©日本臨床微生物学会 2024

［総　　説］

細菌ゲノムデータを用いた菌種同定法

山田景土
東邦大学医学部微生物・感染症学講座

（令和 6 年 7 月 10 日受付）

超並列シークエンス（次世代シークエンス）技術が世に登場してから，既に十数年が経過している。それに伴い，解析された細菌ゲノムデータも年々増加の一途をたどっている。しかし，臨床微生物検査の現場では，ゲノムデータの利用はまだまだ研究段階に留まっているのが現状である。ゲノムデータを用いた菌種同定は，現時点で最も解像度の高い方法であるが，コストやデータの取り扱いの難しさが普及への障壁となっているかもしれない。本稿では，ゲノムデータを用いた菌種同定法を中心に，それ以外の菌種同定法の特徴も併せて概説する。ゲノムデータの活用が進むことで，臨床微生物学のさらなる発展が期待される。

Key words: 超並列シークエンス，菌種同定，ゲノムデータ

1　はじめに

ゲノム配列を理解することは，医療の現場のみならず，化学をはじめとする多岐にわたる科学分野において重要である。1953 年にワトソンとクリックによって DNA の二重らせん構造が発表されて以来，分子生物学の領域は飛躍的な発展を遂げてきた[1]。その中で，DNA シークエンステクノロジーもまた驚異的な進化を見せ，特に 2000 年代に登場した超並列シークエンス（Massively-Parallel Sequencing：MPS）技術により，目覚ましい進展がもたらされた。1990 年に始動したヒトゲノムプロジェクトでは，サンガーシークエンス技術を駆使して 10 年以上の歳月と莫大な予算をかけて全塩基配列が解読されたが[2]，今日では MPS の躍進により，迅速かつ低コストでゲノム配列を取得することが可能となっている。広く自然科学分野のトップジャーナルにおいても，ゲノム解析データは頻出し，その重要性が増している。

シークエンス技術が飛躍的に発展する一方で，臨床微生物学の分野でも技術革新が進み，菌種同定法は年々進化している。しかし，細菌の菌種同定とは，分離菌が既に記載されたどの菌種に最も近いかを決定する作業であるという基本的な意義は変わらない。本稿では，シークエンス法の原理からゲノムデータを用いた菌種同定法，さらに細分化される菌種名と今後の課題について，私見を交えて概説する。

2　シークエンス技術の昔と今

2-1　サンガー法

1977 年に発表されたサンガー法（ジデオキシ法）は[3]，最初に世界的に普及したシークエンス技術であり，現在でも一般的に利用されている。この方法は，DNA ポリメラーゼを用いた DNA 複製技術を利用している。反応液中に一定量のジデオキシ NTP（ddNTP）を添加することで，DNA 伸長反応中に ddNTP が取り込まれると伸長反応が停止することを利用している。各 ddNTP または伸長開始部のプライマーを標識し，伸長反応の過程で生じた様々な長さの DNA 断片を電気泳動で分離し標識を検出することで，塩基配列を解読する（図 1）。現在では，4 種類の ddNTP を蛍光標識し（ダイターミネーター法），キャピラリー電気泳動で DNA 断片の長さを検出するのが主流である（図 1B）。この方法は一回の反応で数百から 1000 塩基ほどの配列を取得でき，現在では単一遺伝子の部分配列を確認するのに使用されることが多い。後述の MPS が全盛の時代ではあるが，現在でも頻繁に行われているシークエンス技術である。著者は学生時代，キャピラリー電気泳動全盛の時代に，当時ですら時代遅れであったダイプライマー法を用い，数十センチもあるゲルを作製し塩基配列を解読していた（図 1A）。同年代でこの技術を経験した者はほぼおらず，今思えばそれも良い経験であったと思う。

2-2　MPS

2000 年代中盤以降に登場したのが，次世代のシークエンス技術，MPS である。当初は次世代シークエンス（NGS：Next-Generation Sequencing）と呼ばれていたが，最初に登場して以降，既に十数年が経過しており，NGS という用語が不適切であるという見方もある。また，一口に MPS 技術といってもいくつかの種類がある[4)~7)]。パイロシークエンスや illumina 社が提供する Sequence-By-Synthesis 法などのショートリードシークエンシングと，Oxford Nanopore Technologies 社が提供するナノポアシークエンス技術に基づくロングリードシークエンシングが代表例である。ここでは，現在最も汎用される illumina 社のショートリードシークエンス技術とナノポアシークエンス技術について簡単に説明する。

著者連絡先：（〒143-8540）東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部微生物・感染症学講座
山田景土
TEL: 03-3762-4151
FAX: 03-5493-5415
E−mail: kageto.yamada@med.toho-u.ac.jp

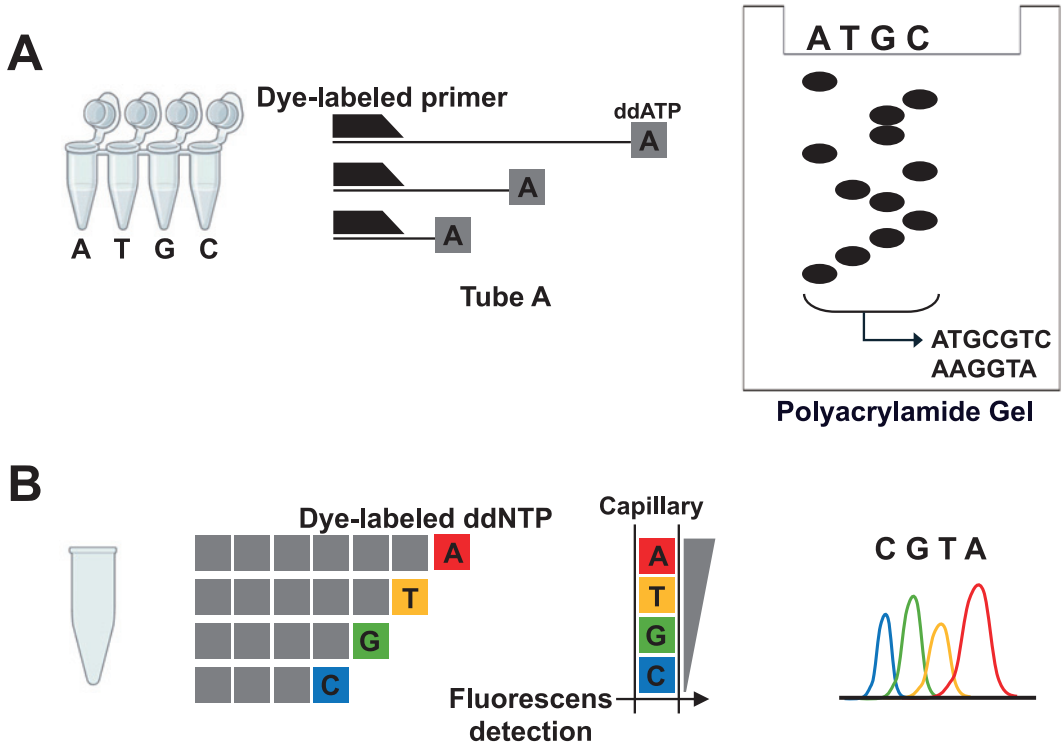


図1. サンガー法の原理。A）ダイプライマー法（ポリアクリルアミドゲル電気泳動），B）ダイターミネーター法（キャピラリー電気泳動）。

・2-2-1　ショートリードシークエンス

はじめに，illumina 社のショートリードシークエンスについて説明する。この方法は，得られる塩基配列の長さがサンガー法よりも短いため（最長 300 bp），ショートリードと呼ばれる。この方法では，最初に対象 DNA を断片化し，次に断片化された DNA の外側にアダプター配列を付与する。このアダプター配列には，シークエンス用プライマーと相補的な配列が含まれている。さらに，その外側にサンプルごとに異なるインデックス配列を付与する（DNA ライブラリー）。作製した DNA ライブラリーをフローセル内でハイブリダイズさせ，DNA 断片を増幅し，シークエンス反応を行う。この際に異なる配列も同時並列に解読する。取得した配列はインデックス配列ごとに振り分けられ，同一インデックスを含む配列をつなぎ合わせて一つの長い配列にアセンブルする（コンティグ）（図 2A）。この方法は，得られる配列が短いため，繰り返し配列や rRNA 遺伝子のようにゲノム上に複数存在する遺伝子の位置や正確な数を識別することができない。また，耐性遺伝子などの因子が染色体上に存在するのか，プラスミド上に存在するのか区別することもできない。一方で，大量のリード数が得られるため，配列の信頼性が高いという特徴がある。

・2-2-2　ナノポアシークエンス

次にナノポアシークエンス技術について説明する。この方法は，解析対象の DNA 分子をポリマー製の膜に埋め込まれたタンパク質の“ナノポア”を通過させる[8)9)]。通過時に塩基ごとに特徴的な電流の乱れが発生し，その特徴的な電流変化をもとに塩基配列を決定する（図 2B）。前処理として，アダプター配列の外側にインデックス配列とモータータンパク質を付加する。モータータンパク質は二本鎖 DNA を一本鎖に乖離し，DNA のナノポアへの通過を制御する。ショートリードシークエンスと異なり，DNA の断片化や増幅を伴わない解読手法であり，リアルタイムに長い配列情報を取得することが出来る。流通当初は，シークエンスエラーが多い事が取り上げられていたが，最近では，正確性が向上している。また，長鎖 DNA の配列を取得できるので，対象遺伝子の数や位置を把握できる上に，リアルタイムに大量の配列情報を取得出来るため，臨床検査への応用が様々な分野で検討され始めている。細菌の完全長ゲノム配列を得る場合は，ショートリードシークエンスと組み合わせた，hybrid de novo assembly を行う（図 2）。近年，細菌の完全長ゲノム配列が得られるようになり，ESBL 遺伝子はプラスミド性だけでなく，染色体性に入り込む事で安定的に保持されているという報告もある[10)]。また，従来は薬剤耐性遺伝子の有無を検索するだけであったが，最近は遺伝子のコピー数も議論されており，薬剤耐性遺伝子のコピー数が多いほどその薬剤の MIC が上昇する事が示されている[11)]。

3　菌種同定法の昔と今

3-1　形態学的性状に基づく菌種同定

臨床現場における菌種同定の最初にして最も重要なステップは，集落性状やグラム染色による菌体の観察である。熟練の微生物検査技師であれば，鏡検所見から菌種の同定（推定）はもちろん可能であり，翌日の集落観察によりその同定精度はさらに向上する。この工程は昔も今も変わらず重要であり，現場での基本として守られている。しかし，近年，臨床応用が進んでいる質量分析装置の普及などに伴い，かつてほどの

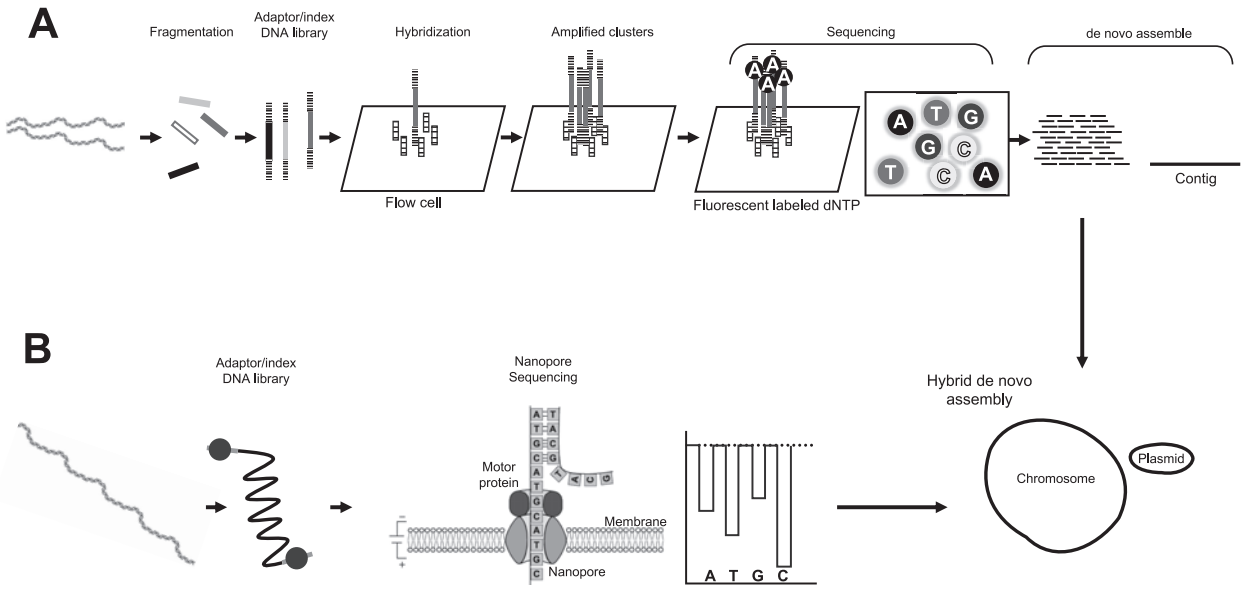


図 2.　Massively parallel sequencing の原理。A）short read sequencing，B）nanopore sequencing。

職人技感は薄れつつあるように思われる。質量分析装置の導入により，多くの菌種が迅速かつ正確に同定されるようになったが，これにより微生物検査の現場における匠の技の重要性がやや後景に退いている感がある。今後は，AI 技術に職人技をどのように統合させるかが興味深い課題となるだろう。

また，集落性状を観察する上で，現代の微生物検査のレベルを向上させたのは，培地の改良に尽力した先人たちの多大な貢献があったことを忘れてはならない[12)13)]。彼らの努力により，微生物の培養が飛躍的に進化したのである。このように，伝統的な技術と最新のテクノロジーの融合が，微生物検査の未来を切り開く鍵となる。職人技を次世代に伝承しつつ，新たな技術とのシナジーを生み出すことが求められている。

3-2　生化学性状に基づく菌種同定

試験管培地による性状確認をはじめ，細菌代謝系の表現型に基づく同定法である。特定の反応に対する陽性と陰性のパターンによって菌種を同定する。初期の目視による判定から，自動判定装置の普及により作業効率が向上していった[14)]。現在でも多くの施設で採用されている同定法の一つである。

3-3　遺伝子の部分配列相同性に基づく菌種同定

・3-3-1　DNA-DNA Hybridization

DNA-DNA Hybridization（DDH）は間接的に塩基配列の相同性を比較する方法である[15)]。マイクロプレート等に菌種特異的一本鎖 DNA を固相化し，対象菌株に由来するビオチン標識一本鎖 DNA をハイブリダイズさせる。その後，アビジン標識酵素と発色基質を作用させる。ウェルの吸光度から相対類似度を計算し，相対類似度が 70% 未満の場合に別種とする。

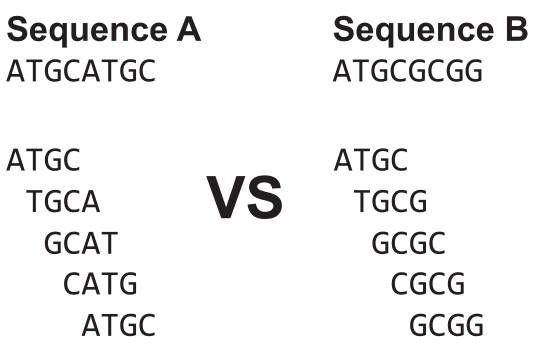
・3-3-2　単一遺伝子の塩基配列相同性

16S rRNA 遺伝子や *gyrB* 遺伝子，*rpoB* 遺伝子などの普遍的に存在する遺伝子の相同性に基づく菌種同定法もある[16)〜18)]。この方法は，先に示したサンガー法を用いて，数百から 1500 bp ほどの部分的な house-keeping 遺伝子の塩基配列相同性を比較することで菌種同定を行うものである。16S rRNA 遺伝子は多くの菌種において保存性が高く，一つのプライマーペアで多くの菌種をカバーすることができる一方で，類縁菌の場合は配列多様性が得られないことがある。一般的に 16S rRNA 遺伝子の相同性が 98.7% 以下の場合は別種と解釈されるが，例外もあり，99% 以上の相同性を示しても別種である場合がある。したがって，16S rRNA 遺伝子の相同性だけで確実な菌種同定は困難であり，特に亜種を認める菌種の場合，16S rRNA 遺伝子のみの配列情報で分類するのは難しい。そういった場合に，16S rRNA 遺伝子の相同性と近種特異的な生化学的性状を組み合わせて菌種同定を行う[18)]。一方，*rpoB* や *gyrB* 遺伝子の場合は，16S rRNA 遺伝子と比較して多様性が高いが，一つのプライマーペアで全ての細菌をカバーできるわけではない。そのため，既報の文献情報を参照するか，自身でプライマーをデザインする必要がある。

塩基配列の相同性を比較する際のポイントはデータベースである。基準株（type strain）に由来する塩基配列で構成されたデータベースを用いる必要がある。Type strain とは，種の基準株であり，標準菌株とは区別して扱う株であり，各細菌の種ごとに 1 つだけである。Type strain を調べるツールとしては，List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature（LPSN；https://www.bacterio.net/）などがある[19)20)]。例　え　ば，*Escherichia coli* の type strain は ATCC 11775, CCUG 24, CCUG 29300, CIP 54.8, DSM 30083, JCM 1649, LMG 2092, NBIMCC 3398, NBRC 102203, NCCB 54008 および NCTC 9001 があり，これらはいずれも同一起源の菌株である。名称が異なるのは保存されている菌株バンクが異なるためである。なお新種提案を行う場合は，二カ国以上の菌株バンクに菌株を寄託する必要があり，必然的に 2 つ以上のバンクに由来する番号が付与される。

3-4　質量分析による菌種同定

2010 年代に入り，菌種同定におけるブレイクスルーとして登場したのが質量分析法である[21)22)]。質量分析装置は広く



	Seq. A	Seq. B
ATGC	2	1
TGCA	1	0
GCAT	1	0
CATG	1	0
TGCG	0	1
GCGC	0	1
CGCG	0	1
GCGG	0	1

図 3. *k*-mer の考え方。ある配列 A および B の 4-mer とそれぞれの出現頻度。

物質の質量を計測するための装置であり，菌種同定に用いられるのは，matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry（MALDI-TOF MS）である。この装置は既に多くの医療機関で使用されているが，その概要を以下に説明する。まず，対象菌株をターゲットプレートに少量塗布し，マトリックス試薬を添加する。マトリックス試薬はレーザー光を吸収して試料のイオン化を促進する物質であり，標的となる物質の分子量などによって最適化されている。その後，真空管内でレーザーを照射し，試料内のタンパク質をイオン化・飛行させる。この際，小さい分子は早い飛行速度で検出器に到達するが，大きな分子は飛行速度が遅くなる。シグナル強度は含有分子の量を表し，到達時間が分子量を示す。このスペクトルパターンをデータベース内のパターンとマッチングさせることで，菌種同定が行われる。解析対象となるタンパク質は主にリボソームタンパク質であるため，16S rRNA 遺伝子の相同性に基づく菌種同定に近い精度が得られる。DNA 塩基配列の相同性に基づく菌種同定の場合，基準株の配列を比較する必要があるが，MALDI-TOF MS では，同一菌種でも複数株からなるデータベースを用いることで同定精度が高くなる。塩基配列は得られる結果にほとんど変化を認めないが，質量分析のスペクトルパターンは手技や菌株の特性によって結果が変化する。このため，よりストライクゾーンを広くするためには複数菌株から構築されたデータベースを用いることが望ましい。日本国内で広く流通している装置として，MALDI Biotyper と VITEK MS の 2 つがあるが，両者ともに原理は同じく MALDI-TOF MS である。

3-5　ゲノム相同性に基づく菌種同定

MPS から取得したゲノム配列を利用した菌種同定法は，現状で最も分解能が高い。基本的に取得したゲノム配列と比較対象となる菌種のゲノム配列との相同性によって菌種同定を行う。ここで重要な事は，DNA の部分配列を比較する際と同様，比較対象となる配列に type strain のゲノム（リファレンスゲノム）を用いる事である。以下にゲノム配列を用いた菌種同定ツールの代表的なものを記載する。

・3-5-1　デジタル DDH

従来の DDH 法は分類学的なゴールドスタンダードとして永く用いられてきた。しかし手技的な煩雑さなどに由来する再現性の低さが課題であった。デジタル DDH は，in silico DDH とも呼ばれ，従来の DDH 値をゲノム配列の比較から推定するものである[23]。菌種同定のしきい値は 70% 未満の場合を別種と判定し，従来の DDH 法との高い相関性があるとされている。無料 web サービスとして Genome-to-Genome Distance　Calculator（GGDC；https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#）が利用可能である[24)25)]。このツールは，web インターフェース上で比較したいゲノム配列をアップロードすることで結果を得ることが出来る。異なる 3 つの計算式からそれぞれ dDDH 値が算出され，70% 以上の場合に同種と判定される。

・3-5-2　*k*-mer 法

k-mer とは，長さ k の DNA の部分配列を指す。図 3 では，sequence A および B の 4-mer を示している。それぞれの配列を連続した 4 塩基ずつに分け，それぞれの配列の出現頻度を算出し，擬似的に 2 つの配列を比較している。無料 web サービスとして Center for Genomic Epidemiology の提供する KmerFinder を利用することができる（https://cge.food.dtu.dk/services/KmerFinder/）[26)~28)]。このサービスでは，取得したゲノム配列を web インターフェース上にアップロードすることで菌種推定が可能である。注意点としてはデータベースが最新ではないので，最新の菌種をカバーできていない可能性があることに留意する必要がある。なおデータベースは web 上で公開されているので必要に応じて対象菌種が含まれているか確認することができる。

・3-5-3　Average nucleotide identity（ANI）

Average nucleotide identity（ANI）法では長いゲノム配列を，1020 bp の長さに断片化する。それぞれの断片化した配列同士の相同性から平均値を算出した値が ANI 値である（図 4）[29]。多くの場合，ANI 値が＜95% の場合に別種と判定する[30]。Web ベースで簡便に使用出来るツールとして EZBioCloud の提供する ANI Calculator（https://www.ezbiocloud.net/tools/ani）がある[31]。これは 1 ゲノム配列対 1 ゲノム配列を ANI で比較するサービスである。比較したい配列を用意し，配列情報をアップロードすることで ANI 値を計算してくれる。しかし，1 対 1 の比較なので，同時に多数比較したい場合に使いにくい。

多数のゲノム配列対多数のゲノム配列を網羅的に ANI 解析するツールとして，fastANI がある[32]。これは Mac のコマンドラインで使用するオフラインのアプリケーションと web インターフェースの両方が利用可能である。前者の場合，自身で配列をダウンロードし，query 配列と reference

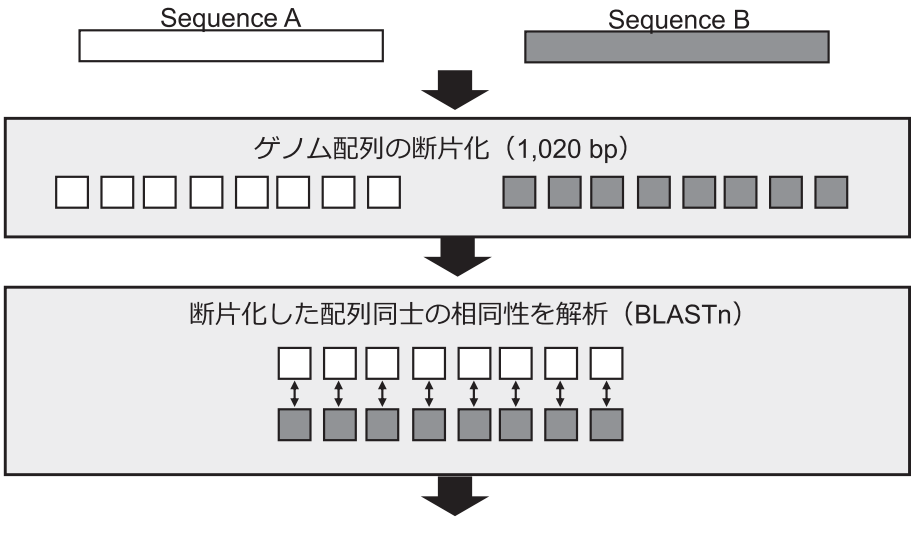


図 4.　Average nucleotide identity の概略図。

配列を指定してその相同性を網羅的に解析することができる。この場合，自身の PC の使用環境を整える必要があるため，簡便さという意味では使いにくいかもしれない。Web インターフェースとして The Genome Taxonomy Database（GTDB；https://gtdb.ecogenomic.org/tools/fastani/heatmap?job-id=413）が提供する FastANI calculator がある。これは Query genomes と Reference genomes を任意に指定するだけで，組み合わせの数が 1000 を超えない範囲で結果を出力してくれるサービスである。

解析対象ゲノムが一株のみの場合，著者が現状で最も推奨するサービスは国立遺伝学研究所の提供する DDBJ Fast Annotation and Submission Tool（DFAST）である（https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/）[33]。DFAST は，対象ゲノムの annotation が本来の役割だが，対象ゲノム配列をアップロードするだけで，annotation に加えて fastANI を行い，対象ゲノムの菌種同定を行ってくれる。自身の取得したゲノム配列あるいは解析対象ゲノムについて網羅的に fastANI を行う為，類縁菌の結果も出力される。これにより，解析対象の菌株が遺伝的にどのような菌種と類縁であるかをある程度推定することが可能である。このサービスが優れる点として，データベースが type strain のみで構成されており信頼性が高い事が挙げられる。また定期的にデータベースも更新される為，比較的新しい菌種にも対応している（もちろん type strain のゲノム配列が登録されている場合に限る）。データベースに関しても国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータ内に格納されており，参照可能である。もし 1 株だけゲノム情報を入手したが，どのように対応して良いかわからない場合は，試してほしいツールである。

4　細分化される菌種名と今後の課題

MPS の普及に伴い，世の中にはビッグデータが溢れている。細菌に由来するゲノム配列も例外ではなく，年々その登録数の上昇はとどまるところがない。数多くのゲノム配列を解析してみると，今まで明らかになっていない事実が次々と解ってきた。例えば，著者等の研究では，*Stenotrophomonas maltophilia* という菌種名で登録されている細菌コンプリートゲノム配列を公共データベースからダウンロードし解析すると，それらが複数の異なる未登録の菌種から構成されている事が解った[34]。これは，著者等が研究していた *S. maltophilia* に由来する L1 メタロ β ラクマーゼの多様性が，何に起因するのか気になって調べていた際に解った事実である[35]。それらの中には菌株バンクに寄託された菌株も含まれていたことから，菌株バンクに登録されているからと言って，全て正しい菌種名ではないという事も認識させられた。しかし，これは MPS の普及に伴いゲノムデータを用いた菌種同定法が発展した結果として明らかになった事であり，寄託当時はそれ以上の菌種同定法がなかった為に起こった事象である。

多くの新種が報告されるようになった一方で，臨床の現場では，菌種名を細分化して報告することは特段求められていない。むしろ細分化した菌種名の報告は医療現場での混乱を招く。その代表例を挙げるとするならば，*Staphylococcus aureus* complex がある。*S. aureus* complex には現在，*S. aureus*，*S. argenteus*，*S. schweitzeri*，*S. roterodami* および *S. singaporensis* が含まれている[36)~38)]。この中で，*S. roterodami* と *S. singaporensis* は発表が同時期であり，ゲノム配列を比較した場合に，高い相同性を認めており，同種の可能性が否定できない。これら *S. aureus* complex は現在のところ病原性に差がないとされており，臨床的に細分化した菌種名を報告してしまうと，臨床医が病原性の低い CNS と誤認してしまう可能性があることから，*S. aureus* complex として一括りにして報告する事が推奨されている[39]。*S. aureus* complex は認知されるようになったが，これ以外にも多くの類縁菌は存在しており，ゲノムデータを用いた菌種同定を行うことで正確な菌種名がわかるものも少なくない。それらについて，全てを把握する事はほぼ不可能と言えるが，それぞれの菌種同定法を用いた際の限界点を把握しておくは重要で

ある。例えば，*Pseudomonas* 属は 2024 年 7 月の時点で正式に認められている菌種数は 300 を超えるが，集落性状や生化学的性状の観察を用いた菌種同定では，*Pseudomonas aeruginosa*，*P. oryzihabitans*，*P. fluorescens*/*putida* といったようないくつかの代表的なグループに分けるのが限界である[40]。もちろん必要に応じたピンポイントな性状観察によって，病原体を区別する場合もある。*P. aeruginosa* と *P. otitidis* の鑑別などがそれに該当するだろう。両者の集落性状は非常に類似しているが，アセトアミド培地を用いたアシルアミダーゼ産生能，特徴的な薬剤感受性結果やメタロβラクタマーゼ産生性で鑑別することが出来る[41]。質量分析を用いた場合，*P. aeruginosa* と *P. otitidis* が明確に区別されるなど，若干解像度の向上を認めるものの，それでも類縁菌の鑑別は出来ないものも多い（臨床現場で必要以上に菌種を細分化する必要はないことは上述の通り）。一方で，今回紹介させて頂いたゲノムデータを用いた菌種同定法では，現状で最も解像度の高い菌種同定が可能となるが，臨床現場でそこまでの情報が求められる事はほとんどない。それに加えて，*Escherichia coli* と *Shigella* 属などは遺伝的には同一であることが解っており，それらをゲノムデータから分けることは出来ない。医学的に細菌性赤痢の原因としての *Shigella* 属の重要性と，これまでの慣習から両者を分け，独立させている。従来から赤痢菌の同定が難しいとされているのは，こういった遺伝的背景に起因しているのだと感じる。これ以外にも遺伝的には同一だが菌種名が異なる細菌は存在している。このように，それぞれの検査法ごとの限界点や特徴を理解して運用することが肝要である。

一方で，類縁菌であっても薬剤耐性や病原性が著しく異なる場合は，菌種名を分けて報告する必要があると考える。一例を挙げるとするならば，*P. otitidis*，*P. tohonis* および *P. solani* がある[42)~44)]。これらの菌種は，集落外観が *P. aeruginosa* に酷似しているが，染色体性に種特異的な subclass B3 のメタロβラクタマーゼ遺伝子を保有する菌種である。これらの菌種はいずれも特徴的な薬剤感受性プロファイルを示し，アシルアミダーゼ陰性という特徴を有している為，可能であれば *P. aeruginosa* と区別して報告することが望ましいと考える。遭遇頻度は低い為，無理やり新しい菌コードを作る必要はないが，*P. aeruginosa* と誤同定されることは可能であれば避けたいところである。

5 おわりに

従来の微生物検査における同定作業は，経験，技術，そして蓄積された知識が重要視されてきた。しかし，現代では多くの場合，自動分析機が判定・同定した結果を技師が確認するという形に変わりつつある。もちろん，現在でも熟練の技術が発揮される場面は多く，現場でのファインプレーも見られるが，技術の進歩に伴い，自動化や分析機への依存がさらに強まることは容易に想像できる。ここで重要なのは，それぞれの同定方法の限界点を理解することである。質量分析の導入により，多くの菌種が報告されるようになったが，依然として特定の類縁菌の区別は難しく，場合によっては「complex」として一括りに報告する必要がある。MPS に基づく菌種同定は非常に正確で細分化も可能であるが，なかには生化学的性状検査で初めて鑑別できる種もあるという事は重要である。

本稿では，ゲノムデータを用いた菌種同定法について概説したが，今後も菌種同定法に限らず，新しい技術が臨床検査の現場に応用されることが期待される。MPS が臨床応用されるまでには，コスト，精度管理，人材育成，ソフトウェア開発など多くの課題が残されているが，新たな技術を柔軟に取り入れていく姿勢も重要であると考える。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

1）Watoson, J.D., F.H. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature 171: 964-967.
2）Nurk, S., S. Koren, A. Rhie, et al. 2022. The complete sequence of a human genome. Science 376: 44-53.
3）Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chan-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.
4）Schadt, E.E., S. Turner, A. Kasarskis. 2010. A window into third-generation sequencing. Hum Mol Genet 19: R227-R240.
5）Bentley, D.R., S. Balasubramanian, H.P. Swerdlow, et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 456: 53-59.
6）Rothberg, J.M., W. Hinz, T.M. Rearick, et al. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475: 348-352.
7）Ronaghi, M., M. Uhlén, P. Nyrén. 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 281: 363-365.
8）Lu, H., F. Giordano, Z. Ning. 2016. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly. Genomics Proteomics Bioinformatics 14: 265-279.
9）Ashton, P.M., S. Nair, T. Dallman, et al. 2015. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nat Biotechnol 33: 296-300.
10）Yoon, E.J., B. Gwon, C. Liu, et al. 2020. Beneficial chromosomal integration of the genes for CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for stable propagation. mSystems 5: e00459-20.
11）Endo, Y.T., K. Aoki, M. Hamada, et al. 2022. Full-length whole-genome sequencing analysis of emerged meropenem-resistant mutants during long-term in vitro exposure to meropenem for borderline meropenem-susceptible carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing Enterobacterales. J Antimicrob Chemother 78: 209-215.
12）岩田 敏，佐藤智明，松本哲哉，他．2018．モダンメディア通巻 750 号記念特集-2「感染症診断の未来を化学する」．モダンメディア 64: 101-118.
13）小栗豊子．1997．最近の改良血液寒天培地にみる性能の変化．検査と技術 25: 562-566.
14）山根誠久．2009．我が国における自動細菌検査装置の歴史―

AutoMicrobic System（AMS）から 30 年―. Sysmex Journal Web 10: 1-14.
15）Wada, Y., H. Saitoh, I. Nakasone, et al. 2000. Application of DNA-DNA hybridization, DDH MYCOBACTERIA 'Kyokuto' to species-identification of mycobacteria grown in Middlebrook 7H9 broth. Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi 11: 47-50.
16）Mulet, M., J. Lalucat, E. García-Valdés. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environ Microbiol 12: 1513-1530.
17）Drancourt, M., D. Raoult. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J Clin Microbiol 40: 1333-1338.
18）大楠清文. 2022. PCR による菌種同定の実際. Medical Technology 50: 1320-1325.
19）EUZéBY, J.P.. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int J Syst Bacteriol 47: 590-592.
20）Parte, A.C.. 2014. LPSN–list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res 42: D613-D616.
21）小松　方. 2016. MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物学的検査の新しい潮流 原理から応用まで. 日臨微誌 26: 79-89.
22）大楠清文. 2020. MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物検査. 臨床検査 64: 286-293.
23）Auch, A.F., M. von Jan, H.P. Klenk, et al. 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. Stand Genomic Sci 2: 117-134.
24）Meier-Kolthoff, J.P., A.F. Auch, H.P. Klenk, et al. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14: 60.
25）Meier-Kolthoff, J.P., J.S. Carbasse, R.L. Peinado-Olarte, et al. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. Nucleic Acids Res 50: D801-D807.
26）Clausen, P., F.M. Aarestrup, O. Lund. 2018. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. BMC Bioinformatics 19: 307.
27）Hasman, H., D. Saputra, T. Sicheritz-Ponten, et al. 2014. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol 52: 139-146.
28）Larsen, M.V., S. Cosentino, O. Lukjancenko, et al. 2014. Benchmarking of methods for genomic taxonomy. J Clin Microbiol 52: 1529-1539.
29）Konstantinos, T., J.M.T. Konstantinidis. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 102: 2567-2572.
30）Kim, M., H.S. Oh, S.C. Park, et al. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 64: 346-351.
31）Yoon, S.H., S.M. Ha, J. Lim, et al. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie Van Leeuwenhoek 110: 1281-1286.
32）Jain, C., R.L. Rodriguez, A.M. Phillippy, et al. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun 9: 5114.
33）Tanizawa, Y., T. Fujisawa, Y. Nakamura. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. Bioinformatics 34: 1037-1039.
34）Yamada, K., Y. Ishii, K. Tateda. 2023. Diversity of *bla*$_{\text{L1-like}}$ genes in *Stenotrophomonas* species: insights from genome analysis of publicly available genome sequences. Antimicrob Agents Chemother 67: e0067323.
35）Yamada, K., Y. Ishii, K. Tateda. 2024. Biochemical characterization of the L1-like metallo-β-lactamase from *Stenotrophomonas lactitubi*. Antimicrob Agents Chemother 68: e 00866-23.
36）Chew, K.L., S. Octavia, D. Lai, et al. 2021. *Staphylococcus singaporensis* sp. nov., a new member of the *Staphylococcus aureus* complex, isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 71.
37）Schutte, A.H.J., N. Strepis, W.H.A. Zandijk, et al. 2021. Characterization of *Staphylococcus roterodami* sp. nov., a new species within the *Staphylococcus aureus* complex isolated from a human foot infection. Int J Syst Evol Microbiol 71.
38）Tong, S.Y., F. Schaumburg, M. J. Ellington, et al. 2015. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 65: 15-22.
39）Becker, K., F. Schaumburg, A. Kearns, et al. 2019. Implications of identifying the recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diseases (ESGS). Clin Microbiol Infect 25: 1064-1070.
40）Tohya, M., K. Teramoto, S. Watanabe, et al. 2022. Whole-genome sequencing-based re-identification of *Pseudomonas putida/fluorescens* clinical isolates identified by biochemical bacterial identification systems. Microbiol Spectr 10: e 0249121.
41）西山直哉，上地幸平，當銘高明，他. 2019. POM-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生を有する *Pseudomonas otitidis* を分離した 6 例. 日臨微誌 29: 21-25.
42）Clark, L.L., J.J. Dajcs, C.H. McLean, et al. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. Int J Syst Evol Microbiol 56: 709-714.
43）Sawada, H., K. Takeuchi, N. Someya, et al. 2023. *Pseudomonas solani* sp. nov. isolated from the rhizosphere of eggplant in Japan. Int J Syst Evol Microbiol 73.
44）Yamada, K., M. Sasaki, K. Aoki, et al. 2021. *Pseudomonas tohonis* sp. nov., isolated from the skin of a patient with burn wounds in Japan. Int J Syst Evol Microbiol 71: 005115.

Advancements in Bacterial Identification Through Genome Sequencing

Kageto Yamada
Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine

Since the advent of massively parallel sequencing (next-generation sequencing) technology, more than a decade has passed. Consequently, the number of analyzed bacterial genome data has been increasing annually. However, the utilization of genome data in clinical microbiology testing remains at the research stage. While species identification using bacterial genome data is currently the most high-resolution method available, the cost and intricate nature of data management may pose challenges to its widespread adoption. This paper provides an overview of species identification methods using genome data, as well as other species identification methods. It is expected that the advancement of genome data utilization will further enhance the development of clinical microbiology.