

---

## 受賞総説

---

# 病原微生物のハイクオリティコレクションを目指して

(平成 18 年度日本微生物資源学会技術賞受賞)

余 明順

大阪大学微生物病研究所 感染症国際研究センター 病原微生物資源室  
〒565-0871 吹田市山田丘 3-1

## Establishment of high-quality culture collection of pathogenic bacteria

Myonsun Yoh

Pathogenic Microbes Repository Unit, International Research Center for Infectious Diseases,  
Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University (RIMD)  
3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Since 1967, culture collection of bacterial pathogen started at RIMD which at first belonged to the Department for Bacterial Serology. A culture collection room was established independently in RIMD supported by the Ministry of Education in 1973. It was reorganized as the Research Center for Emerging Infectious Diseases in 1998. Furthermore, in 2005 it was reorganized as the Pathogenic Microbes Repository Unit in the International Research Center for Infectious Diseases. The author worked as curator with a technician to maintain and develop the collection. A description is presented here of the history of our culture collection and the research being conducted to develop a high-quality collection at the Unit.

### はじめに

大阪大学微生物病研究所では、1967年から細菌血清学部門内に菌株保存室を設置して菌株保存を開始した。1973年に施設化が認められ、正式に微研の施設(助手一名、技術補佐員一名)として発足した。1998年には菌株保存室の拡大改組ということでエマージング感染症研究センターが設置され、その中で微生物株保存室として業務を継続した。さらに、2005年には新たに設置された感染症国際研究センターの病原微生物資源室という位置づけがなされた。このように現在に至るまでに何回か機構の改変があり、それに伴って業務の質・量ともに変化を遂げてきた。現在の当施設の業務の概要を図1に示した。

### 何が出来るのか

著者が菌株保存室に配属された当時(1975年)は、正式の施設とはいえ、毎年ささやかな経費で運営する

ことを余儀なくされていたため、前任者が過去に収集した菌株の生存の確認やリストとの照合さえ不十分なまま、依頼があれば責任を持たずに分与するという状況であった。このような実情であったため、保存業務をゼロからスタートすると考え、まず、保存に関する基本的な勉強から始めようということになった。そこで、保存法に関する情報や、病原菌を取り扱う上で知っておかなくてはならない法的知識などを集めて「菌株取り扱いガイド」(全126ページ)を作成した。作成することで私たち自身の勉強にもなったし、出来上がった冊子を所内の研究室、あるいは外部からの希望者に配布することで、病原菌を使用する研究者に対するバイオセーフティ意識の普及に役立ったと思われる。

1998年に病原細菌に対する社会的認識が高まった(1996年に大阪府堺市において発生した大規模なO157食中毒事例が大きく影響した)のを機に、機構改革(エマージング感染症研究センターの設置)が行われ、設備・運営費ともに充実してきた。しかし菌株

---

E-mail: myon@biken.osaka-u.ac.jp

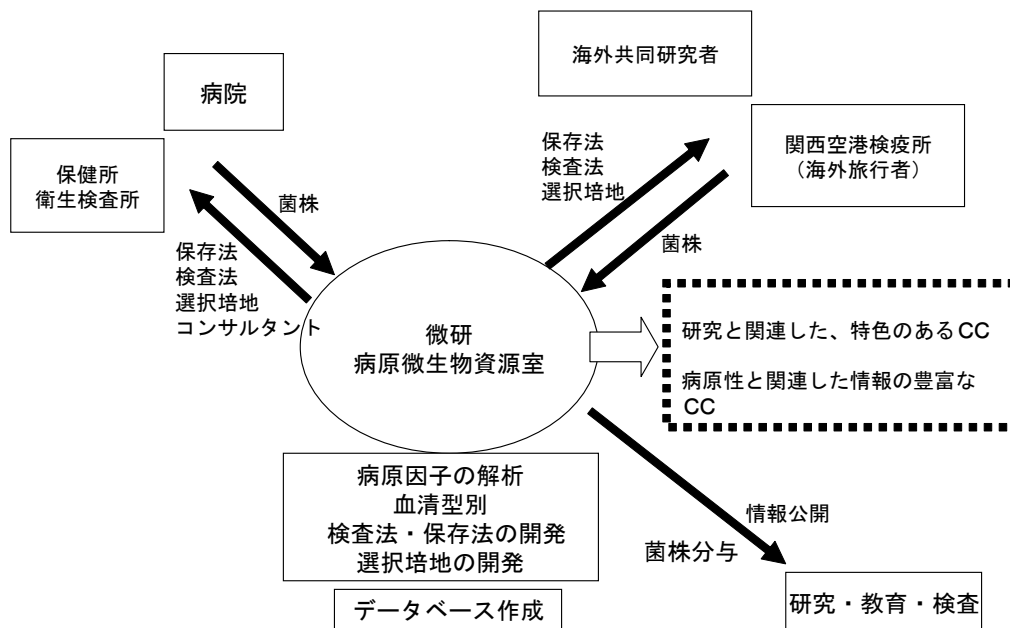


図1 現在の当施設の業務の概要

保存に従事する人員の増加は一切認められず、保存業務の重要性に対する認識の低さを痛感させられた。

そこで、与えられた条件（少人数）で質の高いコレクションを目指すための方策を検討し、以下の様な方針を打ち立てた。

- ・病原細菌の中でも専門性を重視した特色のあるコレクションにする。
- ・病原性に関わる要因、即ち病原因子に関する情報を可能な限り付加する。
- ・感染症は海外との関係を見逃して考えられないので、海外からの株を収集する。
- ・臨床現場との連携を密にして専門的立場からのサポートをするとともに、患者からの分離株を収集する。

このような方針の下に現在まで行ってきた業務および研究の一部を以下に紹介する。

### 保存法

1. 菌株保存室設置以来、ディープフリーザーが存在しなかったため、菌株保存は凍結乾燥法によって行われていた。凍結保存法が細菌細胞に与える傷害については既にいろんな検討がなされ、報告も見られたが、われわれは大腸菌変異株、*E. coli* Bs-1（放射線感受性株、修復酵素欠損株）、*E. coli* B/r（放射線抵抗性株）を用いて、凍結融解および凍結乾燥による細菌内DNAの損傷と修復について検討を行った。その結果、凍結乾燥によりDNA切断が起こるが、野生株では

培養中に修復が起こること（田中、余、1980）、ただし、凍結過程ではDNAの切断は見られず（stationary phaseの菌を用いた場合）、乾燥過程で切断が起こること（田中、余、1980）、さらに修復過程では高い頻度で突然変異が誘発されること（Tanaka *et al.*, 1979）を明らかにした。これらの結果から、凍結乾燥による保存には突然変異誘発の可能性が含まれていることを示した。

2. 旅行者下痢症の原因菌として国内でも頻繁に分離されるようになった毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC）は、LT、STと呼ばれるエンテロトキシンを産生して、下痢を起こすのであるが、これらの毒素の遺伝子はプラスミド上にコードされており、継代保存するとプラスミドが欠落して毒素を産生しなくなる現象がしばしば報告された。臨床検査の現場では分離した菌の適切な保存法を考慮する時間的、経済的余裕がないため、現場から分与された株が元の性状を維持しているかどうか不確かな状況にあった。そこで、現場で実現可能な保存法の中で、プラスミドが脱落し難い方法の検討を行った。市販の培地を用いて、室温保存、冷蔵庫保存、凍結乾燥保存、凍結保存等について比較した。その結果、ドルセット卵培地で冷蔵庫（4℃）保存するか、20%グリセロール加トリプティック・ソイ・ブロスで凍結保存（-80℃）するのがプラスミド脱落を最小限にとどめられる方法であることを明らかにした（Yoh *et al.*,

1991).

3. また、1996年大阪府堺市で起こった驚異的な食中毒の原因菌である腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC)は、主たる病原因子としてベロ毒素を産生するが、この毒素の遺伝子はファージ上にコードされているため、保存方法によっては遺伝子が脱落して毒素を産生しなくなる。われわれは、室温で継代されて毒素を産生しなくなった株を用いて、遺伝子解析を行い、ファージが脱落したためであることを明らかにし(Yoh *et al.*, 2002)、臨床現場での腸管出血性大腸菌の室温保存の危険性を示した。

### 病原因子検出法

衛生検査所や病院の検査室で分離された菌が病気の原因であるかどうかを調べるためには、病原因子を検出する必要がある。病原因子を検出するための方法としては、生物学的方法(培養細胞や実験動物を用いて調べる)、免疫学的方法(病原因子に対する抗体を作成して、抗原抗体反応で病原因子の存在を確認する)、遺伝子学的方法(病原因子の遺伝子を保有していることを確認する)などがあるが、現場でできる簡便で迅速な検出法を開発することは、臨床での早期対応に役立つばかりでなく、われわれが保存菌株について病原因子を確認する上でも有効である。そのため種々の病原因子に対する検出法の開発を試みた。

1. *Legionella pneumophila* の血清型別は、直接あるいは間接免疫蛍光抗体法によって顕微鏡下で行われていたが、黄色ブドウ球菌のプロテインAを利用したCoagglutination法を開発した。血清を用いた通常の凝集反応、血清から免疫グロブリンを精製してそれを用いた凝集反応、プロテインAを感作した精製免疫グロブリンを用いたCoagglutination法の各々に必要な最少菌濃度を比較した結果、われわれの開発したCoagglutination法が最も低濃度の菌液で感度良く凝集が観察されることを示した(Yoh *et al.*, 1985)。

2. 病原因子をコードする遺伝子を検出する方法として、酵素標識オリゴヌクレオチドプローブ法を開発した。この方法では病原因子遺伝子に特異的なDNA配列(30 mer くらい)のオリゴヌクレオチドに酵素を結合させ、プローブとした。コロニーの一部をナイロン膜に塗抹し、ハイブリダイゼーションした後、酵素反応を行わせ、色素変化を目視判定するもので、装置としては恒温槽だけを必要とし、所要時間は2時間以下(オリゴヌクレオチドが短いのでハイブリに要す

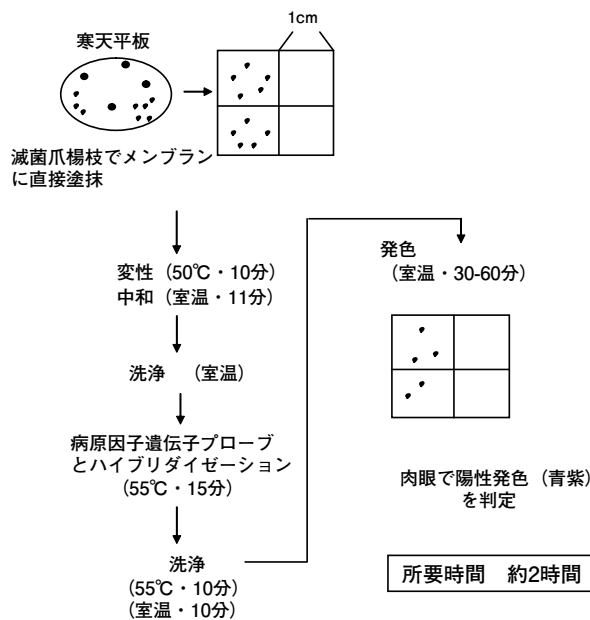


図2 酵素標識オリゴヌクレオチドプローブ法の操作手順

る時間が短い)という極めて簡便で有効な方法である。簡単な操作手順を図2に示す。

腸炎ピブリオの主要毒素であるTDH, TRHの遺伝子、コレラ毒素遺伝子(Yoh *et al.*, 1993)、毒素原性大腸菌のLT, ST遺伝子、腸管出血性大腸菌のベロ毒素遺伝子(Yoh *et al.*, 1997)などに対するプローブを作成し、食中毒検査室、空港検疫所、病院検査室等で有効に利用され、当然われわれも保存株に対して利用した。現在ではPCRという便利な方法が普及したが、それ以前にはこの方法は有用であった。

### 海外からの菌株収集

交通・輸送の著しい進歩に伴って、島国とはいえ、海外諸国とのバリアは無いに等しくなった現在では、国内の感染症の動向は、海外のそれと密接に関連している。従って、感染症研究にとって、海外で分離された菌、あるいは海外で感染して帰国した旅行者から分離された菌は貴重な研究材料である。

われわれは早くから空港検疫所と連携を保ち、海外旅行者から分離される病原菌について共同研究を展開してきた。その結果、病原性大腸菌、サルモネラ、腸炎ピブリオ、コレラ菌など多数の菌株を収集した。コレクションに海外由来株が多く含まれるのが当施設の大きな特色の一つであろう。海外分離株の輸入にいろいろな規制が加えられ、入手が困難になってきている昨今、貴重な財産といえる。

また、最近、国内で下痢の原因菌としての可能性が示されたプロビデンシア属菌 (Murata *et al.*, 2002) について、国内および海外での現状調査を始めた。協力を依頼するために先ず簡易に分離できるプロビデンシア属菌の選択培地を開発し (Yoh *et al.*, 2005)、関西空港検疫所およびタイの大学病院での分離調査を依頼した。2002年に関西検疫所で調査した結果は、下痢患者130名から23株のプロビデンシア属菌が分離されるという予想以上の高頻度であった (Yoh *et al.*, 2005)。このことは、従来食中毒原因菌とは考えられていなかったプロビデンシア属菌への認識を高めるのに役立つと思われる。

### 臨床コンサルテーション

われわれの施設のもう一つの特徴は、臨床現場との密な連携であり、いろいろな病院からの相談や依頼を受ける。分離菌の同定が困難な場合 (16S rRNA 解析や他の遺伝子解析を行う)、菌が分離できなくて、患者材料から病原因子を検出したい場合 (ELISA, RPLA 等による)、患者血清の病原因子に対する抗体価の測定依頼 (病原因子に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法等による)、院内感染で分離された菌の遺伝子解析 (PFGE や AP-PCR) 等、臨床現場からの依頼には出来る限りの協力をしてきた。そのような連携のおかげで、貴重な情報と臨床分離株を分与していただいた。

### おわりに

感染症研究の基盤となる病原微生物の保存は、最近になってやっとその重要性が認識され始めたようであるが、まだまだ本質的なものではない。行政的な対処もさることながら、研究者自身も自分達の問題としての認識が希薄であるといわざるを得ない。われわれが継承し、細々と充実させてきた病原微生物株コレクションが、将来的にも良い形で受け継がれ、さらに発展して感染症研究を支えてくれることを切に願う。

### 謝 辞

研究にご協力いただいた多くの先生方はもちろんのこと、施設長として、終始施設の運営にご助言、ご指導をいただいた故三輪谷俊夫先生、本田武司先生、私の着任以来いっしょに業務の遂行をしていただいた歴代の技術補佐員の先生方 (有田美知子博士、成田育代氏、小口富明氏、松山純子氏、岡本公子氏) に心より

お礼申し上げます。

### 文 献

- Murata, T., Iida, T., Shiomi, Y., Tagomori, K., Akeda, Y., Yanagihara, I., Mushiake, S., Ishiguro, F. & Honda, T. (2001). A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. J. Infect. Dis. **184**: 1050-1055.
- Tanaka, Y., Yoh, M., Takeda, Y. & Miwatani, T. (1979). Induction of mutation in *Escherichia coli* by freeze-drying. Appl. Environ. Microbiol. **37**: 369-372.
- 田中吉紀, 余 明順 (1980). 凍結・乾燥による細菌の DNA 傷害. 日本細菌学雑誌 **35**: 405-417.
- Yoh, M., Honda, T., Miwatani, T., Uemura, T., Kuwata, H. & Fukai, K. (1985). A staphylococcal Coagulatin test for detecting and serogrouping *Legionella pneumophila*. Microbiol. Immunol. **29**: 413-419.
- Yoh, Y., Narita, I., Honda, T., Miwatani, T. & Nishibuchi, M. (1991). Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. **29**: 2326-2328.
- Yoh, M., Miyagi, K., Matsumoto, Y., Hayashi, K., Takarada, Y., Yamamoto, K. & Honda, T. (1993). Development of an enzyme-labeled oligonucleotide probe for the cholera toxin gene. J. Clin. Microbiol. **31**: 1312-1314.
- Yoh, M., Takagi, K., Eda, J., Ohtomo, M., Takarada, Y., Shibata, S. & Honda, T. (1997). Evaluation of enzyme-labeled oligonucleotide probes to identify enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol. Immunol. **41**: 879-882.
- Yoh, Y., Bi, Z., Kamei, A., Yamaichi, Y., Matsuyama, J., Iida, T. & Honda, T. (2002). Loss of the VT2 gene during preservation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* at room temperature. Microbiol. Cult. Coll. **18**: 77-82.
- Yoh, M., Matsuyama, J., Ohnishi, M., Takagi, K., Miyagi, H., Mori, K., Park, K., Ono, T. & Honda, T. (2005). Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. J. Med. Microbiol. **54**: 1077-1082.