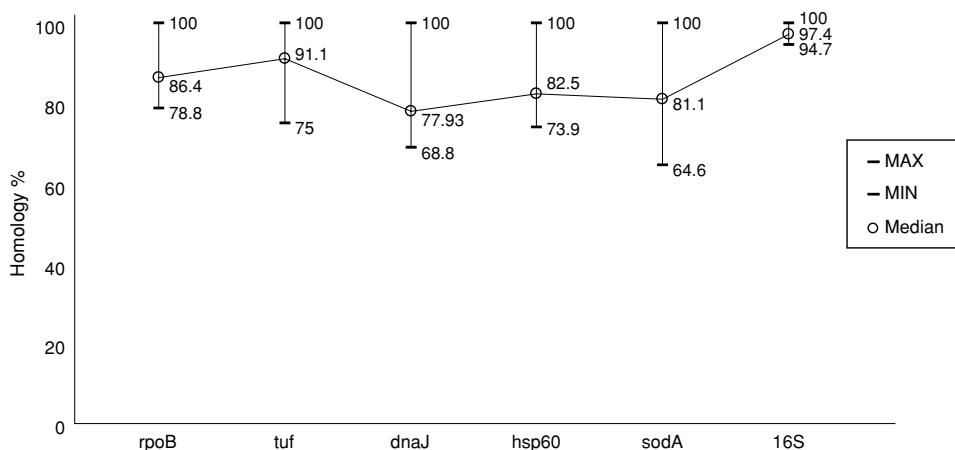


**図 2** ブドウ球菌菌種の細胞壁ペプチドグリカン構造

ペプチドグリカンは、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) のポリマーで形成された横糸と、アミノ酸 4 つから成るテトラペプチド鎖 (position1 ~ 4) の縦糸、さらに縦糸同士を結ぶ架橋鎖から成る“メレインモノマー”が重合し、網目状の構造を形成している。

多くのブドウ球菌属菌種は**図 A**に示すように分岐位置 (position3) に L-リジンを持ち、架橋鎖として L-グリシン 5~6 個を持つ (グリシン 4 つとセリン 1 つやアラニン 1 つを持つ菌種などもある)。*S. succinus* subsp. *succinus* は position3 に meso-ジアミノピメリン酸を持ち、架橋鎖は無く、直接隣のテトラペプチド鎖と結合している (**図 B**) と報告されていた。

分岐アミノ酸に meso ジアミノピメリン酸を持つ代表例として *Corynebacterium* 属菌種などがある。



**図 3** 各遺伝子配列を使った場合のレンサ球菌属菌種の類似度

レンサ球菌属の各菌種 (亜種) の基準株の塩基配列データを集め、すべての組み合わせで類似度を算出し、その最大 (MAX)、最小 (MIN)、メディアン値 (Median) を図示した。

その遺伝子配列による解像度はメディアン値で定義され、最大類似度、最小類似度の幅も読み取ることができる (その幅が大きければ、類縁のものはより近く、疎遠のものはより遠くに表していることになる)。



本小文では、*dnaJ* 遺伝子の塩基配列比較を行い、その系統樹解析の結果を図4に示した。また菌種グループについても同時に示した。菌種グループについては、DNA-DNA hybridization (Kloosら<sup>12)</sup>、16S rRNA 塩基配列系統解析 (Takahashiら<sup>13)</sup>、*hsp60* 塩基配列系統解析 (Kwokら<sup>14)</sup>、*dnaJ* 塩基配列系統解析 (Shahら<sup>15)</sup>) によるものが報告されており、若干の相違はあるものの、ほぼ同様の菌種グループを形成している。図4をみると、コアグラーゼ反応陽性となり得る菌種は、*aureus* group と *hyicus-intermedius* group に集中している。またノボビオシン耐性の菌種は、すべて *saprophyticus* group と *sciuri* group に属している。オキシダーゼ陽性となる菌種はすべて *sciuri* group に属している。このような系統関係

を念頭に置くことにより、各菌種の生物学的位置の推定には役立つだろう。

ブドウ球菌属菌種の Whole genome sequence については、すでに100株以上について実施されている。但しゲノムデータとして完成したものは41株だけであり、残りは進行中あるいは未完成のまま終了してしまったものである(表3)。菌種としては *S. aureus* が断然多く、32株について完了している。当然のこととして多剤耐性に関する解析が盛んに行われている<sup>16)</sup>。続いて *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. pseudointermedius* が2株ずつ、*S. carnosus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* が1株ずつ完了しているが、他の菌種に完了したものは無い。これをみると、ブドウ球菌属菌種のゲノムサイズは平均して

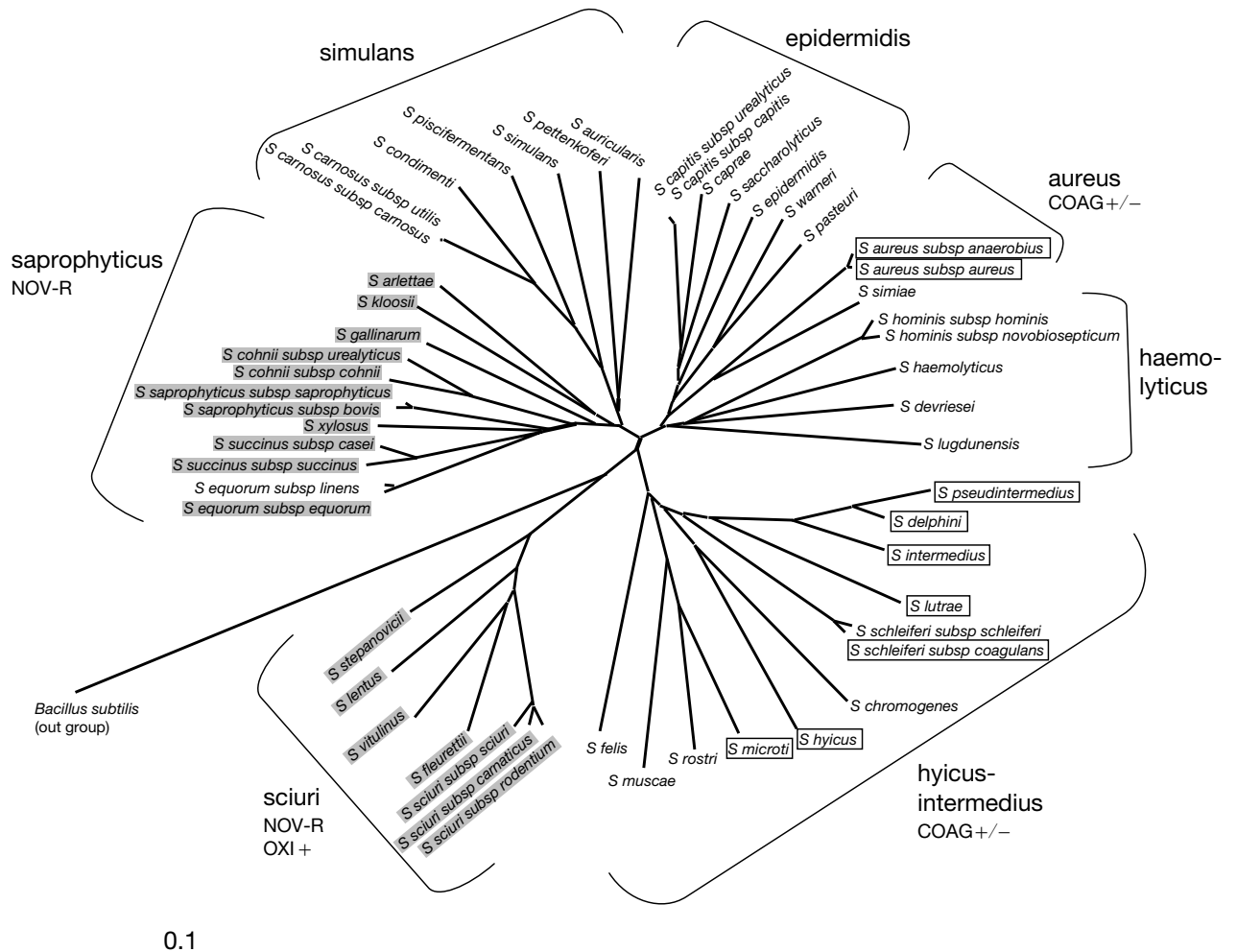


図4 *dnaJ* 遺伝子塩基配列の比較によるブドウ球菌属菌種の系統樹

大きく7つの菌種グループに分かれている。ラディカルタイプの描写では各クラスターの根の位置が明確である。ノボビオシン耐性の菌種は網掛け、コアグラーゼ反応陽性となりうる菌種は四角で囲った。

略号：NOV-R：ノボビオシン耐性、OXI+：オキシダーゼ反応陽性、COAG+/-：コアグラーゼ反応陽性（一部陰性）の菌種が含まれるグループであることを示す。

表3 ブドウ球菌属菌種のゲノム配列決定プロジェクトの現状

菌種	プロジェクト数*1	ゲノムサイズ (Mbp)	遺伝子数*2
<i>S. arlettae</i>	1 (0, 1)	2.57	2,518
<i>S. aureus</i>	86 (32, 54)	2.83 (2.69 ~ 3.09)	2,759 (2,202 ~ 3,089)
<i>S. capitis</i>	1 (0, 1)	2.44	2,292
<i>S. caprae</i>	1 (0, 1)	2.47	2,472
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	1 (1, 0)	2.57	2,538
<i>S. epidermidis</i>	8 (2, 6)	2.55 (2.41 ~ 2.64)	2,547 (2,314 ~ 2,704)
<i>S. haemolyticus</i>	1 (1, 0)	2.70	2,809
<i>S. hominis</i>	2 (0, 2)	2.24 (2.23 ~ 2.27)	2,244 (2,238 ~ 2,249)
<i>S. lugdunensis</i>	3 (2, 1)	2.59 (2.52 ~ 2.66)	2,527 (2,488 ~ 2,570)
<i>S. massiliensis</i>	1 (0, 1)	2.44	2,467
<i>S. pseudointermedius</i>	2 (2, 0)	2.59 (2.57 ~ 2.62)	2,482 (2,435 ~ 2,528)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (1, 0)	2.58	2,637
<i>S. simiae</i>	1 (0, 1)	2.59	2,648
<i>S. warneri</i>	1 (0, 1)	2.43	2,439
<i>Staphylococcus</i> sp. OJ82	1 (0, 1)	2.90	2,912
Total or Average	111 (41, 70)	2.77	2,706

\*1: プロジェクト数は、総数 (完了数、未完了数) を示した。

\*2: ゲノムサイズ、遺伝子数は複数のプロジェクトがあるときは平均およびカッコ内に範囲を示した。

米エネルギー省 Integrated Microbial Genomes のホームページ (2013年3月現在) による。

2.77Mb 程度、遺伝子数は 2700 個程度であることが分かる。大腸菌 (5.12Mb, 遺伝子数 4900 個程度) に比べ、ゲノムサイズ、遺伝子数ともに約 0.55 倍の大きさである。

#### IV. レンサ球菌の分類

表4に示すようにレンサ球菌属については、この7年間で23菌種2亜種と多数の新分類群の提案があり、その結果、合計で83菌種15亜種と非常に膨大なメンバーを抱える属となっている (2013年3月末現在で新分類群提案の論文受理は決まっているが、まだIJSEM誌で印刷公表されていないものも含む)。提案された新分類群は pyogenic group が4菌種、mutans group が8菌種、mitis group が3菌種、anginosus group が2亜種、菌種グループ不明なもの8菌種である。以前の小文で、others または new species group としたものが11菌種あるので、菌種グループ不明のものは合計19菌種となった。これらの系統関係については、16S rRNAのみでは明確ではなく、他の遺伝子情報などを加えて総合的に見る必要があるだろう。なお、この19菌種はすべて動物由来の菌種であり、ヒト由来の菌種はいまだに既存6菌種グループ (pyogenic, mitis, salivarius, mutans, bovis, anginosus の各 group) の何れかに含まれている。

レンサ球菌属については、上述のように非常に多数の新分類群が提案されたが、既存菌種の整理という観点からすると、この7年でそう大きな改善はさ

れなかった。嫌気性のレンサ球菌である *S. pleomorphus* については、*Clostridium* 属菌種と類縁であることは古くから指摘されているが、未だに移籍の提案は無い (なお、Bergey's manual では、本菌種を Species *Incertae Sedis* 「所属不明な菌種」として扱っている)。また前回小文で指摘した bovis group の分類学的検討についても残念ながら未解決のままである。

そのような中で、デンマークの Dr. Killian のグループから果敢な遺伝子解析の報告が立て続けに3報出ているので、紹介したい<sup>17-19)</sup>。7つの house keeping gene を使った MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) を行い、2009年の論文では、 $\alpha$  溶血性の mitis group anginosus group salivarius group の菌種について、また2012年の論文では  $\beta$  溶血性の pyogenic group の菌種 (*S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. canis*, *S. equi*) について、菌株の集合体としての菌種の範囲の設定や同定に資するデータベースの構築を報告している。いずれの報告においても、より詳細な遺伝学的関係を明らかにしているが、基本的にはすべての既存菌種がそれぞれ独立したクラスターを形成していることを報告している。2013年には、anginosus group について同様の解析を行い、2つの亜種を提案している (本小文執筆時にはまだ印刷されていない)。*S. constellatus* subsp. *viborgensis* と同時に提案された *S. anginosus* subsp. *whileyi* は、1999年に Dr. Whiley が *S. constellatus* subsp. *pharyngis* を提案したときに記載された DNA-group2 に相当する亜種である<sup>20)</sup>。さらに *S. anginosus* にはさ

らにもう1つ genomosubspecies (AJ1) が存在していることが記載されている(表5)。今後、新亜種として提案されてくるだろう。Dr. Killina らの使用した7つの house keeping gene は、*map* (methionine aminopeptidase), *pfl* (pyruvate formate lyase), *ppaC* (inorganic pyrophosphatase), *pyk* pyruvate kinase), *rpoB* (RNA polymerase beta subunit), *sodA* (superoxide dismutase), *tuf* (elongation factor Tu) であるが、*rpoB* 遺伝子については、モザイク状に遺伝子の水平伝達/組換えがある可能性が指摘されており<sup>21)</sup>、この遺伝子配列を使った系統解析は慎重に扱わなければならないかもしれない。

次いで、*S. suis* について若干の言及をしたい。*S. suis* は、もともと Lancefield 抗原型 R, S, T などを示

し、表現型が同じある単一の DNA-group の菌群であった<sup>22)</sup> が、その後ウマ血で溶血を示す株<sup>23)</sup> や、D 群抗原などと交差反応を示す株などが見出され、さらには新しい血清型が追加される<sup>24)</sup> などして、次第に多様な菌株を含む菌群となったようである。現在までに35の血清型(1~34型および1/2型)が知られているが、病原性のあるものとしては Lancefield 抗原型 R で血清型 2、さらに MLST 解析の ST complex-1 が主であるとされている<sup>25,26)</sup>。われわれの共同研究グループでは、ヒトから分離した血清型 2 以外の菌株群が *S. suis* とは分類学的に異なることを見出しており、新菌種提案を行う予定である。その他にも、ブタから分離した菌株 302 株から 60 の pulstypes (パルスフィールドゲル電気泳動型) が見出

表4 2006年以降に発表された *Streptococcus* 属の新菌種・新亜種

菌種番号*1	グループ名*2	菌種名	Lancefield 血清型	主要分離源	発表年
61	mutans group	<i>S. massiliensis</i>	G	ヒト	2006
62	pyogenic group	<i>S. ictaluri</i>	—	ナマズ	2007
63	pyogenic group	<i>S. pseudoporcinus</i>	—	ヒト	2007
64	mutans group	<i>S. orisuis</i>	—	ブタ	2007
65	ND	<i>S. caballi</i>	—	ウマ	2008
66	ND	<i>S. henryi</i>	D	ウマ	2008
67	mutans group	<i>S. dentirousetti</i>	—	コウモリ	2008
68	ND	<i>S. merionis</i>	D	スナネズミ	2009
69	ND	<i>S. plurextorum</i>	B	ブタ	2009
70	ND	<i>S. dentapri</i>	—	イノシシ	2010
71	ND	<i>S. porci</i>	B	ブタ	2010
72	mutans group	<i>S. ursoris</i>	—	クマ	2011
73	mitis group	<i>S. lactarius</i>	—	ヒト	2011
74	ND	<i>S. rupicaprae</i>	D	ビレネーカモシカ	2011
75	ND	<i>S. porcorum</i>	—	ブタ	2011
76	mitis group	<i>S. tigurinus</i>	—	ヒト臨床	2012
77	mitis group?	<i>S. troglodytidis</i>	B	チンパンジー	2013
78	mutans group	<i>S. troglodytae</i>	—	チンパンジー	2013
79	mutans group	<i>S. danieliae</i>	—	マウス	2013
80	mutans group	<i>S. orisasini</i> *3	—	ロバ	(2013)
81	mutans group	<i>S. dentasini</i> *3	—	ロバ	(2013)
82	pyogenic group	<i>S. honkongensis</i> *3	—	ヒラメ、ヒト	(2013)
83	pyogenic group	<i>S. fryi</i> *3	M	イヌ	(2013)
	anginosus group	<i>S. anginosus</i> subsp. <i>whitleyi</i> *3	C	ヒト	(2013)
	anginosus group	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i> *3	C	ヒト	(2013)

\*1 前回の小文からの続きの菌種通し番号を示す。下2行は亜種なので番号を振っていない。

\*2 グループ名については記載の無いものもあるが系統解析等で最も類縁と思われるものを記載した。

NDとは系統分析でグループが明らかではない、あるいは新しいグループを形成していると考えられるものである。

\*3 2013年3月現在、IJSEM誌への掲載(Validation Listを含む)は決定しており、印刷待ちの状態である。

表5 MLSAによる Anginosus group 菌株群の精査解析と新亜種の提案

1999年までの分類	MLSA-cluster	新分類群の提案
<i>S. intermedius</i>	→ Cluster-1	→ <i>S. intermedius</i>
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	→ Cluster-2	→ <i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngitis</i>	→ Cluster-3	→ <i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngitis</i>
	→ Cluster-4	→ <i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i>
	→ Cluster-5	→ <i>S. anginosus</i> genomespecies AJ1
<i>S. anginosus</i>	→ Cluster-6	→ <i>S. anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>
(DNA group 2)*1	→ Cluster-7	→ <i>S. anginosus</i> subsp. <i>whitleyi</i>

\*1 1999年の論文<sup>20)</sup>では新亜種名を記載せず、単に DNA group 2 と表示されていた。

表6 Lancefield 血清型別に見たレンサ球菌属菌種

Lancefield antigen	Species	Isolated from	Group <sup>1)</sup>
A	<i>S. pyogenes</i>	ヒト	Pyogenic group
	<i>S. castoreus</i>	ビーバー	Pyogenic group
	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	ヒト、動物	Pyogenic group
	<i>S. orisratti</i>	ラット	Mutans group
	<i>S. anginosus</i>	ヒト	Anginosus group
	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	ヒト	Anginosus group
B	<i>S. agalactiae</i>	ヒト、動物	Pyogenic group
	<i>S. halichoeri</i>	アザラシ	Pyogenic group
	<i>S. plurextorum</i>	ブタ	—
	<i>S. porci</i>	ブタ	—
	<i>S. troglodytidis</i>	チンパンジー	Mitis? (or anginosus?)
	C	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	動物
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>		ヒト、動物	Pyogenic group
<i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i>		動物	Pyogenic group
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>		動物	Pyogenic group
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>		ヒト、動物	Pyogenic group
<i>S. phocae</i>		アザラシ	Pyogenic group
<i>S. marimammalium</i>		アザラシ	Pyogenic group
<i>S. parasanguinis</i>		ヒト	Mitis group
<i>S. anginosus</i>		ヒト	Anginosus group
“ <i>S. anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> ” <sup>2)</sup>		ヒト	Anginosus group
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>		ヒト	Anginosus group
<i>S. constellatus</i> subsp. <i>pharyngitis</i>		ヒト	Anginosus group
“ <i>S. constellatus</i> subsp. <i>viborgensis</i> ” <sup>2)</sup>		ヒト	Anginosus group
D	<i>S. bovis</i>	ヒト、動物、ミルク	Bovis group
	<i>S. equinus</i>	ウマ、ウシ	Bovis group
	<i>S. alactolyticus</i>	動物	Bovis group
	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	ヒト	Bovis group
	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	ヒト	Bovis group
	<i>S. lutetiensis</i>	ヒト	Bovis group
	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	動物、ヒト	Bovis group
	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	チーズ	Bovis group
	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurinus</i>	ヒト	Bovis group
	<i>S. henryi</i>	ウマ、ウシ	—
	<i>S. merionis</i>	スナネズミ	—
	<i>S. rupicaprae</i>	ピレネーカモシカ	—
	Enterococci	—	—
	E	<i>S. porcinus</i>	ブタ、ミルク
<i>S. uberis</i>		ウシ、ミルク	Pyogenic group
<i>S. parauberis</i>		ウシ、ミルク	Pyogenic group
<i>S. mutans</i>		ヒト、動物	Mutans group
F	<i>S. phocae</i>	アザラシ	Pyogenic group
	<i>S. parasanguinis</i>	ヒト	Mitis group
	<i>S. anginosus</i>	ヒト	Anginosus group
	<i>S. constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	ヒト	Anginosus group
G	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	ヒト、動物	Pyogenic group
	<i>S. canis</i>	イヌ、ヒト	Pyogenic group
	<i>S. parasanguinis</i>	ヒト	Mitis group
	<i>S. massiliensis</i>	ヒト	Mutans group
	<i>S. anginosus</i>	ヒト	Anginosus group
H	<i>S. gordonii</i>	ヒト	Mitis group
	<i>S. sanguinis</i>	ヒト	Mitis group
K	<i>S. mitis</i>	ヒト	Mitis group
	<i>S. salivarius</i>	ヒト、動物	Salivarius group
L	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	ヒト、動物	Pyogenic group
M	“ <i>S. fryi</i> ” <sup>2)</sup>	イヌ	Pyogenic group
N	Lactococci	—	—
O	<i>S. mitis</i>	ヒト	Mitis group
P	<i>S. uberis</i>	ウシ、ミルク	Pyogenic group
	<i>S. parauberis</i>	ウシ、ミルク	Pyogenic group
	<i>S. porcinus</i>	ブタ、ミルク	Pyogenic group
Q	Enterococci	—	—
R	<i>S. suis</i>	ブタ、ヒト	—
S	<i>S. suis</i>	ブタ、ヒト	—
T	<i>S. suis</i>	ブタ、ヒト	—
U	<i>S. porcinus</i>	ブタ、ミルク	Pyogenic group
V	<i>S. porcinus</i>	ブタ、ミルク	Pyogenic group

1) 16S rRNA 系統樹に基づくグループ名を示した。一部の菌種は所属するグループが決まっていない。

2) 既に新分類群としての論文は受理されているが、2013年3月現在まだIJSEM誌に掲載されていない。



されていること<sup>27)</sup>や、血清型 32, 33, 34 は 16S rRNA 系統解析で多様性があるとの指摘も有り<sup>28)</sup>、*S. suis* と括られている菌株群は非常に多様性に富んでおり、まだ複数の新菌種に相当する菌株が含まれていると考えている。今後も分類学的整理が必要であろう。

2005 年に中国で感染ブタあるいは豚肉との濃厚な接触により、*S. suis* ST-7 型によるヒト感染が報告され話題を呼んだ<sup>29)~31)</sup>。実は感染ブタなどとの接触によりヒトが *S. suis* による感染を受けることは、それまでもしばしば報告がされていた。しかし米国をはじめとして、*S. suis* ヒト感染があまり知られていないのは、通常の  $\alpha$  溶血性レンサ球菌 (*S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* など) と誤同定されているからであると指摘する報告もある<sup>32)</sup>。R 抗血清、型別タイピング血清なども使用し、確実に同定することが必要であろう。

$\beta$  溶血性レンサ球菌の鑑別に Lancefield 抗原型別が有用であることは論を待たないが、これまで A ~ V 群 (I, J は欠番) のうち、M 群抗原を持つ菌種につ

いては明確ではなかった。われわれは M 群抗原を持つ菌株群を詳細に調べ、独立した菌種とすべきであることを見出したので *S. fryi* と名づけて新種提案を行った<sup>33)</sup>。これにより Lancefield 抗原型すべてに菌種を充てることができた。表 6 には抗原型からみた菌種一覧を示した。抗原型から菌種を考慮する際に参考にしていただければと考えている。M 群抗原保有株は、3 つの生物型があることが報告<sup>34)</sup>されており、われわれが *S. fryi* と命名したのは犬由来の Biovar-II と呼ばれる菌株群である。これとは別にヒト由来の  $\alpha$  溶血性を示す Biovar-I、動物由来で *S. fryi* とは性状の異なる Biovar-III が知られている。Biovar-I はわれわれの保有する 1 株の 16S rRNA 系統解析では *mitis* group に位置していた。また Biovar-III に相当すると考えられる菌株については *S. agalactiae* に属するとの報告<sup>35)</sup>もあるが、分類学的な検討や確認がまだ必要であると考えている。

レンサ球菌属菌種についても、多数の Whole genome sequence が実施されている (表 7)。207 プロジェクトがあり、89 株については complete sequ-

表 7 レンサ球菌菌種のゲノム配列決定プロジェクトの現状

菌種	プロジェクト数*1	ゲノムサイズ (Mbp)*2	遺伝子数*2
<i>S. agalactiae</i>	11 (5, 6)	2.09 (1.81 ~ 2.21)	2,245 (1,737 ~ 2,685)
<i>S. anginosus</i>	4 (0, 4)	1.91 (1.82 ~ 1.99)	1,945 (1,831 ~ 2,074)
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	3 (3, 0)	2.15 (2.11 ~ 2.18)	2,194 (2,128 ~ 2,287)
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	1 (1, 0)	2.25	2,095
<i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i>	3 (3, 0)	2.15 (2.02 ~ 2.25)	2,045 (1,961 ~ 2,159)
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	4 (3, 1)	2.33 (2.21 ~ 2.38)	2,342 (2,255 ~ 2,430)
<i>S. gordonii</i>	1 (1, 0)	2.20	2,149
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	2 (2, 0)	1.97 (1.93 ~ 2.01)	2,079 (2,045 ~ 2,113)
<i>S. infantis</i>	3 (0, 3)	1.81 (1.74 ~ 1.88)	1,981 (1,831 ~ 2,132)
<i>S. mitis</i>	7 (1, 6)	1.94 (1.76 ~ 2.15)	1,859 (1,724 ~ 2,095)
<i>S. mutans</i>	4 (3, 1)	2.02 (1.99 ~ 2.03)	1,986 (1,952 ~ 2,059)
<i>S. oralis</i>	3 (1, 2)	1.92 (1.88 ~ 1.96)	1,900 (1,826 ~ 1,989)
<i>S. parasanguinis</i>	4 (2, 2)	2.12 (2.05 ~ 2.17)	2,094 (2,061 ~ 2,119)
<i>S. parauberis</i>	2 (1, 1)	2.15 (2.14 ~ 2.16)	2,080 (1,937 ~ 2,222)
<i>S. pasteurianus</i>	1 (1, 0)	2.10	1,944
<i>S. pneumoniae</i>	62 (19, 43)	2.12 (1.99 ~ 2.29)	2,240 (1,850 ~ 2,846)
<i>S. pseudopneumoniae</i>	2 (1, 1)	2.14 (2.21 ~ 2.38)	2,238 (2,196 ~ 2,280)
<i>S. pseudoporcinus</i>	2 (0, 2)	2.12 (2.11 ~ 2.13)	2,088 (2,072 ~ 2,104)
<i>S. pyogenes</i>	19 (18, 1)	1.86 (1.75 ~ 1.94)	1,934 (1,735 ~ 2,091)
<i>S. salivarius</i>	5 (3, 2)	2.15 (2.05 ~ 2.22)	1,966 (1,594 ~ 2,113)
<i>S. sanguinis</i>	3 (1, 2)	2.25 (2.05 ~ 2.39)	2,244 (2,052 ~ 2,367)
<i>S. suis</i>	16 (14, 2)	2.05 (1.64 ~ 2.18)	2,054 (1,607 ~ 2,276)
<i>S. thermophilus</i>	6 (6, 0)	1.84 (1.80 ~ 1.93)	2,017 (1,820 ~ 2,230)
<i>S. uberis</i>	1 (1, 0)	1.85	1,843
<i>S. vestibularis</i>	2 (0, 2)	1.93 (1.84 ~ 2.02)	1,988 (1,920 ~ 2,056)
<i>Streptococcus</i> sp.	11 (0, 11)	2.00 (1.85 ~ 2.23)	1,976 (1,826 ~ 2,169)
Other 25 species*3	25 (0, 25)	1.51 ~ 2.42	1,508 ~ 2,529
Total or Average	207 (89, 118)	2.03	2,086

\*1: プロジェクト数は、実施総数 (完了数、未完了 (未完了で終了済みを含む) 数) を示した。

\*2: ゲノムサイズ、遺伝子数は複数のプロジェクトがあるときは平均およびカッコ内に範囲を示した。

\*3: 未完了のプロジェクト 1 つしかないものはまとめた。まとめた 25 菌種は以下のとおり。

*S. australis*, *S. bovis*, *S. caballi*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis*, *S. criceti*, *S. cristatus*, *S. didelphis*, *S. downei*, *S. entericus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. henryi*, *S. ictaluri*, *S. intermedius*, *S. macacae*, *S. marimammalium*, *S. massiliensis*, *S. merionis*, *S. minor*, *S. orisratti*, *S. ovis*, *S. peroris*, *S. porcinus*, *S. thoralensis*, *S. urinalis*.

米エネルギー省 Integrated Microbial Genomes のホームページ (2013 年 3 月現在) によった。

enceまで終了している。*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*に次いで*S. suis*の多数株について実施されている点が目を引く。これは上述の2005年に中国で見出されたブタからヒトへの感染 outbreak が関係しているようであり、16プロジェクトのうち11は中国のプロジェクトである。レンサ球菌属菌種の平均ゲノムサイズ2.03Mbp、平均遺伝子数2086個は、ともにブドウ球菌より小さいことが分かる。

## おわりに

2002年に国際原核生物命名委員会から“5つ以上のHouse keeping geneのデータを収集し、菌種の定義、他菌種との鑑別に役立てよう”という提案<sup>36)</sup>がなされたことは前回小文でも紹介した。その後、既述のごとく、5つ程度の遺伝子の塩基配列を使った解析や、7つの遺伝子配列の多型を比較するMLSTなどが盛んに実施されている。しかしながら7つの遺伝子であっても塩基長にしてみれば10Kbp程度であり、ブドウ球菌やレンサ球菌の全染色体の塩基長2.0～2.8Mbpに比べれば0.5%程度に過ぎない。すでに、全染色体の塩基配列情報比較と、現行のDNA-DNA hybridizationデータとの比較、妥当性についての報告がある<sup>37)</sup>。一方で、高速シーケンサーは、次世代、第3世代、第4世代とも称される新しい技術を導入したhigh through putな機器が次々と開発され、細菌のゲノム配列は比較的容易に決定できるようになってきた<sup>38)</sup>。複数の遺伝子配列の決定どころか、染色体すべての塩基配列情報から、より精密な生物としての特徴付け、系統解析を日常的に行える日もそう遠くはないかもしれない。

## 文 献

- 河村好章：ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷。モダンメディア。51：313-327, 2005.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LM, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, and Truper HG.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37 : 463-464, 1987.
- Stackebrandt E, Goebel BM.: Taxonomic note ; A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 846-849, 1994.
- Stackebrandt E and Ebers J.: Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards. Microbiology Today. 33 : 152-155, 2006.
- Garrity GM and Holt JG.: The road map to the manual. 119-166, 2001. In Bergery's manual of systematic bacteriology 2nd edition, vol.1. Garrity GM (eds). NewYork, Springer-Verlag.
- Ludwig W, Schleifer KH and Whitman WB.: Revised road map to the phylum *Firmicutes*. 1-13, 2009. Berge-ry's manual of systematic bacteriology 2nd edition, vol.3. In Parte AC (eds). NewYork, Springer-Verlag.
- Schleifer KH and Bell J.: Genus I *Staphylococcus*. 392-421, 2009. In Bergery's manual of systematic bacteriology 2nd edition, vol.3. Parte AC (eds). NewYork, Springer-Verlag.
- Lambert LH, Cox T, Mitchell K, Rosselló-Mora RA, Del Cueto C, Dodge DE, Orkand P, Cano RJ.: *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. Int J Syst Bacteriol. 48 : 511-518, 1998.
- Lambert LH, Cox T, Mitchell K, Rosselló-Mora RA, Del Cueto C, Dodge DE, Orkand P, Cano RJ.: ERRAT. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. Int J Syst Bacteriol. 49 : 933, 1998.
- Niwa T, Kawamura Y, Katagiri Y, Ezaki T.: Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA. J Microbiol Methods. 61 : 251-260, 2005.
- La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D.: Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology : the *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol. 11 : 318-321, 2003.
- Kloos WE, Schleifer KH. & Götz F.: The genus *Staphylococcus*. In The Prokaryotes, 2nd edn. 1369-1420, 1991. Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH (eds). New York : Springer.
- Takahashi T, Satoh I, and Kikuchi N.: Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 49 : 725-728, 1999.
- Kwok AY and Chow AW.: Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 53 : 87-92, 2003.
- Shah MM, Iihara H, Noda M, Song SX, Nhung PH, Ohkusu K, Kawamura Y, Ezaki T.: *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus* Int J Syst Evol Microbiol. 57 : 25-30, 2007.
- Shukla SK, Pantrangi M, Stahl B, Briska AM, Stemper ME, Wagner TK, Zentz EB, Callister SM, Lovrich SD, Henkhaus JK, Dykes CW.: Comparative whole-genome mapping to determine *Staphylococcus aureus* genome size, virulence motifs, and clonality. J Clin Microbiol. 50 : 3526-3533, 2012.
- Bishop CJ, Aanensen DM, Jordan GE, Kilian M, Hanage WP and Spratt BG.: Assigning strains to bacterial species

- via the internet. *BMC Biol* **7** : 3, 2009.
- 18) Jensen A and Kilian M.: Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* **50** : 113-126, 2012.
  - 19) Jensen A, Hoshino T, and Kilian M.: Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol. In press*, 2013.
  - 20) Whiley RA, Hall LM, Hardie JM, Beighton D.: A study of small-colony, beta-haemolytic, Lancefield group C streptococci within the anginosus group : description of *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* subsp. nov., associated with the human throat and pharyngitis. *Int J Syst Bacteriol.* **49** : 1443-1449, 1999.
  - 21) Mizutani T, Kikuchi K, and Hiramatsu K.: Problem in identification of *S. anginosus* group. The 86<sup>th</sup> Annual meeting of Japanese society for Bacteriology. Abstract book 126, 2013.
  - 22) Kilpper-Balz R and Schleifer KH.: *Streptococcus suis* sp. nov. nom. rev. *Int J Syst Bacteriol.* **37** : 160-162, 1987.
  - 23) Hommez J, Devriese LA, Henrichsen J and Castryck F.: Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* **11** : 349-355, 1986.
  - 24) Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M and Henrichsen J.: Characterization of six new capsular types (23 to 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 2590-2594, 1991.
  - 25) Schultsz C, Jansen E, Keijzers W, Rothkamp A, Duim B, Wagenaar JA, van der Ende A.: Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PLoS One* **7** : e33854, 2012.
  - 26) King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dawson CG, Whatmore AM.: Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis* : identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol.* **40** : 3671-3680, 2002.
  - 27) Vela AI, Goyache J, Tarradas C, Luque I, Mateos A, Moreno MA, Borge C, Perea JA, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF.: Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* **41** : 2498-2502, 2003.
  - 28) Chatellier S, Harel J, Zhang Y, Gottschalk M, Higgins R, Devriese LA, Brousseau R.: Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol.* **48** : 581-589, 1998.
  - 29) Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, Wang S, Liu L, Zu R, Luo L, Xiang N, Liu H, Liu X, Shu Y, Lee SS, Chuang SK, Wang Y, Xu J, Yang W ; Streptococcus suis study groups.: Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis.* **12** : 914-920, 2006.
  - 30) Ye C, Bai X, Zhang J, Jing H, Zheng H, Du H, Cui Z, Zhang S, Jin D, Xu Y, Xiong Y, Zhao A, Luo X, Sun Q, Gottschalk M, Xu J.: Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. *Emerg Infect Dis.* **14** : 787-791, 2008.
  - 31) Zheng H, Sun H, Dominguez-Punaro Mde L, Bai X, Ji S, Segura M, Xu J.: Evaluation of the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* sequence type 7 using the infection of BV2 microglial cells. *Med Microbiol.* **62** : 360-368, 2013.
  - 32) Facklam R.: What happened to the Streptococci : overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* **15** : 613-630, 2002.
  - 33) Tomida J, Sauer S, Morita Y, Ezaki T, Kawamura Y.: *Streptococcus fryi* sp. nov., a novel species with Lancefield group M antigens. *FEMS Microbiol Lett.* **314** : 95-100, 2011.
  - 34) Skadhauge K and Perch B.: Studies on the relationship of some a-hemolytic streptococci of human origin to the Lancefield group M. *Acta Pathol Mic Sc* **46** : 239-250, 1959.
  - 35) Kilpper-Balz R and Schleifer KH.: Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci. *FEMS Microbiol Lett* **24** : 355-364, 1984.
  - 36) Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB.: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52** : 1043-1047, 2002.
  - 37) Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.: DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57** : 81-91, 2007.
  - 38) Kawamura Y and Kamiya Y.: Metagenomic analysis of the oral microbiota permitting determination of minority populations. *J. Oral Biosci.* **54** : 132-137, 2012.
  - 39) Ezaki T, Hashimoto T, Yabuuchi E.: Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among Bacterial Strains. *Int J Syst Bacteriol* **39** : 224-229
  - 40) Tourova TP and Antonov AS.: Identification of microorganisms by rapid DNA-DNA hybridization. *Methods Microbiol.* **19** : 333-355, 1987
  - 41) De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem.* **12** : 133-142, 1970.
  - 42) Amakata D, Matsuo Y, Shimono K, Park JK, Yun CS, Matsuda H, Yokota A, Kawamukai M.: *Mitsuaria chitosanitabida* gen. nov., sp. nov., an aerobic, chitosanase-producing member of the 'Betaproteobacteria'. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55** : 1927-1932, 2005