

細菌 Premium 報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発 行 日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表（論文投稿）や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービス等を医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

生理・性状	遺伝子解析
印	印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6155 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

検体情報

検体名	SIID	受取日
SAMPLE	00000	202x 年 xx 月 xx 日

備考

--

目的

16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) 塩基配列解析、形態観察および生理・生化学性状試験 (以下、細菌第一段階試験および細菌第二段階試験) の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 培養条件

- ・ 培地 アキュディア トリプトソーヤ寒天培地 顆粒 (Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan)
- ・ 培養温度 30°C
- ・ 培養確認時間 24 時間
- ・ その他条件 好気培養

2. 16S rDNA 塩基配列解析

- ・ DNA 抽出 シカジーニクス DNA 抽出試薬 ST (Kanto Chemical, Japan)
- ・ PCR 増幅 Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)
- ・ サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- ・ 使用プライマー¹⁾ PCR 増幅: 9F, 1510R
シーケンス (約 1,500 bp): 9F, 515F, 1099F, 536R, 926R, 1510R
- ・ シーケンス ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)
- ・ 塩基配列決定 ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)
- ・ BLAST 相同性検索²⁾ 解析ソフトウェア: ENKI v3.3 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-BA18.0 (TechnoSuruga Laboratory)
国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)
検索日: 202x 年 xx 月 xx 日
- ・ 簡易分子系統解析 系統樹の推定: 近隣結合法³⁾
塩基置換モデル: Kimura-2-parameter⁴⁾
樹形の信頼性評価: ブートストラップ法⁵⁾ (1,000 反復)

3. 細菌第一段階試験

実体顕微鏡によるコロニー観察、光学顕微鏡による形態観察および Barrow & Feltham⁶⁾の方法に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵(O/F) について試験を行いました。

- ・ グラム染色 フェイバーG「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical, Japan)
- ・ 顕微鏡 光学顕微鏡 BX50F4 (Olympus, Japan)
- ・ 実体顕微鏡 SMZ800N (Nikon, Japan)

4. 細菌第二段階試験

細菌第二段階試験には以下のキットを用いました。

- ・ 使用キット API 50 CHB (bioMérieux, FRA)

5. 追加試験

追加試験は英国 NCIMB Ltd.との技術提携事項および分類・同定の関連文献に従い実施しました。

- * 塩基配列は、シーケンサーからの生データ（エレクトロフェログラム）を当社技術者が目視により確認し、修正を行った後に決定しています。
- * 会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です。

結果・考察

1. SIID00000

表 1-1. SIID00000 の DB-BA に対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

	登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
1	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM13	AE017333	1548/1548 (100.0%)	
2	<i>Bacillus haynesii</i>	NRRLB-41327	MRBL01000076	1503/1508 (99.7%)	
3	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	KJ-16	KY694465	1499/1508 (99.4%)	
4	<i>Bacillus cabrialesii</i>	TE3	MK462260	1519/1546 (98.3%)	
5	<i>Bacillus inaquosorum</i>	DSM22148	AMXN01000021	1517/1544 (98.3%)	
6	<i>Bacillus szezeyi</i>	CCUG70177	MRBK01000096	1492/1508 (98.9%)	
7	<i>Bacillus halotolerans</i>	DSM8802	AM747812	1512/1541 (98.1%)	
8	<i>Bacillus aerius</i>	24K	AJ831843	1484/1494 (99.3%)	
9	<i>Bacillus sonorensis</i>	BCRC17416	EF433411	1461/1468 (99.5%)	
10	<i>Bacillus mojavenis</i>	IFO15718	AB021191	1498/1527 (98.1%)	
11	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM11031	AB021198	1500/1531 (98.0%)	
12	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM10	AJ276351	1490/1518 (98.2%)	
13	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM9070	AB021181	1487/1516 (98.1%)	
14	<i>Bacillus stercoris</i>	D7XPN1	MN536904	1482/1509 (98.2%)	
15	<i>Bacillus spizizenii</i>	DSM15029	MN536905	1481/1509 (98.1%)	
16	<i>Bacillus nakamurai</i>	CCUG68786	KU836854	1481/1509 (98.1%)	
17	<i>Bacillus siamensis</i>	PD-A10	GQ281299	1481/1520 (97.4%)	
18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC15535	AB255669	1444/1473 (98.0%)	
19	<i>Bacillus capparidis</i>	EGI6500252	KY003162	1480/1539 (96.2%)	
20	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a	AJ831841	1478/1535 (96.3%)	
21	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K	AJ831844	1478/1535 (96.3%)	
22	<i>Bacillus acidicola</i>	105-2	AF547209	1484/1549 (95.8%)	
23	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b	HQ223107	1427/1457 (97.9%)	
24	<i>Bacillus xiamenensis</i>	MCCC1A00008	JX680066	1460/1517 (96.2%)	
25	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC1A08372	JX680133	1454/1515 (96.0%)	
26	<i>Bacillus aquimaris</i>	TF-12	AF483625	1448/1507 (96.1%)	
27	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC1A05787	JX680098	1453/1515 (95.9%)	
28	<i>Bacillus camelliae</i>	7578-1	KT438835	1475/1550 (95.2%)	
29	<i>Falsibacillus albus</i>	GY10110	MH135316	1463/1533 (95.4%)	
30	<i>Bacillus carboniphilus</i>	JCM9731	AB021182	1450/1509 (96.1%)	

注 1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル 1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル 1 を意味します (参照 補足 7)。

注 2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味します。

注 3) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データを示します。

表 1-2. SIID00000 の国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果
 相同性スコアで上位 30 に検索された 16S rDNA 塩基配列データ

登録名	株名	Accession No.	相同性率
Bacillus licheniformis	SRCM103583	CP035404	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	NCTC10341	LR134392	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	SCDB 34	CP014793	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	BL1202	CP017247	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	LBMAE-JZ-B3	MK373278	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	OK12	CP060498	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	ATCC 14580; DSM 13	CP000002	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	DSM 13	AE017333	1548/1548 (100.0%)
Bacillus licheniformis	P8_B2	CP045814	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	ATCC 14580	CP034569	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	MCC 2514	CP038186	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	SRCM103529	CP035228	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	0DA23-1	CP031126	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	ATCC 9789	CP023729	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	BL-010	CP022477	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	SRCM100027	CP021677	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	SRCM100141	CP021669	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	SCCB 37	CP014794	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	CP6	CP049330	1547/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	ATCC 14580; DSM 13	NR_074923	1545/1545 (100.0%)
Bacillus licheniformis	KNU11	CP042252	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	PB3	CP025226	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	MT-B06	CP032538	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	SRCM103608	CP035405	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	-	LR698983	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	H2	CP065943	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	FDAARGOS 923	CP065647	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	LCDD6	CP065029	1546/1548 (99.9%)
Bacillus licheniformis	KS28	CP043490	1546/1548 (99.9%)
Bacillus sp.	PAMC28748	CP060192	1546/1548 (99.9%)

0.01

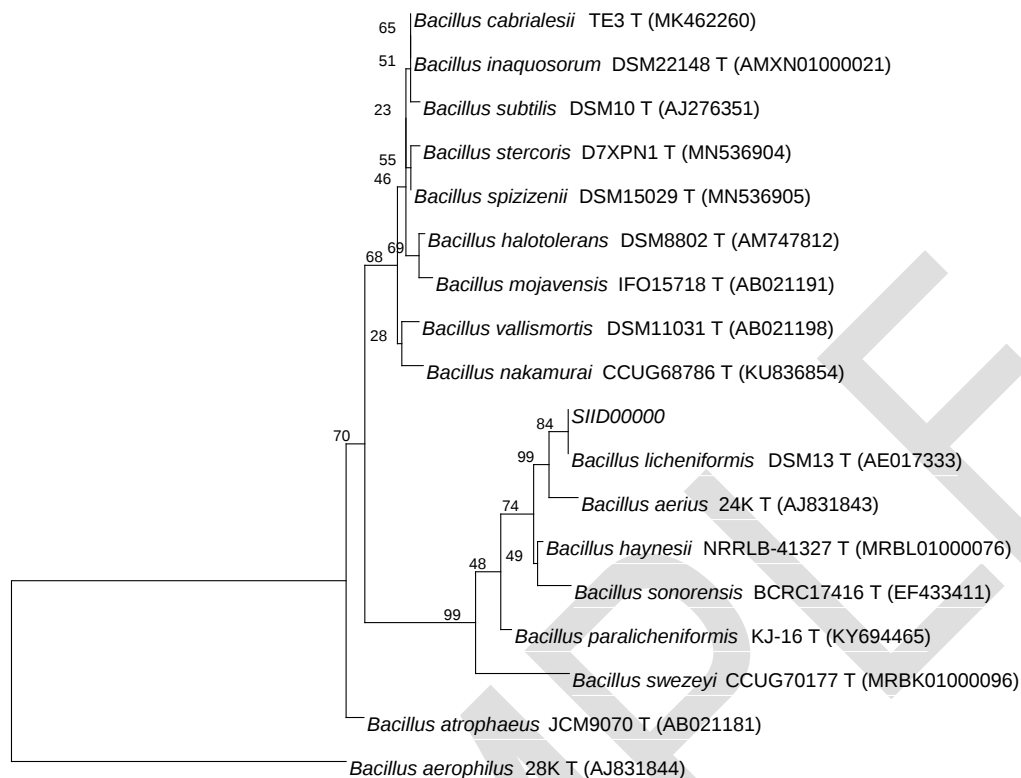


図 1-1. SIID00000 の 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統樹

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、
 株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル
 (BSL1*(日和見病原体) 以上を表記) を示します。

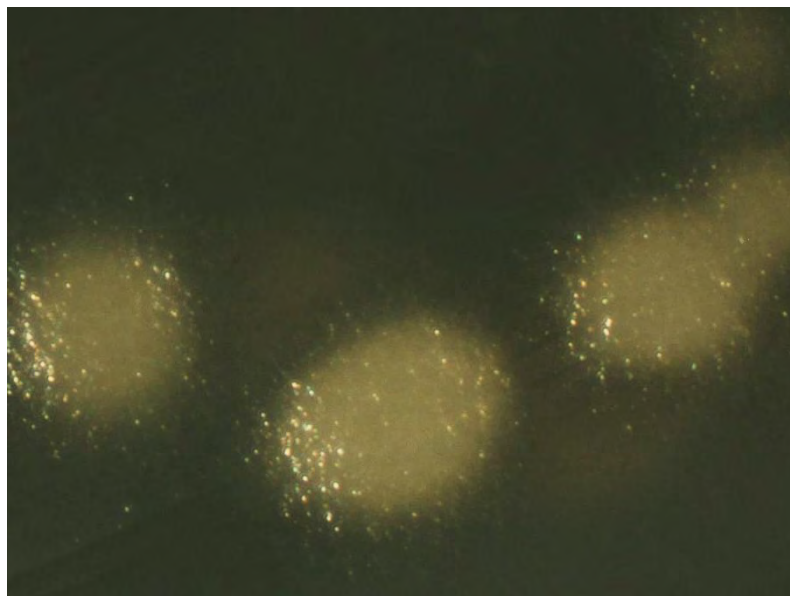


図 1-2. SIID00000 のコロニー像

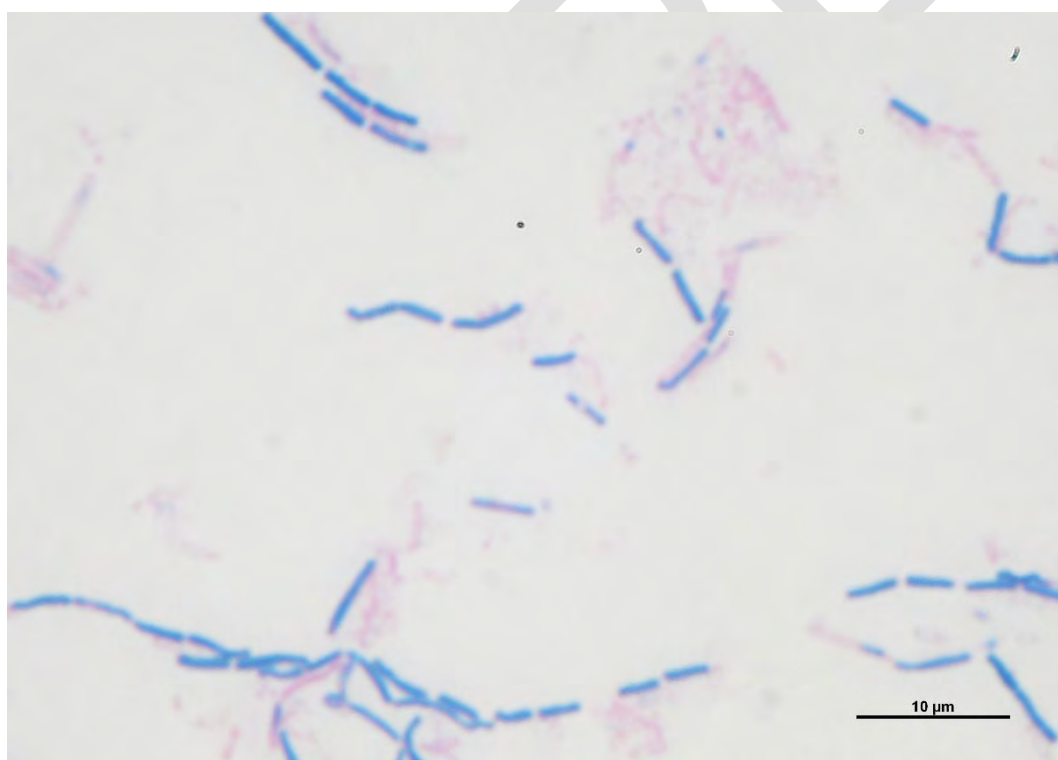


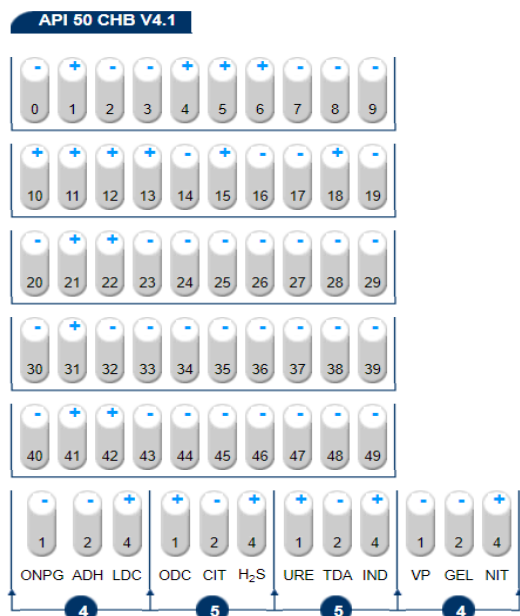
図 1-3. SIID00000 のグラム染色像

表 1-3. 細菌第一段階試験結果

試験項目		SIID00000
培養温度 (°C)		30
細胞形態		桿菌 (0.8 μm × 1.0-3.0 μm)
グラム染色性		+
芽胞の有無		+
運動性		+
コロニー形態	培地	SCD 寒天
	培養時間 (hr)	24 hr
	直径	1~3 mm
	色調	淡黄色
	形	円形
	隆起状態	レンズ状
	周縁	全縁
	表面の形状など	スムーズ
	透明度	不透明
	粘稠度	バター様
生育温度試験	37 (°C)	+
	45 (°C)	+
カタラーゼ反応		+
オキシダーゼ反応		—
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)		+/+
O/F テスト(酸化/発酵)		+/-

+ : 陽性、— : 陰性

表 1-4. SIID00000 の第二段階試験結果 (API50CHB)



+: 陽性 -: 陰性

API50CHB 項目の解説

項目	基質成分	項目	基質成分	項目	基質成分
0.	コントロール	21.	α -メチル-D-グルコシド*	42.	D-タガトース*
1.	グリセロール*	22.	N-アセチルグルコサミン*	43.	D-フコース*
2.	エリスリトール*	23.	アミグダリン*	44.	L-フコース*
3.	D-アラビノース*	24.	アルブチン*	45.	D-アラビトール*
4.	L-アラビノース*	25.	エスクリン*	46.	L-アラビトール*
5.	リボース*	26.	サリシン*	47.	グルコネート*
6.	D-キシロース*	27.	セロビオース*	48.	2-ケトグルコネート*
7.	L-キシロース*	28.	マルトース*	49.	5-ケトグルコネート*
8.	アドニトール*	29.	ラクトース*	ONPG	β -ガラクトシダーゼ**
9.	β -メチル-D-キシロース*	30.	メリビオース*	ADH	アルギニンジヒドロラーゼ**
10.	ガラクトース*	31.	サッカロース*	LDC	リシンデカルボキシラーゼ**
11.	グルコース*	32.	トレハロース*	ODC	オルニチンデカルボキシラーゼ**
12.	フラクトース*	33.	イヌリン*	CIT	クエン酸の利用性**
13.	マンノース*	34.	メレチトース*	H ₂ S	H ₂ S 産生**
14.	ソルボース*	35.	ラフィノース*	URE	ウレアーゼ**
15.	ラムノース*	36.	でんぷん*	TDA	トリプトファンデアミナーゼ**
16.	ズルシトール*	37.	グリコーゲン*	IND	インドール産生**
17.	イノシトール*	38.	キシリトール*	VP	アセトイン産生(VP) **
18.	マンニトール*	39.	ゲンチオビオース*	GEL	ゼラチナーゼ**
19.	ソルビトール*	40.	D-ツラノース*	NIT	硝酸塩還元**
20.	α -メチル-D-マンノシド*	41.	D-リキゾース*		

*発酵性試験、**生化学試験

表 1-5. SIID00000 の第二段階試験（追加試験）結果

試験項目	試験結果
55°C での生育	+
メチルレッドテスト	—
5% NaCl での生育	+
7% NaCl での生育	—

＋：陽性、－：陰性

SIID00000

BLAST 検索により最も高い相同性を示した基準株: 表 1-1, 1-2			相同率 (%)
登録名	株名	Accession No.	
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13	AE017333	100
考 察: 16S rDNA 塩基配列解析			
SIID00000 は <i>Bacillus</i> 属が構成するクラスター内に含まれ、 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T (AE017333) と同一の分子系統学的位置を示しました (図 1-1)。よって、16S rDNA 塩基配列解析の結果からは、SIID00000 を <i>B. licheniformis</i> と同定いたします。			
考 察: 細菌第一・第二段階試験			
細菌第一段階試験の結果、SIID00000 は運動性を持つグラム染色陽性の桿菌で、グルコースを酸化及び発酵し、カタラーゼ反応は陽性を示し、オキシダーゼ反応は陰性を示しました (図 1-2, 図 1-3 及び表 1-3)。これらの性状は、16S rDNA 部分塩基配列の結果において帰属が示された、<i>Bacillus</i> 属の性状と一致しました⁹⁾。 API キットをもちいて行った細菌第二段階試験の結果、SIID00000 は L-アラビノースやリボース、マンニトールを発酵し、エスクリンやラクトース、ならびにトレハロースを発酵しませんでした (表 1-4)。また追加試験の結果、SIID00000 は 50℃ で生育し、メチルレッドテストは陰性を示し、5%NaCl 添加培地では生育し、7% NaCl 添加培地では生育しませんでした (表 1-5)。これらの性状は、16S rDNA 遺伝子解析の結果において帰属が示唆された <i>B. licheniformis</i> とほぼ一致しました⁹⁾。よって、生理・生化学性状試験の結果からは、SIID00000 を <i>B. licheniformis</i> と同定いたします。			
総合考察			
16S rDNA 塩基配列解析および生理・生化学性状試験共に、検体の <i>B. licheniformis</i> への帰属を支持しました。よって、SIID00000 を <i>B. licheniformis</i> と同定します。			
同定結果			
<i>Bacillus licheniformis</i>			

まとめ

検体名	SIID	帰属分類群	バイオセーフティ レベル
SAMPLE	00000	<i>Bacillus licheniformis</i>	レベル 1

バイオセーフティレベルについて（日本細菌学会バイオセーフティ指針より）

レベル	内容
1	ヒトに疾病を起こし、或いは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの (日和見感染を含む)
2	ヒト或いは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し、重大な災害とならないもの、実験室内で曝露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。
3	ヒトに感染すると重篤な疾病を起こすが、他の個体への伝播の可能性は低いもの。

検体の近縁となった既知種の分離源情報

SIID00000

近縁菌種	<i>Bacillus licheniformis</i>
分離源	土壌、海水、食品、香辛料、コンポスト、羊のルーメン など
引用文献	Colin R. Harwood (1989). Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In <i>Bacillus / Biotechnology Handbooks</i> , Volume 2, pp27-56, Plenum Press, New York.
BSL	レベル 1
備考	

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
塩基配列テキストファイル	txt
エレクトロフェログラム	ab1
写真	JPG

補足

1. 本報告書で示す検体の同定結果は、16S rDNA 塩基配列解析および生理・生化学性状に基づき推定された帰属分類群です。分類学に基づく同定（最終的な種の異同の決定）には、形態観察や生理・生化学性状試験、DNA 塩基配列に基づく分子系統解析、化学的性状試験、DNA-DNA ハイブリッド形成試験などの試験結果から総合的に判断することが重要です。
2. 細菌の同定では、分類の基準となる基準株（種・亜種の命名基準）と比較することが重要とされています。本報告書では、各菌種・亜種の基準株の 16S rDNA 塩基配列との比較および解析の結果から、検体の帰属分類群を推定しています。
3. 本報告書で示す学名（菌種）に関する情報は、以下のウェブサイトにてご確認ください。
LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.net/>)
4. DB-BA は、弊社と国立遺伝学研究所との共同開発品です。分類学的に細菌の同定を行う際は基準株との比較を行うことが重要であることから、当データベースは基準株に由来する 16S rDNA 塩基配列データのみを収録しています。
5. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に対する相同性検索の結果は、検索を実施した時点の情報です。国際塩基配列データベースの登録情報は常に更新されており、論文などを投稿する前には、再度相同性検索することをお勧めします。
6. 簡易分子系統解析は、論文などの投稿を前提としたアライメント結果の編集および系統樹の作成は行っておりません。
7. 本報告書で示すバイオセーフティレベル (BSL) は、日本細菌学会バイオセーフティ指針「病原細菌の BSL レベル」に従います。BSL はレベル 1 が最も低いものの、レベル 1 であっても日和見感染が報告されている種があり、その安全性を保障するものではありません。また、検体の帰属種または近縁種の BSL がレベル 2 以上である場合には、検体は同等の取扱いをされることをお勧めします。なお、本報告書では、日和見病原体については「BSL1*」と表記しています。
8. 本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。

引用文献

- 1) 中川恭好, 川崎浩子. 遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法. 日本放線菌学会編集. 放線菌の分類と同定. 東京: 日本学会事務センター; 2001. pp. 88–117.
- 2) Altschul SF, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 3) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- 4) Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- 5) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- 6) Barrow GI, Feltham RKA. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.