

受賞総説

理研 BRC-JCM における好気性細菌リソースの整備と関連業務 (2021 年度日本微生物資源学会技術賞受賞)

押田祐美

国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室
〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

Collection of aerobic bacteria and related work at RIKEN BRC-JCM

Yumi Oshida

Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Research Center
3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

はじめに

理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室(理研 BRC-JCM, 以下 JCM)は, 学術・研究基盤として有用な細菌・アーキア・糸状菌・酵母を中心に微生物系統保存事業を実施している。1981 年に活動を開始してから本年度で 40 年目となる。筆者は 1999 年に JCM において好気性細菌担当者の培養・保存業務の補助者として勤務を始めたが, 2002 年に上記担当者が退職されたので, その担当菌株の維持や新たに寄託される菌株の受入, 登録, 保存業務全般を室長や他の菌株担当者の指導を受けながら担当することとなった。当初は次の菌株担当者が採用されるまで何とかつなげられればという気持ちで引き受けたのだが, 少しずつ対応できる業務を増やしながら日常業務を行っていきうち, 気づけば 22 年も勤務していたのが現状である。ここでは筆者が JCM でこれまで行ってきた菌株保存業務や関連する業務を中心に紹介したい。

JCM の菌株保有数および人員

JCM の菌株保有数は 2021 年 8 月現在約 30,000 株でそのうち約 18,700 株を公開しており, 保有菌株の内訳は, 細菌約 20,450 株, アーキア約 930 株, 真菌約 8,650 株となっている。JCM でリソース整備業務を担当している人員は, 大熊室長の下, 在庫管理や提供・

寄託の事務的な業務を行うリソース事業推進担当部門の 1DG と, 微生物株担当部門で真菌を担当する 3DG, 好気性細菌・放線菌担当の 4DG, 嫌気性細菌, 極限環境細菌およびアーキアを担当する 5DG と, 遺伝子解析を担当する品質管理担当部門 6DG に配置される総勢 31 名で業務に当たっている。

JCM への菌株寄託の状況

筆者が前担当者の菌株を引き継いだのと同時期の 2002 年に, 細菌・アーキアについて命名規約の改定があり, 基準株を 2 ヶ国 2 ヶ所の保存機関へ寄託することが国際原核生物分類命名委員会より義務づけられた。このことにより JCM への細菌・アーキアの寄託も大きく増加することとなった, それ以降の寄託数はそれまでに比べると平均で 3 倍以上になっている(図 1)。寄託者がスムーズに論文投稿を進めるためにも, 寄託された株はできるだけ迅速に受入検査, 登録, 保存を行い, 寄託の証明書を発行できる状態にする必要がある。好気性細菌は嫌気性や極限環境の微生物と比べ, 数多くの研究者に研究対象とされることから, JCM の中でも寄託が最も多い細菌群であり, 筆者の菌株担当業務も新規寄託の対応が中心となった。

現在筆者が担当するのは主に *Alphaproteobacteria* 綱, *Flavobacteriia* 綱, *Bacillales* 目に属する好気性細菌約 3,970 株である。当初年間の収集数は 5-60 株ほどであったが, 近隣のアジア地域からの寄託が年々増加し 2012 年以降は 200 株を超える年も出てきたが。こ

E-mail: yumi@riken.jp

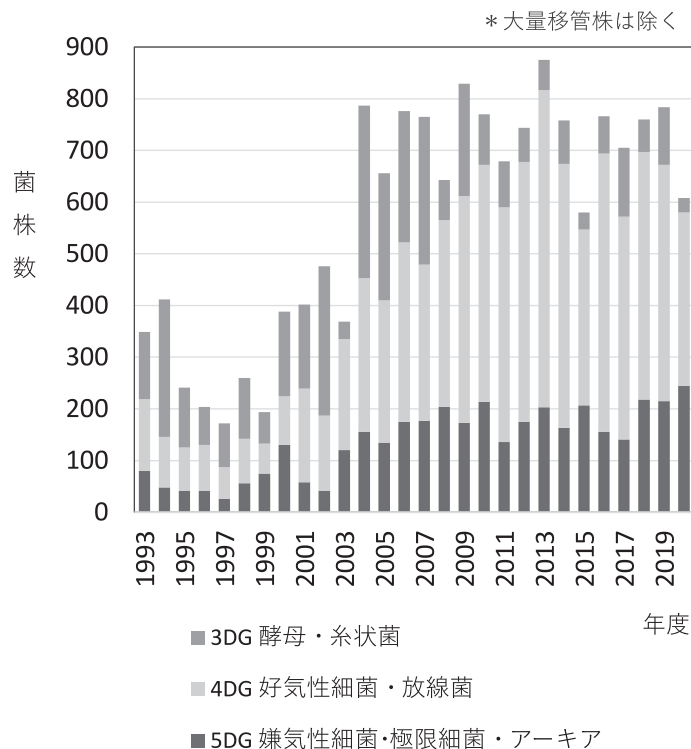


図1 JCMにおける登録菌株数の年度ごとの推移

ここ数年は100-150株ほどに落ち着いている。新たに寄託される菌株数は分類群ごとに均等ではないため、年度によって特定の菌株担当者の受け入れ菌株数が多くなってしまいう場合もあり、これまでに何度か好気性細菌の菌株担当者間で分担の変更も行いながら対応してきた。ハンドリングのあまり難しくない菌株が中心ではあるが、一つの分類群に対し複数人が対応できる状況は、組織を持続的に運営していくという点においても有用なことと思われる。

寄託菌株の受入検査

寄託者から送付された菌株はまず受入検査として、生育状況、コロニーや細胞の形態、汚染の有無、遺伝子検査(細菌の場合、寄託者から受領した菌株の16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、寄託者自身が決定した配列(以下、参照配列)と比較する)によって真正な菌株であることを確認するとともに、生育培地や温度が適切か等の検討も行う。過去5年度(2016-2020年度)においては、筆者が担当した660株のうち87株(13.2%)に何らかの問題があり、その内訳は、不生育・生育不良36株、コンタミネーション15株、菌株が異なる、JCMで解析した16S rRNA 遺伝子塩基配

列が参照配列と一致しないものが32株、参照配列が送付されず検査が未完了のものが4株であった。なお、2014年にJCMの寄託受け入れ体制について改善を行い(押田, 2015)、寄託受け入れ窓口担当者が寄託申し込み時に参照配列を受領するよう進めてきたため、この3年では参照配列未受領はなく、改善の効果が出ていると思われる。問題のあった菌株は、寄託者に菌株の再送付や配列データの見直しなどを依頼するなど寄託者と協力しながら、87株のうち48株について改善することができた。

保存標品の作製・検査

受入検査で性状等に問題がなく受け入れ可と判断された菌株は、続いて保存標品の作製を行う。JCMでは基本的に、シードとして使用する凍結保存とユーザーへの提供用として凍結乾燥(もしくはL-乾燥)保存の2種類の方法で保存標品を作製している。凍結標品の場合、凍結チューブ10本を1つの作製単位、ロットとして扱う。10本作製したうちの1本を抜き取り、生残性やコンタミネーションの有無の確認、遺伝子検査にて菌株の取り違い等がないことを確認する。残りの9本のうち1本は危険分散として理研の播磨事業所

で保管し、2本は液体窒素タンク、6本を-80度のディープフリーザーで保存する。ディープフリーザー保存の6本を、提供用の標品を作製する際のシードとして使用する。提供用の乾燥標品は1ロット15本単位で作製し、そのうち1本を抜き取り、加速試験（細菌の場合は37℃で14日間保持）を実施後、アンプルを開封し凍結標品と同様の検査を行う。検査で問題ないと判断された場合は、残り14本のうち2本は永久保存としてJCMで保管し、残りの12本がユーザーへ提供される。在庫が残り5本となった時点で補充が必要な状態として、在庫管理システムから次ロット作製の指示が出され、保存管理担当者がJCM番号の印刷された容器を準備し、菌株担当者がシードの凍結標品から培養して次ロットの提供用標品を作製する流れになっている。

受入検査時の培養や遺伝子検査では問題が検出されなかった場合でも、凍結や凍結乾燥の過程を経ることでコンタミネーションが顕在化する場合がある。また保存標品作製の作業の段階でコンタミネーションや取り違いが発生する可能性もゼロではないため、作製したロットごとの検査も毎回慎重に行う必要がある。好気性細菌は培養は比較的簡単なものが多いが、同時に環境由来の微生物の混入も発生しやすいため、コンタミネーションの確認には気を使う必要があると考えている。異なる生育条件でも培養を行うことが有効な場合もある。たとえば海洋由来の菌株ではマリンアガー2216培地などNaClが加えられた培地を使用するが、その培地では生育しないような菌株が混在していて、NaClを含まない培地で培養すると混入している菌が生育し、コンタミネーションが判明するといった状況である。海洋由来菌株以外でも、酸性やアルカリ性の培地で生育する菌株を普通寒天培地などで培養したり、低温や高温で生育する菌株の場合は室温程度の温度帯でも培養するなど、菌株の培養特性に応じて工夫しながら検出に努めている。保存標品のロットごとの作製・検査の記録は、保存検査システムに入力、保持されている。保持されたデータから、年度ごとや特定の期間の合格・不合格などの値を抽出、集計してスタッフミーティング等で共有し、不合格となった標品の原因の検討なども行っている。

保有菌株の遺伝子検査

数多くの、そして幅広い菌群の新種提案予定の菌株を受け入れる菌株担当者にとって、コロニーや細胞の形態、培養性状から得られる情報のみを頼りに寄託さ

れた菌株が真正なものであるかを判断することは困難であり、遺伝子検査は現在の品質管理には欠かせないものとなっている。JCMでは2005年頃から一部の菌株に対して遺伝子検査を取り入れ始め、2011年からは新たに寄託される原則すべての株に対して導入を開始した。しかし、導入以前に寄託された菌株には検査未実施のものが多く残っており、菌株を提供したユーザーからの問い合わせによって取り違えが判明した事例もあった。保有菌株の品質・信頼性の向上を目指し、過去に保存された菌株についても遡って検査を行ってきた。保存済みの乾燥標品を開封して培養を行うため、遺伝子検査だけでなく古くに保存された標品に対して生残数の確認等も併せて行っている。2014年末からは各菌株のオンラインカタログ上で、その菌株に対し遺伝子検査が実施済みであることを示している。その準備としてJCMデータベースに検査済みのフラグを立てるためのデータの洗い出し作業、入力を行った。その後に検査が終了した菌株についても逐次データの更新を行っている。なお2015年からは、まだ検査済みのフラグが立っていない菌株に対してユーザーから提供依頼があった場合に、JCMデータベースから菌株担当者へ検査を依頼するメールが送られ、検査をしてから提供する体制を開始し、誤った菌株を提供してしまうことのないよう努めている。筆者の担当菌株については、ここ数年は基準株を重点的に遡って検査を行い、2021年8月現在で、公開株2452株のうち未検査の菌株数は450株（18.4%）、基準株に限っては1393株のうち24株（1.7%）まで減らすことができている。

培地輸送の際の航空危険物の判定

微生物を定められた法令やルールに従って適切に取り扱うことも培養や保存の技術と同じように重要なことである。JCMでは、菌株を培養株（生菌）で提供する際に、培地成分について国内法令（労働安全衛生法、毒物および劇物取締法、化学物質排出把握管理促進法）に基づいて取り扱う必要があるか、また航空輸送する際の危険物に該当するかの判定を行っている。筆者は2016年よりIATA航空危険物に関連する業務も分担している。これまで航空危険物に該当するものはバイオセーフティレベル2に該当する菌株、凍結標品を送送する際の冷却材としてのドライアイスが主なものであったが、2014年の安衛法の改正（2016年施行）を受け、2017年の内部監査は法令に基づいた対応が取られているかを重点項目に設定して実施され、その

際に培地成分が航空危険物に該当するかの判定も行うべきとの指摘があったことから、提供事務担当者とは協力して判定を進めてきた。培養株での提供依頼案件ごとに、実際に培養に使用する培地を菌株担当者に確認し、その組成に航空危険物に該当するものがないかを航空危険物規則書に基づき判定し、航空輸送可能な場合は提供依頼を確定して菌株担当が培養を開始するという流れで行っている。判定結果は電子ファイルのリストに記録し、情報を蓄積している。過去に判定済みの培地を発送する際は、リストに記録された判定結果を確認し、危険物と判定されていた場合は規則書に従って必要な梱包等を行う。現在までに333種類の培地の判定が終わっている。JCMに登録されている培地は1300番を超えており、先は遠いが、開始した当初に比べると最近では判定の件数がかなり減った印象があり、よく提供に使用される培地は判定が済んできていると思われる。培養株で発送する菌株の培地に最も頻繁に使用されている物質は硫化ナトリウムで、嫌気性菌を培養する際に還元剤として培地に添加する試薬である。以前はこれを含む培地を腐食性物質と判定していたので、規則書に指定された梱包をして発送したり、菌株担当者が還元剤を別の試薬に変えて試したりと何かと手間が掛かっており何らかの対策が望まれていた。そこでこの物質を含む培地を外部検査機関に試験を依頼することになった。試験方法はOECDテストガイドライン431、*In vitro*皮膚腐食性：ヒト皮膚モデル（再生ヒト表皮：RhE）試験に示されたもので、この試験で腐食性なしと決定された物質は、皮膚腐食性がないとみなしてよいということが規則書に書かれている。サンプルには硫化ナトリウム0.5 g/lを含む嫌気性菌用の培地を使用した。検査の結果、この培地は皮膚腐食性なしとの試験結果が出たので、以降はこの結果を基に他の培地でも同濃度以下のものは腐食性なしと判断している。以前に腐食性物質と判定済みの培地も、再度提供依頼が来た際に非該当と判定できるか見直しを行っている。なお、この試験は結果が出るまでに時間が掛かるため、スケジュールに余裕があるときにやるのが良いというのが反省点である。海外製の人口皮膚キットを使用するため、輸入のスケジュールが決まっており、いつでも試験を始められるわけではない。またキット自体が生ものなので製造されてすぐに発送されるため、キットの品質検査の結果が出るのが日本に到着から2週間ほど後になるが、すでに腐食性試験は開始されている。万が一キットの不良が判明した場合は試験を中止し、キットを再輸入して改め

て試験を行わなければならない。このようなことも実際にやってみなければ知りえなかったことなので、良い経験になったと感じている。

これまでの成果と今後の課題

これまでの20年間において、国内はもとより、韓国、中国をはじめとするアジア地域9カ国、中東3カ国、欧州12カ国、北米2カ国、大洋州1カ国の計27カ国から、2,179株の寄託を受け入れリソース化することができた（大量移管株は除く）。現在公開中の担当菌株の種類は522属1452種に達している。全体の約80%を国内を除いたアジア地域からの寄託が占めており、当地域における種の多様性の生息域外保全や細菌分類学の発展にも役に立っていただければうれしいことである。

利用者の研究成果については、2016年から2020年の5年間においては、筆者の整備した菌株を用いて寄託者が発表した新種提案の論文は262報、基準株として266株が発表され、また提供した担当菌株を用いて利用者が発表した論文数421報、のべ利用菌株数607株の成果として発表された。寄託者や利用者の研究をリソース整備という形で支援し、また論文の信頼性の確保にも多少なりとも貢献できたのではないかと考えている。

今後の担当菌株の品質向上への取り組みとしては、遺伝子検査について先が見えてきたのでオンラインカタログへの菌株画像の公開を進めていきたいと考えている。また筆者は昨年末より植物防疫法上の輸入禁止品の管理担当となっている。昨今のコロナ禍における輸送状況の変化は、輸入禁止品の輸入にも少なからず影響を及ぼしており日々悩まされているが、これから経験を重ね改善につなげていければと思う。リソース整備事業をスムーズに行うためには、菌株担当と事務担当の連携が大切だということを改めて感じている。菌株担当業務に加え、ISO事務局や航空危険物の判定、植物防疫法の手続きなどの業務も担当することで、視野を広げることができてきている。このような経験も活かしながらJCMのリソース整備事業がよりスムーズに進められるよう微力ながら努めていければと考えている。

謝辞

今回このような賞をいただきましたこと、畏れ多くも大変ありがたく感じております。JCMで勤務を開始してから現在まで22年の間に指導、協力、励ましな

ど様々な形でお世話になりました全ての皆様に心よりお礼申し上げます。特に系統保存業務の右も左も分からない状態の私に実務を一からご指導くださった鈴木健一郎博士，好気性細菌を担当する4DGで直接ご指導，サポートいただいていた歴代DG長の小迫芳正博士，工藤卓二博士そして現DG長の飯野隆夫博士に深

く感謝申し上げます。

文 献

押田祐美 2015. JCMにおける寄託受入れの現状と受入れ体制の整備. 日本微生物資源学会誌 **31**: 147-150.