

ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」の リソースとしての有効活用

矢口貴志^{1)*}, 知花博治¹⁾, 楠屋陽子¹⁾, 飯田哲也²⁾, 平山謙二³⁾, 江崎孝行⁴⁾

¹⁾ 千葉大学真菌医学研究センター 〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

²⁾ 大阪大学微生物病研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1

³⁾ 長崎大学熱帯医学研究所 〒852-8523 長崎市坂本 1-12-4

⁴⁾ 岐阜大学研究推進・社会連携機構微生物遺伝資源保存センター 〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1

National BioResource Project “Pathogenic Microorganisms” — Effective utilization of resource —

Takashi Yaguchi^{1)*}, Hiroji Chibana¹⁾, Yoko Kusuya¹⁾, Tetsuya Iida²⁾, Kenji Hirayama³⁾ and Takayuki Ezaki⁴⁾

¹⁾Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

²⁾Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

³⁾Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

⁴⁾The Gifu University Center for Conservation of Microbial Genetic Resource, Organization for Research and Community Development, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

1. はじめに

ライフサイエンス研究においては、研究開発に用いるバイオリソース（生物遺伝資源）を研究者間で共有することが極めて重要である。バイオリソースは長年の研究から生み出されたものであり、それを基にして次の新たな研究が生まれる。また、共通の研究材料を扱うことは研究成果の比較のためにも必須である。優れたバイオリソースの存在は、我が国のライフサイエンス研究を強化し、国際的優位性の確保に貢献することにつながる。

このことから、日本政府は第2期および第3期科学技術基本計画において、科学技術全般を支える知的基盤（生物遺伝資源等の研究用材を含む）について、世界最高水準を目指して重点整備を進めることにした。これを受け、文部科学省は2002年度から「ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）」を開始し、国が戦略的に整備することが重要なものについて体系的に収集、保存、提供等を行うための体制を整備してきた。そして、5年ごとの見直しを行い、現在第3期の最終年度である。動物、植物、微生物等29リソース及びそれらに関する情報提供の中核拠点整備を実施してきた。

感染症の重要性が高まる昨今、感染症教育や基礎研究の他、新しい診断薬や薬剤の研究には、質の高い病原微生物の菌株が必要である。第1期、第2期のNBRP「病原微生物」に引き続き、中核機関として千葉大学真菌医学研究センター（真菌・放線菌）が、分担機関として大阪大学微生物病研究所及び岐阜大学研究推進・社会連携機構微生物遺伝資源保存センター（細菌）と長崎大学熱帯医学研究所（原虫）が病原菌株の収集、保存、提供を行う事業である（図1）。細菌・真菌（含む放線菌）・原虫のいずれにおいても、(1) 基準株（あるいは標準株）の充実と、(2) クラス2, 3の高度病原菌、(3) これまで感染例の報告のある全ての菌種、さらには、(4) 感染症の動向調査や薬剤開発のために必要となる新鮮な臨床分離株等を収集・保存・提供することを主たる目的としている。また、個々の菌株においては、質的向上を図るために、(5) 重要な菌株の遺伝子配列（細菌は16S rDNA、真菌ではITS、D1/D2の塩基配列、原虫では必須遺伝子等）を決定し、さらに、最新の菌学的性状、及びMALDI-TOF MS情報による網羅的なタンパク情報や分離株の臨床情報等をデータベースとして整備し、研究等に使用する菌株の選択に役立つ情報として公開する。高付加価値の保存株は、感染症教育や研究に提供されるばかりでなく、今後起こりうるいかなる感染症にも対応可能なレファレンスとしての病原微生物株コレク

*Corresponding author

E-mail: yaguchi@chiba-u.jp

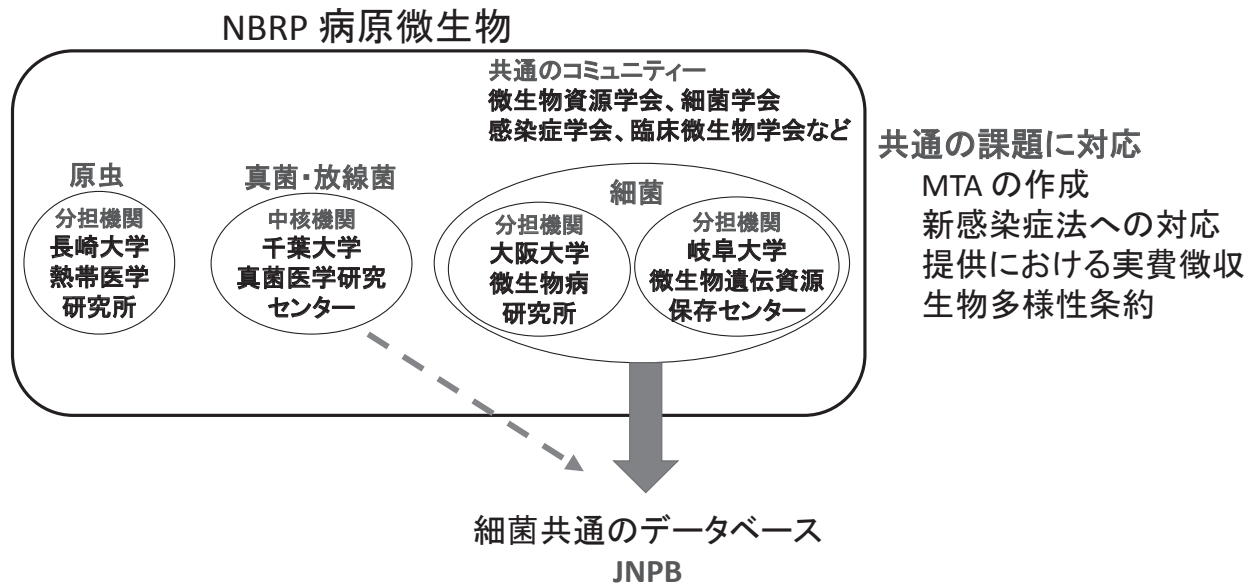


図1 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」の運営体制

ションを目指している。

日和見感染症，新興および再興感染症に対しての優れた診断法開発や新しい薬剤の開発には，対象となる病原菌株が不可欠である。その菌株は，病原性や臨床情報などが付加され，分類学的な位置が確認されたものでなければならない。また，それぞれの感染症の基準となる原因菌株，分類・同定のための基準となる標準株，ゲノム解析株は，リファレンス株として需要度は高く，利用する研究者は多い。

今後いかなる感染症にも適切に対応するためには，感染症の動向を原因菌の視点から着目し，上記の性状を備えた新鮮な臨床由来株を継続的に収集する必要がある。

高度病原微生物の取り扱い，バイオセーフティレベル3の設備を持つ施設でないと取り扱いができないこと，また，感染症法が改定されて，さらに移動や取り扱いの制限が厳しくなった。提供にあたっては，MTA (material transfer agreement) を締結し，感染症法に該当する菌株を提供する場合はその規制を遵守する。病原微生物の取り扱いができない，通常の菌株保存機関から要望があれば，培養株ではなくDNAでの提供も実施している。

ここでは，各機関が保存している病原真菌，細菌，原虫の特徴を述べるとともに，有効活用されている例を紹介する。

2. 千葉大学真菌医学研究センター保存株の特徴

千葉大学真菌医学研究センターは，国内唯一の真菌症とその原因菌を専門に研究する公的機関である。その中で正式な組織（バイオリソース管理室）として専任の教員（准教授，助教，技術職員各1名）が配置されている。保存菌株20,000株のうち約7割が真菌症原因菌であり，真菌全般を保存している世界的な保存機関であるNITE バイオテクノロジーセンター（NBRC），理研バイオリソースセンター（JCM），American Type Culture Collection（ATCC，アメリカ），Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre（CBS，オランダ）より臨床由来株は遥かに多く，臨床情報も充実している。臨床由来株は，菌種の同定，薬剤感受性試験の実施など医療機関からの依頼を通じて，さらに，千葉大学医学部附属病院には，我が国初の真菌症専門外来を開設し（真菌医学研究センターの教員が兼務），他の医療機関の臨床コンサルタントを実施するなど，医療機関との連携を通じて菌株，臨床情報（特に重要）の収集を実施している。また，P3設備を設置しており，高度病原菌の安全な取り扱いが可能である。

3. 岐阜大学研究推進・社会連携機構微生物遺伝資源保存センター保存株の特徴

1951年より岐阜大学医学部微生物学講座として，約半世紀に渡り，主にヒトに対する病原性細菌の菌株収集と同時に遺伝資源としてそれら病原性細菌を日本

国内外の研究者に対し提供してきた。現在では、特定病原体、日和見病原体および教育用弱毒株など幅広い細菌コレクションを有している。本機関は、岐阜大学医学部微生物学講座であったが、平成22年度からは岐阜大学医学部病原微生物センター（Gifu University School of Medicine Pathogenic Bacterial Genetic Resource Stock Center）として整備・運営されてきた。平成28年度からはGTC（Gifu type culture）株の収集、保存および分譲業務を医学部から岐阜大学研究推進・社会連携機構微生物遺伝資源保存センターが引き継ぎ、全学のセンターとして運用を開始している。本機関では、ヒトに対する病原体を中心として、現在約20,000株を越える病原細菌を保有し、約5,000株を分譲可能菌株として公開している。

本機関には、専任職員2（技術補佐員、事務補佐員）と兼任教員2（教授、助教）が配置され、前身の医学部病原微生物センターから引き継いだ菌株保存室と事務室の2部屋を専用スペースとして確保している。菌株保存室には、菌株保存用超低温（ -80°C ）冷凍庫、液体窒素タンク、凍結乾燥機およびアンプル融封機が導入されており、凍結乾燥保存、液体窒素保存も日常的に実施している。また、従来どおり医学部棟内のBSL3実験室にて、高度病原菌の安全な取り扱いが可能な状態も維持されている。昨年からは大阪大学との役割分担を積極的に進め、Japan National Collection of Bacterial Pathogens（JNBP）として重要な病原細菌の網羅的な収集を目指している。本機関への分譲要求の多くは、既に特徴（基準株、病原性、血清型、毒素遺伝子の保有の有無）が明らかになっている菌株が大多数であるため、今後、菌株に付随する情報を更に充実させ、より多くの利用者に魅力のある有用な情報を付帯したコレクションとして整備を進める。また、特に高度病原体については取り扱いが困難な施設でも利用可能となるゲノムDNAでの分譲も行っており、この方面のサービスについては、今後も積極的に展開していく。

4. 大阪大学微生物病研究所保存株の特徴

大阪大学微生物病研究所における菌株保存事業の歴史は古く、1934年、研究所設立と同時に細菌血清学部門内でスタートし、約40年後に文部省から研究所附置施設として認可を受けた。現在は、2005年に研究所に新設された感染症国際研究センター内の病原微生物資源室として位置づけられている。11,000株を越える病原細菌を保有し、約1,400株を分譲可能菌株と

して公開している。歴史的な経緯からこれまで腸管感染細菌を中心に病原細菌の収集・保存・分譲を行ってきており、特にビブリオと病原性大腸菌の公開菌株については、ATCCやDSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）等海外の主要カルチャーコレクションを凌駕している。専任職員1（特任技術職員）と兼任教員2（教授、准教授）が配置され、電源系統の異なる156平米の本室と75平米の分室の2部屋を専用スペースとして確保している。また、BSL3設備を保有し、高度病原菌の安全な取り扱いが可能である。昨年からは岐阜大との相補的な役割分担を積極的に進め、JNBPとして重要な病原細菌の網羅的な収集を目指している。感染症法の改正に伴って臨床分離株を保存しない国内の施設が増えたことなどから、その受け皿となる病原細菌カルチャーコレクションの機能を担うことが期待されている。感染症法の対象となるような病原細菌については病原体の取り扱い施設がない研究機関や一般企業などでは取り扱いが難しい場合も多いが、ゲノムDNAでの提供も行うことで需要に対応している。さらに医療機関や民間企業、警察などからの相談や依頼に応じて原因病原体の同定や型別解析などの支援も行い現場へのフィードバックを行っているほか、菌株の保存法についての情報提供も行っている。

5. 長崎大学熱帯医学研究所保存株の特徴

長崎大学熱帯医学研究所は、国内唯一の熱帯感染症を専門に研究する公的な機関である。昨年発足した熱帯生物資源室（バイオリソースセンター）は所長直下の組織であり、専任の教職員（助教1、技術補助員1）が配置され、維持管理に必要な50平米の専用スペースを確保している。オンラインによる原虫株情報公開数は111件、累積保存数780株、そのうち標準基準株保有数45で残りが臨床分離株である。寄託も含めた収集数例年30株程度、提供数は例年100株程度である。ATCCとの比較で特に重要なのは、シャーガス病の病原原虫であるクルーズトリパノソーマの臨床分離株とマラリアの動物モデルであるネズミマラリアの標準基準株の各コレクションである。熱研は熱帯医学共同利用研究拠点として全国の拠点プロジェクト研究者にリソースを提供し、またプロジェクトからのリソースの提供を受けることができる。専任の教員と兼任の専門分野の教員により、シャーガス病、リーシュマニア症、アメーバ赤痢の血清あるいはDNA診断に関する相談窓口としての機能を有している。現在3基の中規

模液体窒素タンク内に 380 本の冷凍保存株を維持しており、外部からの要望に対応している。情報開示、ユーザーとの連絡業務は専用のパソコンとインターネットを用いて実施している。

6. 病原真菌（酵母）の有効利用

病原性 *Candida* 属は、主に腸管粘膜に常在する真菌であり、健常者には罹患しないが、免疫力の低下した高齢者、エイズ患者、抗がん治療患者、臓器移植患者等の易感染患者に対して重篤な全身感染を起こす。細菌類を含む全血流感染症原因菌のうち *Candida* 属は第 4 位、全体の 7～8% を占め、致死率 20～50% に達し、国内で約 200 人/年の死亡数が報告されている。超高齢社会における易感染患者の増加は不可避であり、感染メカニズムの研究は重要な課題である。また、抗真菌薬については、全身感染患者に対して投与が可能な薬剤は、キャンディン系、ポリエン系、アゾール系、ピリミジン系の 4 系統と少なく副作用や耐性菌ならびに耐性株の問題が生じているため、新たな抗真菌薬の開発は急務である。そこで我々は、病原性真菌の中で耐性株の増加で、特に注目されている *Candida glabrata* について、体系的且つ網羅的遺伝子組換え体の作製し（図 2）、本コレクションを感染実験、抗真菌薬標的分子の選抜、抗真菌薬活性物質のスクリーニングと標的分子の同定等の研究材料として用いることによって、感染メカニズムの解明と抗真菌薬の開発研究を進めている。

7. 病原真菌（糸状菌）の有効利用

真菌による感染症は年々増加傾向にあり、特に *Aspergillus* 属真菌により発症するアスペルギルス症は、しばしば重篤な症状を引き起こす。アスペルギルス症を引き起こす主要原因菌の一つは *Aspergillus*

fumigatus である。分類学的研究の発展により *A. fumigatus* と類似の形態を示すが、分子系統的に異なる関連種、*A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* の単離と識別が可能となった。それらもアスペルギルス症の原因菌となることが明らかにされたが、アスペルギルス症の第一選択薬として用いられるアゾール系薬剤に対して *A. fumigatus* よりも高い耐性を示す（図 3）。関連種における高い薬剤耐性能の解明、ならびに新規抗真菌薬の開発に向けて、ゲノム配列の基盤情報の整備が欠かせない。そこで我々は、真菌医学研究センターが保有する関連種の複数菌株を対象に、次世代シーケンサー、MiSeq, HiSeq, PacBio を用いてドラフトゲノム配列を整備してきた。取得したゲノム配列を調べた結果、*A. fumigatus* で既知のアゾール系薬剤の標的遺伝子 *Cyp51A* 遺伝子が、関連種 *A. lentulus*, *A. udagawae* と *A. viridinutans* にも高度に保存されていることを確認した。*A. fumigatus* では、*Cyp51A* 遺伝子内の点変異が、アゾール系薬剤耐性獲得の一因であることが報告されている。関連種の *Cyp51A* 遺伝子のアミノ酸配列の比較解析によって、*A. fumigatus* では報告のなかった点変異が関連種間に共通して見出された。それらのアミノ酸残基が、関連種の高い薬剤耐性能を付与している可能性が考えられる。また、機能は明らかにされていないが、*A. fumigatus* で報告されている遺伝子 *Cyp51B* 遺伝子も関連種に存在することが確認でき、薬剤耐性機構の詳細な知見を得る手掛かりとなることが期待される。更に今回のゲノム配列の解析により、それぞれの関連種に *A. fumigatus* には存在しない二次代謝産物生合成遺伝子のクラスターが予測され、新たな有用な化合物の発見も期待される。関連種と *A. fumigatus* の比較ゲノム解析により推定される薬剤耐性機構等、新たな知見が見出されている。

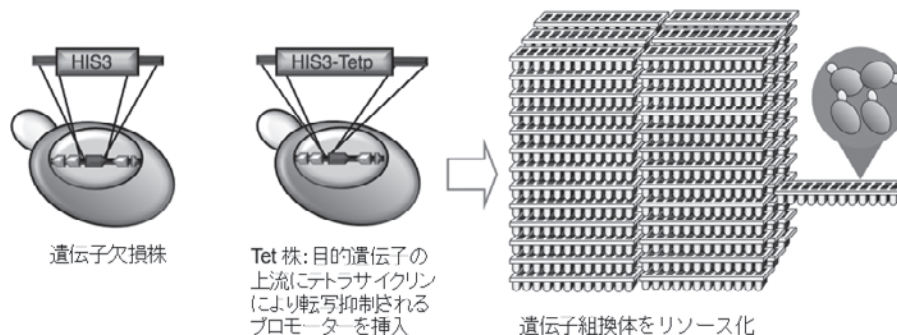


図 2 *Candida glabrata* 遺伝子組換え体のリソース化

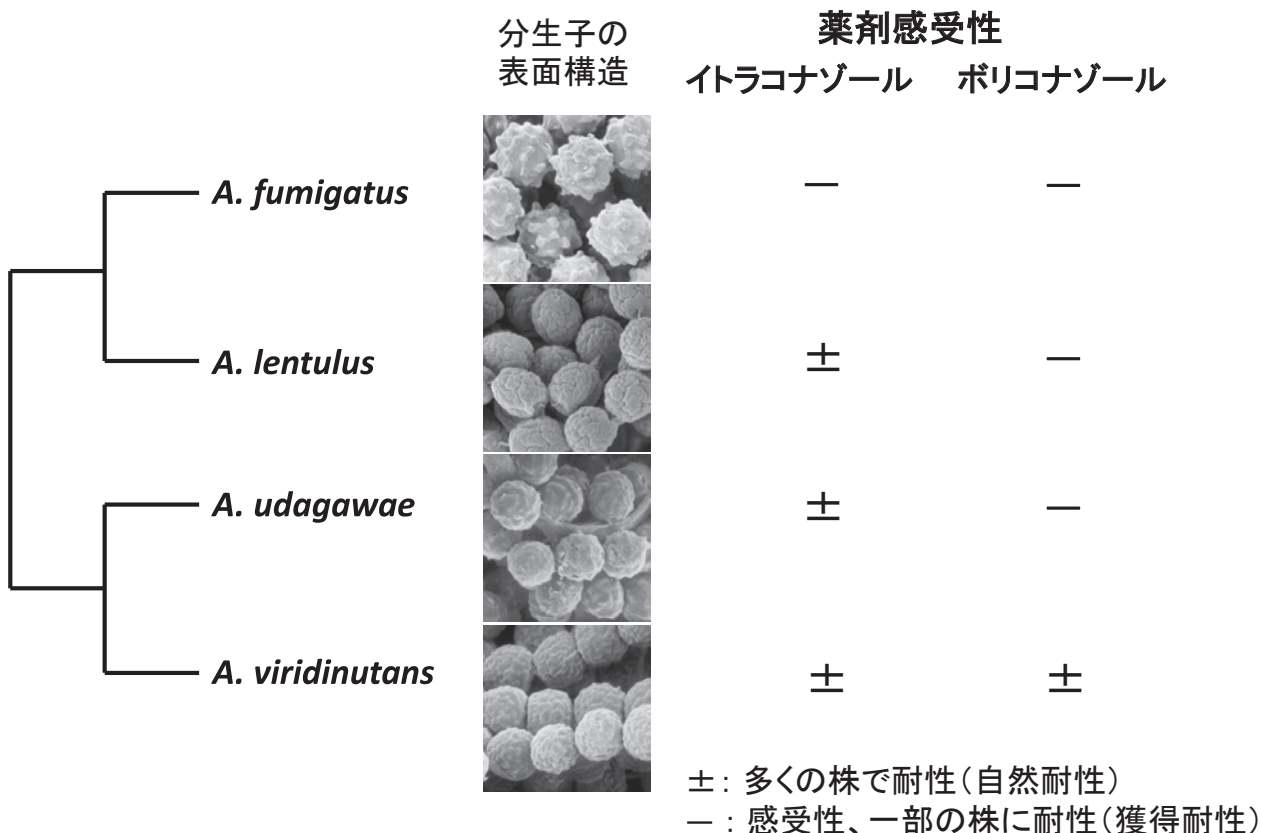


図3 *Aspergillus fumigatus* および関連種の相関

8. 病原細菌の有効利用

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は、1950年、大阪で発生した「しらす干し」を原因とする食中毒事件を契機として、大阪大学の藤野恒三郎博士らにより発見された食中毒原因細菌である。海水や汽水域に生息するグラム陰性桿菌で、生または調理不十分な魚介類の経口摂取によりヒトに感染し、8～24時間の潜伏期間を経て、激しい腹痛を伴う下痢や発熱を主症状とする急性胃腸炎を引き起こす。腸炎ビブリオは我が国において長年食中毒原因の上位を占めてきたが、これは刺身や寿司など、海産魚介類を生食することが多い日本人の食文化によるところが大きい。近年は、台湾やタイ、インド、バングラデシュ等日本以外のアジアの国々においても腸炎ビブリオ食中毒は頻発しており、また、従来発生事例の少なかった北米や南米においても食中毒事例の発生の報告が続いている。

環境から分離される腸炎ビブリオのほとんどはヒトに対して病原性を示さない。一方、下痢患者から分離される腸炎ビブリオの多くは耐熱性溶血毒 (TDH, thermostable direct hemolysin) を産生し、我妻培地

(マンニトールを加えた血液寒天培地) 上で溶血現象を示す。これを神奈川現象 (KP) という。TDHはKPの原因物質であり、精製したTDHは溶血活性、心臓毒性、腸管毒性等の生物活性を持つことが示されている。また、1987年にKP陰性の腸炎ビブリオによる食中毒が報告されたが、この原因菌はTDHを産生しないかわりに、TDH類似溶血毒 (TRH, TDH-related hemolysin) という別の毒素を産生していた。TRHは遺伝子レベルでTDHと約68%の相同性を持ち、TDHとよく似た生物活性を示すものの、TRH産生腸炎ビブリオはKPを示さない。これらTDHとTRHはヒトに病原性を示す腸炎ビブリオの分子マーカーであり、長年腸炎ビブリオの主要な病原因子と考えられてきた。しかしながら、本菌のゲノムの全塩基配列の決定により新たな病原性発現メカニズムが明らかになってきた。

本菌のゲノム解析の結果、本菌が持つ大小2つの染色体上に各1セットずつ、3型分泌装置 (T3SS) をコードする遺伝子群が見つかった。T3SSは細菌のタンパク質を宿主である真核生物の細胞内に直接注入するこ

とができる注射針様構造を持つタンパク質分泌装置である。赤痢菌やサルモネラ、バクテロイデスやある種の植物病原菌など、宿主細胞と密接な相互作用をして病気を起こす病原細菌の主要な病原因子であることが知られている。病原細菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質をこの分泌装置によって宿主細胞内に注入することにより、宿主への感染や宿主細胞内における増殖を可能にする。腸炎ビブリオに見出された2セットのT3SSのうち、大染色体上のT3SS (T3SS1)は、環境分離株を含めて全ての腸炎ビブリオが持っており、培養細胞に対する細胞毒性に関与している。一方、小染色体上にあるT3SS (T3SS2)は、病原性に関わる遺伝子が集中して存在する染色体上の領域 Pathogenicity Island (PAI: 病原性の島) にコードされており、ヒト病原株のみが保有している。動物モデルを用いた実験 (ウサギ腸管ループ試験における液体貯留活性) により、T3SS2が腸炎ビブリオの腸管毒性に必須であることが示され、ヒトに対する病原性 (下痢原性) に重要な役割をしているものと考えられた。このように、近年、腸炎ビブリオの病原性研究に新たな展開がもたらされている。

腸炎ビブリオの下痢原性に重要な働きをしているT3SS2がどのような条件で産生されるかを解析した結果、興味深いことが明らかになってきた。T3SS2の遺伝子群は胆汁酸によって強く発現が誘導される。腸炎ビブリオは経口的に摂取された後、小腸で増殖しヒトに病気を起こすと考えられているが、胆汁酸は経口的に摂取された腸炎ビブリオが胃を通過して十二指腸に到達した際に暴露される物質であり、小腸で病気を起こす腸炎ビブリオにとって、胆汁酸がT3SS2の産生誘導のシグナルとなっているのは合目的的であるといえる。このようにT3SS2の産生誘導因子が明らかになったことで、この知見を発症制御に応用しようという試みも動物実験レベルでなされている (図4)。陰イオン交換樹脂であるコレステラミンという物質は、腸管内で胆汁酸と結合し、胆汁酸の小腸での再吸収を抑えることから、高脂血症治療薬として用いられている。このコレステラミンを腸炎ビブリオの腸管毒性を調べる動物モデル系 (ウサギ腸管ループ試験) で菌と同時投与したところ、腸炎ビブリオによる液体貯留が有意に低下した。このことは、T3SS2の産生誘導因子である胆汁酸のレベルを下げることで、腸炎ビブリオによる下痢症を抑制できる可能性を示している。このようなアプローチは、抗菌薬のように病原菌を殺したり、菌の増殖を抑えたりする (その結果、耐

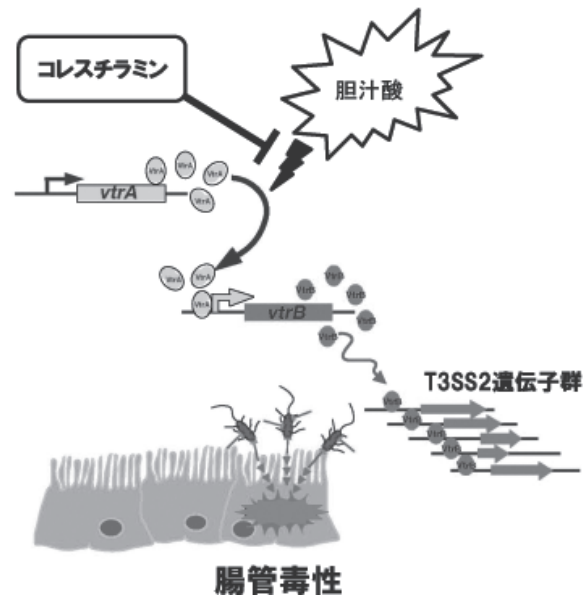


図4 T3SS2 遺伝子群の発現誘導メカニズムと発現抑制の可能性. 腸炎ビブリオの腸管毒性に必須であるT3SS2 遺伝子群は、2種類の制御因子VtrAとVtrBによって発現が正に制御され、胆汁酸がVtr制御系の発現誘導因子であることが明らかになっている。コレステラミンのような陰イオン交換樹脂の投与により胆汁酸を除くことで、T3SS2の発現および腸管毒性が抑えられることが動物実験で示されている。

性菌が出現する) ことで発症を抑えるのとは違い、病原菌の病原性だけを抑える、いわゆる「antivirulence therapy (病原性制御療法)」の一例であるといえる。

このような、腸炎ビブリオの病原性発現機構の解明、および新規発症制御法の開発に、大阪大学微生物病研究所に保存の患者由来および環境由来腸炎ビブリオ菌株が有効に利用されている。

9. 病原原虫の有効利用

シャーガス病は中南米を中心とするラテンアメリカの風土病で、サシガメという吸血性の昆虫により媒介される原虫 *Trypanosoma cruzi* による人獣共通感染症である。流行地ではサシガメによる自然感染や母親からの経胎盤感染などにより5歳ぐらゐまでに30%の人が感染しその多くは慢性感染へと移行する。数年から数十年の無症候の期間の後、約半数が何らかの合併症を呈する。南米ボリビアではその6割が心筋障害や不整脈を伴う心臓シャーガス、残りが結腸の神経叢破壊を伴う巨大結腸症を伴う消化管シャーガスという病型を呈し、40代からの死亡率を高めていることが

推測されている。WHOの推計では、中南米の2010年の年間新規感染者が38,600人、慢性感染者が574万人となっている。シャーガス病の分布域は合衆国の南部からアルゼンチンやチリに至るアメリカ大陸に広がっているため、原虫や媒介昆虫に種内変異が著明に認められ、患者の合併症にも中米と南米大陸の間に地域差が認められる。

シャーガス病は途上国とりわけ農村部の貧困層で蔓延しているため、その対策が著しく遅れている、いわゆる顧みられない熱帯病 Neglected Tropical Diseases (NTD) の代表格とされている。そのため治療薬の開発が十分に進んでいない。現在有効とされているのは、ベンズニダゾールとニフルティモックスという薬剤であるが、乳幼児期以降の年長児や成人では発疹や吐き気などの副作用が強く、また投与期間も2か月間毎日服用が必要で十分な治療も困難で放置されている。アステラス製薬が中心となり、複数の大学、研究機関及び臨床開発 NPO が協力して行った抗シャーガス病薬

の開発において、長崎大学熱帯医学研究所保存株が使用された(図5)。

10. おわりに

医療の進歩に伴い免疫不全患者における日和見感染症は増加し、また新興および再興感染症が散見されるなど、感染症の重要性は益々高まっている。病原微生物を扱う研究機関としては厚労省の国立感染症研究所があるが、国民の健康を第一義とし、一般の研究者には菌株の提供を実施していない。また、個々の研究者が収集してきた病原微生物株が、研究者の退職、研究テーマの変更などにより引き継がれないケースがままある。これら病原菌株は重要な資源であり、集約管理することは NBRP としての重要な役目である。

今後も、研究者の研究基盤を支え、利用者の要望に応じるため、病原微生物の収集、保存を継続して、利用機関へのリソース提供を中断させないため、NBRP として病原微生物を整備し維持していく所存である。

NTDs創薬研究コンソーシアムにおける創薬研究の全体像



3種の先端的創薬アプローチと産官学との創薬推進体制を通じて、<https://www.astellas.com/jp/csr/health/ntds.html>
抗寄生原虫薬と抗デングウイルス薬の早期創出を目指した(2016年3月終了)

- IT創薬とは…スーパーコンピュータと最先端のIT技術を活用したインフォメーションテクノロジー創薬
- FE創薬とは…Fragment Evolutionというアステラス製薬独自のリード化合物設計手法を活用した創薬

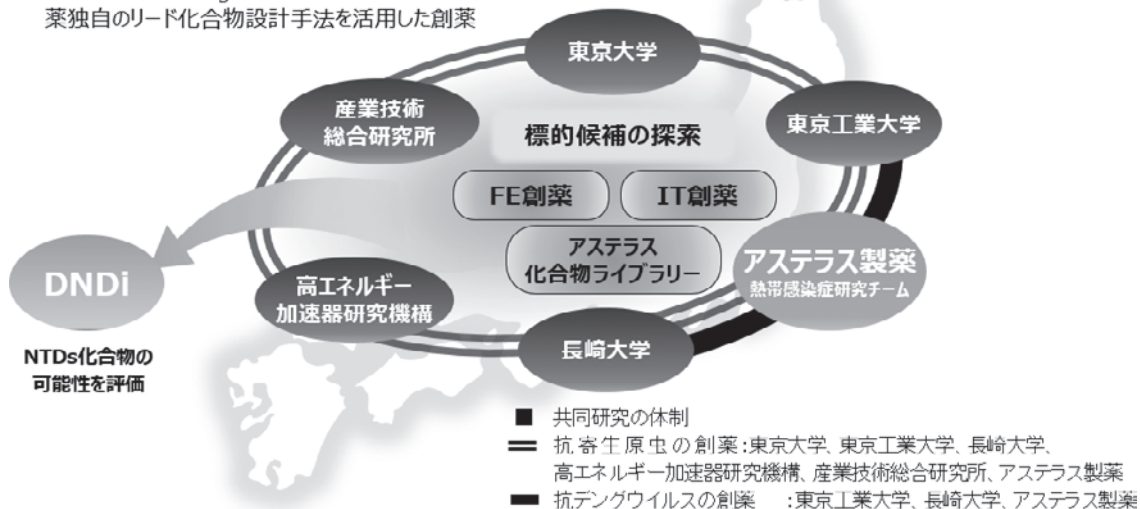


図5 抗シャーガス病薬の開発体制