

## 【第49回 小島三郎記念文化賞】

## 病原細菌の分類手法の開発とそれを使った社会基盤の確立

New genome based pathogenic bacterial classification at species level and establishment of social infrastructure of education &amp; infectious disease

え ざき たか ゆき  
江 崎 孝 行  
Takayuki EZAKII. DNA/DNA ハイブリッド法による  
細菌の菌種を計測した時代

1971年、大学入学後、柔道部の先輩の仕事を見学し医学部微生物講座に足を踏み込んだ。そこでは第7回的小島三郎記念文化賞をいただいた鈴木祥一郎—上野一恵両先生が無芽胞嫌気性菌の研究に没頭されていた活気ある研究室だった。学生時代はそこで微生物同定の仕事をもらって、当時微生物同定のバイブル的存在であった *Bergey's manual* を片手に、*manual* と菌の性状を比べる学生生活を送った。卒業後、同講座の大学院に入り嫌気性球菌の分類の仕事に携わり、*Bergey's manual* の記載に一致しない細菌が沢山いることに気がついた。未熟な私はそれらが新しい細菌種であることは微塵も疑わず、首をひねる時が続いた。大学院の3年目で、嫌気性菌の研究をリードしていた米国バージニアテックの *The Anaerobic Laboratory* に留学の機会を得て、大腸癌と腸内フローラの関連を研究していた *Tracy Wilkins* 教授の研究室に入り、糞便の発がん物質とエイムズテストによる発がん性のアッセイに明け暮れる日を送った。一年後、鈴木祥一郎先生から手紙をいただき、研究費が取れたので、嫌気性球菌の分類の研究をやるか、それとも米国に残って発がんの仕事に継続するかとの連絡をいただき、帰国することを選択した。帰国前にバージニアテックの隣の実験室に、*Bergey's manual* に菌種の決定法としてDNA/DNAハイブリッド法を記載していた *J.J. Johnson* 博士<sup>1)</sup> がおられたので、急遽技術を習ってから帰国した。

当時のDNA/DNAハイブリッド法<sup>2)</sup>はアイソトー

プやハイドロキシアパタイトを使う方法であったので、日本では使用しにくく、思うように実験ができなかった。そこでbiotin標識DNA法を作成して、市販のマイクロプレートで細菌のDNA相同性を測定する方法を開発し、仕事が飛躍的に進んだ<sup>3-5)</sup>。

自信作の論文を鈴木祥一郎先生に提出したら“初めてにしてはよく書けた、でもこの論文を読んでわかるのは君だけだよ”とのコメントをいただいた。文章と論理の進め方が下手だと指摘されたのに気がつかないまま、数カ月後、鈴木先生は引退され、新しく着任された藪内英子先生に同じ論文を英語にして、提出した。論文は30分で突き返され、“あなたに失望しました。この論文には全く主張がない、私は血のにじむような思いで自分が出したデータを最大限活用して主張するのに、あなたの論文は人にデータをあげるだけで何の主張もない”とのコメントをいただき愕然とした。言われることがもっともで反論できなかった。

この経験から論文の書き方が大きく変わった。藪内先生の細菌分類に対する考え方を叩き込まれ、藪内先生の *Pseudomonas mallei*、*Pseudomonas pseudomallei* を新しく *Burkholderia* 属を作る研究に協力して *Pseudomonas cepacia* を *Burkholderia* 属の基準種として指定し、分類学的に新属 *Burkholderia* 属を記載した<sup>6,7)</sup>。この時役に立ったのはbiotin標識DNAを使ったマイクロプレート・ハイブリダイゼーション法で、菌種の定義に関する考え方と、菌種を決定する方法に自信をもって取り組むことができるようになった。

## II. 16S rRNA 配列で菌種を決めた時代

1990年代になるとリボソーム RNA のデータが蓄積され、1980年代半ばに Woese<sup>8)</sup> が地球上の生物を three kingdoms に分類すると提案した方法が研究者に受け入れられてきた。分類学者の視点も簡単に配列が決定できる 16S rRNA の配列を利用して菌種を決める方向に動いていった。膨大なリボソーム RNA データが蓄積し、16S rRNA の配列が 98.5% 以上類似する株の集団を菌種とする概念が出来上がった<sup>9,10)</sup>。この定義は環境微生物者の研究を爆発的に広げ、この基準で地球環境、あるいは特殊極限環境に生息する新菌種が次々と記載され、データが発表されるようになった。2010 年を過ぎてもこの考え方は優性で、環境中の微生物集団を次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法が盛んに行われているが、微生物データの解析には 16S rRNA 配列が使われている<sup>11)</sup>。

ところが、環境から分離される菌株の配列を見てみると、医学細菌学の分野で 100 年以上の歴史の中で受け入れられてきた病原菌種の配列と、ほぼ 99% 以上一致する配列が沢山見つかるようになった。

医学細菌学でも病原性菌種の中には病原因子を欠損している株が存在することが知られていた。しかし、これらの株は病原性菌種と 100% リボソーム RNA 配列が一致しており、病原因子欠損株として考えられてきた。これに対し環境から分離され、99% 以上リボソーム配列が病原性菌種と一致する株は 98.5% 以上リボソーム RNA 配列が一致するので、16S rRNA の配列から見ると、病原性菌種と同じに見えるが、分類学者は病原菌に近い類縁菌と考えてきた<sup>12~15)</sup>。しかし 16S rRNA で分類する限り、病原因子欠損株と類縁菌種を明確に識別する決め手はなかった。類縁菌種の全 DNA を使った DNA/DNA 交雑試験で、識別できるケースもあるが、多くのケースでは DNA/DNA 交雑試験のデータでは 70% 近傍で決定的な決め手にはならなかった。

## III. House keeping Gene の遺伝子配列からみた菌種

細菌の 16S rRNA 配列はその配列の中に全細菌に

共通な保存配列が存在するため、保存配列をプライマーにして、容易に全配列が決定できる。しかし 16S rRNA 以外の遺伝子に系統分類の解決方法を模索しようと分類学が目を向けても遺伝子情報が少なく、膨大な時間を費やしても仕事の進展は歯がゆいものであった。

16S rRNA 配列より遺伝子配列の多型情報が大きい遺伝子としていくつかの候補があった。House Keeping Genes (HKG) と呼ばれる DNA Gyrase、RopB、Heat shock タンパク遺伝子等は 16S rRNA より配列の多型があり、ほぼすべての細菌に共通して存在する。しかし、これらの遺伝子の配列の決定がなかなかできなかった。多型配列が大きいこれらの遺伝子には、シーケンシング用の共通なプライマーをデザインすることができなかったからである。我々は 16S rDNA より 10 倍遺伝子多型が大きい *dnaJ* 遺伝子に着目し、この遺伝子情報を 1995 年から 10 年以上蓄積してきた<sup>17~19)</sup>。しかし、配列が決定できる系統は少なく、約 10 年間で一万株程度の配列を決定したにすぎなかった。

このような背景の中で DNA のシーケンシング技術は目覚ましい進歩がみられた。1990 年代に *Haemophilus influenzae* の全ゲノム配列が決定された時は数億円以上の経費が一株のシーケンシングに費やされた。これに対して 2013 年の今日では効率よく実験を行えば一株 1 万円で全ゲノム配列が決定できる時代になった。核酸を抽出し、断片化した DNA の末端に共通の既知の Tag 配列をつけることで、この Tag 配列を使って配列を効率よく決定するため、未知の遺伝子でも簡単に配列が決定できる。よりコストの少ない新しいシーケンシング法も続々と出現している。今や全ゲノム配列は一日で決定できる時代になったので、この配列の山から、どのように系統分類に必要な遺伝子配列を取出し、加工するかが分類学者にとっての重要な課題となってきた。

## IV. 全ゲノム配列からみた系統分類学

多くの病原細菌の全ゲノムが決定され、その数は日々蓄積されている。その中で菌種内の株の配列情報の蓄積も多くなった。大腸菌では数百株のゲノム情報が公開され、菌種内の株の遺伝子多型が明らかになっている。その結果、同じ大腸菌と呼ばれる株

の中でも、保有している遺伝子の種類に30%以上の違いがあることがわかってきた。大腸菌の病原性はこの30%の遺伝子に含まれる株特有の情報であり、すべての野生の大腸菌株が病原因子を保有しているわけではない。

このことから全ゲノムを使った系統樹は菌種の種類ではなく菌種内の株の多型、分子疫学には重要な情報を提供してくれることがわかってきた。しかしFamily内の系統や、その上の分類に利用するには違いが大きすぎて、全ゲノム情報をそのまま系統分類に使えないこともわかってきた(図1)。

ところが菌種内の株に保存されている House

2010年	全ゲノム情報からどの微生物も保有しているHouse keeping Geneを選択し、分類学に有効な遺伝子を比較し、菌種を決定する手法が台頭
2000年	全ゲノム情報を分類学に取り込む時代(同一菌種の菌株間で保有している遺伝子に30%もの違いがあることが判明。16Sで菌種を識別できないケースが多く見つかった)
1990年	16S rRNAによる系統分類が主流になった。(16S rRNA配列が98.5%以上の株の集団を同一種とみなす)
1980年	アイソトープを使わないDNA/DNA交雑法を開発し分類に応用 アイソトープを使って標識した染色体DNAを使ったDNA/DNA交雑法により、70%以上のハイブリッドを形成する株を同一種
1970年以前	生化学的、生理学的、血清学的、形態的特徴に比較で菌種を決定

図1 菌種を決定する方法の変遷

大腸菌の菌株間でHKGのアミノ酸配列を比較するとDNAの配列多形は同一菌種内では遺伝子の多型は0.75%と少なかった。

HKGのアミノ酸配列を独立した菌種間で比較すると配列多型の違いが少ないものから、多型が大きいものと遺伝子によって大きく異なった。

HKG配列が菌種を超えて保存されている遺伝子を上位分類の指標へ、類縁菌種間で多型が大きい遺伝子を菌種の識別用遺伝子として使い分ける。

	Distance (%)			
	400 proteins	C51RP	C15HKG	16S rRNA
<b>Intraspecies variation</b>				
<i>E. coli</i> (n=120)	0.75	/	/	1.16 (0.1-1.23)
<i>S. enterica</i> (n=80)	0.51	/	/	0.44 (0.1-1.22)
<i>Y. pestis</i> (n=65)	0.09	/	/	0.09 (0.0-1.13)
<b>Interspecies variation</b>				
<i>E. coli</i> - <i>E. fergusonii</i>	/	0.27	0.76	0.52 (0.39-1.03)
<i>E. coli</i> - <i>E. albertii</i>	/	0.31	1.22	0.95 (0.52-1.26)
<i>E. coli</i> - <i>E. hermani</i>	/	2.26	5.33	2.50 (2.01-2.59)
<i>E. coli</i> - <i>S. enterica</i>	/	1.77	3.20	2.78 (2.59-3.31)
<i>E. coli</i> - <i>C. rodenticum</i>	/	1.25	3.35	3.04 (2.79-3.31)
<i>E. coli</i> - <i>C. freundii</i>	/	1.89	3.96	3.62 (2.72-4.02)
<i>E. coli</i> - <i>E. vulneris</i>	/	2.07	5.48	3.73 (3.31-3.96)
<i>E. coli</i> - <i>S. blattae</i>	/	2.79	5.94	3.86 (3.50-4.02)
<i>E. coli</i> - <i>Y. pestis</i>	/	7.00	17.27	5.53 (5.31-5.83)

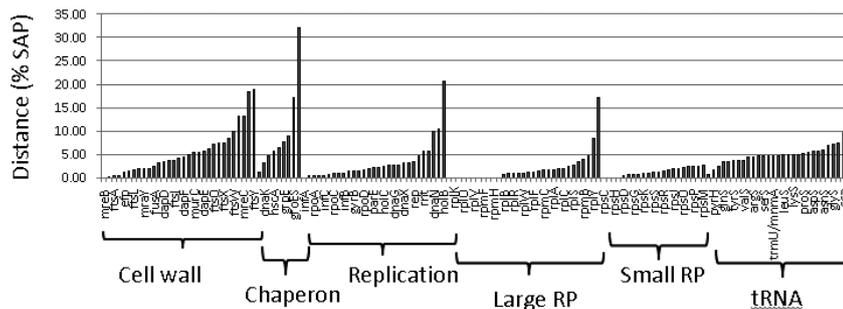


図2 House keeping gene (HKG) の多様性と保存性

Keeping Genes(HKG)の個々の遺伝子配列を見ると、一つの遺伝子配列は株の間では多型はほとんどない。平均した遺伝子の多型は同一菌種内では1%以内に収まっている(図2)。

菌種をこえて類縁種、あるいは同一属内の菌種と比較すると、明らかに菌種間で多型の大きさに境界がみられる。16S rRNAで99%以上類似して区別できなかった類縁種がHKGで比較することで識別できることがわかった(図3)。今後はこれら多型が多いHKGを全細菌にわたって蓄積していけば、16S rRNAで識別できない類縁種を共通に保有する遺伝子を使って区別できるので、医学細菌領域のように正確な菌種の同定が必要とされる分野での重要性は大きい。

この解析の中で逆にわかってきたことは、病原菌の類縁菌種と考えられてきた菌種が、実は同一種で、保有している遺伝子が異なる、いわゆる株の違いであったケースが多く見つかった。代表的なものは大腸菌と赤痢菌である。古くから両者は類縁菌種とされてきたがゲノム情報から解析すれば、両者は国際命名規約の優先権から大腸菌として統一されるべき菌群である<sup>12-16)</sup>。Shigella属の全菌種と全血清型のゲノム配列が決定され、血清学的にも大腸菌の

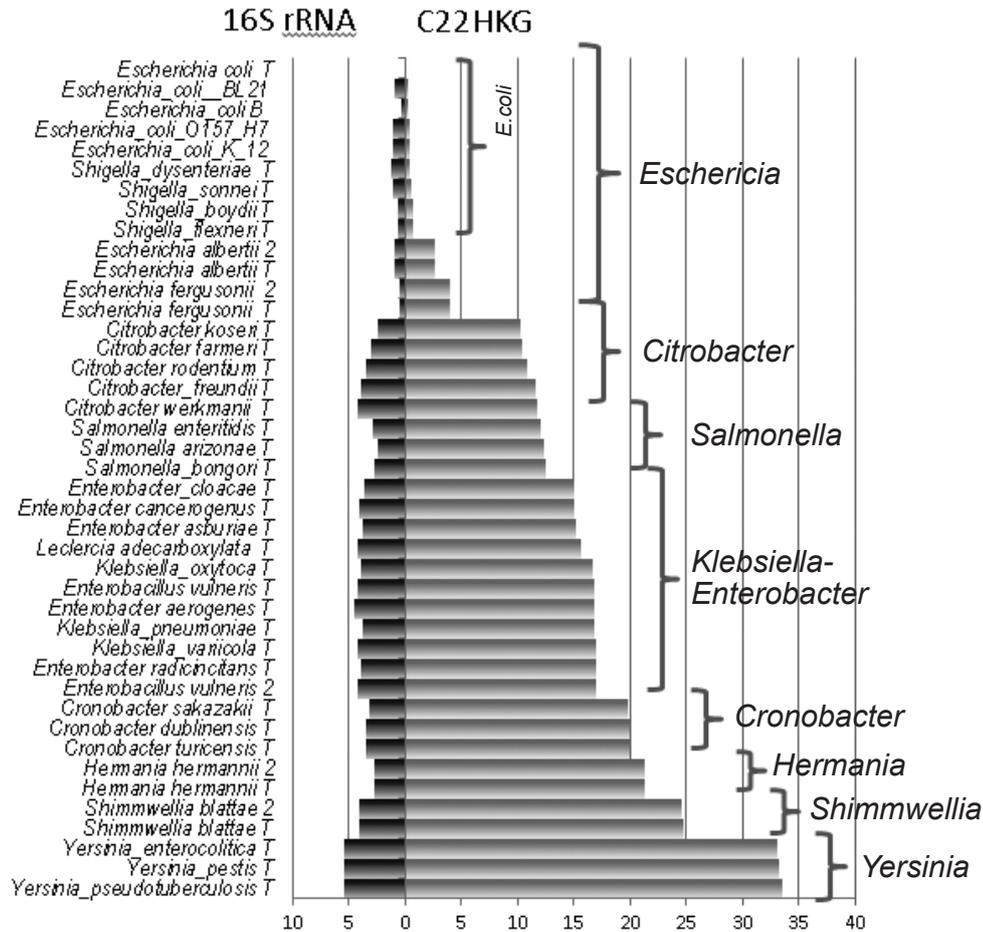


図3 *E. coli* から最も遠い *Yersinia* までの遺伝子の配列の違いを 16S rRNA と 22 個の HKG を結合して (C22HKG) 比較した。左の黒が 16S rRNA、右のグレーが HKG。16S rRNA では 5% の違いしかないが HKG では 34% の配列の違いがあった。一方、赤痢菌をはじめとする大腸菌群は 16S rRNA では明確に識別できなかったが HKG では、独立種である *E. albertii*, *E. fergusonii* を識別した。

O 抗原の遺伝子に *Shigella* の血清型を当てはめる研究が進行しており、多くの微生物学者を納得させる結論が出る日も近いと考えている。

*Brucella* 属の菌種も命名の混乱を招いてきた。1985 年に *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis* は同一菌種であるとの提案がなされ、*B. melitensis* となったが<sup>16)</sup>、この命名方法は獣医領域の病原微生物学者からは受け入れられなかった。2006 年に *Brucella* の命名委員会は非公式に *Brucella* 属のこれらの菌種は従来どおり独立した菌種として取り扱うとの議事録を分類の機関紙である IJSEM (International Journal of Systematic & Evolutional Microbiology) に掲載したが<sup>17)</sup>、この案は正式な提案でないで命名規約上は無効である。しかし獣医領域やわが国の感染症法では、この 2006 年の提案に沿って *Brucella* 属の従来菌種は独立菌種として記載され

ている。このように遺伝子で決着がついても、長年使用されてきた菌名の変更は微生物学者の間でも容易には受け入れられない。変革には社会的認知がなければ広がらない。100 年以上の歴史を持つ病原性菌種の命名には同様の多くの課題が残されている。

全ゲノム配列を利用した菌種の決定法に ANI (Average Nucleotide Index) が提唱された<sup>23)</sup>。これは全ゲノム配列を約 1000 塩基程度に論理上切断し、類縁種のゲノム配列も同じ考え方でデータ処理しデータセットを準備する。切断された論理上の各々の塩基を相手のすべての塩基配列と類似度を計算する。独立した菌種同士で計算すると明らかに異なる同一属の他の菌種間では 75 ~ 85% の ANI index 値が得られる。同一菌種内では ANI index は 95% 以上になることから、DNA/DNA ハイブリッド法で測定された菌種の境界が 70% 以上という数値は ANI

Index 法では 95% 以上になる。この方法は菌種の識別には利用価値が大きい、少し離れた菌種との比較をする場合、正確な情報の取得は難しい。いわゆる菌株の間に保有していない遺伝子が存在するため、DNA/DNA ハイブリッド法と同じく、少し離れた菌種と遠く離れた菌種との測定ができない。

全ゲノム配列の解析から決定された遺伝子配列の種類が多く蓄積されてきたことから、われわれは幅広い菌種が共通に保有する遺伝子に的を絞って解析している。分類に使用できる遺伝子はすべての細菌に共通な遺伝子でなければならない。数百種類の HKG の中で多型が大きい遺伝子、あるいは配列が保存された遺伝子を比較しながら、分類階級のどの段階に有効かを見極めなければならない。また細菌の菌種を定義するときその定義はすべての原核細胞に共通の概念として提供される必要がある。

しかし、多型が大きい遺伝子は系統が遠くなると共通の配列が見つけにくくなる。理論上 50% 以上の配列が異なる遺伝子と同じ遺伝子として判定することには躊躇する。

タンパクではアミノ酸配列を比較し、共通な配列

が部分的に残っていれば共通のドメインを保有する同じ機能を持つタンパクとして推測する。この考え方で整理すれば、時には 70% 以上もアミノ酸配列が異なるタンパクでも機能部分は同じであれば同一アミノ酸ファミリーとして区分される。

このことから、特定の HKG をすべての分類階級の解析に利用することはできない。われわれは多型の大きい遺伝子のアミノ酸配列を類縁の菌種間の識別遺伝子として利用し、配列が保存されている遺伝子のアミノ酸配列 (リボソームタンパク) を属や科の上位分類に利用する方向でデータの蓄積を行っている (表 1)<sup>24-26)</sup>。

## V. 系統分類情報の社会基盤への活用

ゲノム解析が容易になったことから、微生物のゲノム情報を積極的に利用する分野が急速に拡大している。その一つとして、汚染土壌の修復作業中に添加する化学物質や分解促進に利用される肥料で病原微生物が増加するとの懸念がある。環境微生物相の解析では土壌から抽出した DNA の全配列の中

表 1 多型が大きい HKG (類縁菌種の識別に有効)

Category	gene	Protein Full name	Amino acid	<i>Escherichia coli</i> (n=120)	<i>Salmonella enterica</i> (n=80)	<i>Yersinia pestis</i> (n=65)	Distance between <i>Salmonella-Escherichia</i>	Distance between <i>Yersinia-Escherichia</i>
chaperonin	<i>dnaJ</i>	chaperone protein DnaJ (Hsp40)	376	2.10	0.27	0.27	4.79	11.17
replication	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	804	0.07	0.05	0.00	3.48	13.15
replication	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	891	0.15	0.21	0.05	9.00	15.91
replication	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma-32 factor	284	0.09	0.09	0.00	3.52	16.02
chaperonin	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	97	0.00	0.00	0.00	17.14	18.57
chaperonin	<i>hscA</i>	chaperone protein HscA	616	0.81	0.97	2.60	5.68	20.46
cell wall	<i>ftsW</i>	cell division protein FtsW	414	0.00	0.24	0.00	9.90	21.50
cell wall	<i>mreD</i>	MreBCD transmembrane component MreD	163	1.84	1.23	0.00	4.94	24.69
cell wall	<i>pssA</i>	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	451	2.22	0.67	0.00	6.21	25.72
replication	<i>holA</i>	DNA polymerase III, delta subunit	343	0.68	0.76	0.12	10.5	28.49
tRNA	<i>cca</i>	tRNA nucleotidyltransferase	412	1.21	1.46	0.00	9.69	28.64
cell wall	<i>mreC</i>	Rod shape-determining protein MreC	370	2.16	1.62	0.00	13.08	29.08
chaperonin	<i>lolA</i>	chaperone for lipoproteins	203	0.00	0.28	0.00	6.40	29.56
cell wall	<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide : D-alanyl-D-alanine ligase	452	3.32	0.66	0.18	13.05	30.35
chaperonin	<i>hscB</i>	chaperone protein HscB	171	0.00	0.49	0.00	8.77	34.48
cell wall	<i>ftsQ</i>	cell division protein FtsQ	276	1.09	1.09	0.01	7.22	35.13
cell wall	<i>ftsX</i>	membrane component of ABC superfamily	352	1.14	0.57	0.00	7.39	35.69
cell wall	<i>murB</i>	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase, FAD-binding	342	3.22	1.46	0.24	18.42	39.13
chaperonin	<i>grpE</i>	chaperone protein GrpE	197	0.00	0.00	0.01	7.61	40.10
cell wall	<i>ftsY</i>	cell division protein FtsY	497	3.26	0.60	3.26	18.85	41.12
replication	<i>holB</i>	DNA polymerase III, delta subunit	334	0.50	0.57	0.40	20.66	49.12
chaperonin	<i>hslJ</i>	heat shock protein HslJ	140	0.00	1.11	0.00	32.14	56.29

から 16S rRNA 配列情報だけを抽出し、菌叢が解析されている。その中に本物の病原体が増加したかを 16S rRNA 配列だけをモニターしても実態はわからない。16S rRNA の配列情報では類縁菌と真の病原細菌を識別できないからである。16S rRNA 配列が 98.5% 以上ある類縁菌種が土壌には多く存在しており、それらの菌種は人や植物に病気を起こさない未分類の菌種であることが多い。

われわれは環境の微生物のモニターに際して 16S rRNA と HKG、および病原因子を組み合わせたスクリーニング手法を作成し、BSL2 以上の病原体のモニター方法を作成し、安全に事業を推進するための方法を提案してきた<sup>28, 29)</sup>。

感染症法が施行され、特定病原体の 2 種から 3 種の病原体の保有が制限された。危険な病原体の保有制限は必要なことであるが、教育現場では、検査技師の教育機関や食品会社の検査室の担当者は一度も目に触れたことが無いボツリヌス菌や炭疽菌の検査をすることが要求されている。しかしボツリヌス菌、ブルセラ菌や、炭疽菌はわが国に輸入される食材に混入することから、実際の菌株を使った教育が必要になる(表 2)。しかし感染症法の施行後、特定病原体に指定された株の保有は一般の教育機関や食品工場での保有は難しい。そこで弱毒株を作成し、P1 レベルでも使用できる菌株の供給が必要になっ

ている。2 種から 4 種病原体で法律に記載された病原体の除外株を作成し、認知されるには国際的な評価を受けなければ、国には認めてもらえない。この活動には長い時間がかかるが、文部科学省の National Bio-resource Project (NBRP) 事業や細菌学会を経た社会的な認知活動が重要になってくる。

文部科学省の支援を得て、わが国の病原微生物を収集し、若手研究者や企業に分譲する NBRP 事業は平成 14 年から開始した。これまで岐阜大学で保有する GTC は大学のコレクションであったが、NBRP としてわが国レベルの病原体コレクションとしての顔を世界に発信する必要がある。GTC コレクションは JNBP (Japan National Collection of Bacterial Pathogen) として、国レベル保存活動に移行する準備を進めている。高度病原体に触れる機会のない若手に、安全を担保した菌株を供給し、利用してもらう社会基盤の整備は、食品の調達がグローバル化した日本にとって極めて重要である。

日本細菌学会では感染症法から除外された菌株をレベルダウンし、広く分譲する活動を行っているが、感染症法の特定病原体の対象になっていない BSL2 の病原細菌でも株をレベルダウンして BSL1 の環境でも取り扱えるようにしてほしいとの要望が多く寄せられている。特に食品検査を行う工場に病原体を標準株として導入することは好まれない。学会で公

表 2 安全性を高めた教育用弱毒株

JNBP 株	弱毒株 Attenuated strains	感染症法特定病原体	特 徴
JNBP_01002	<i>Bacillus anthracis</i> Davis 株	既に 2 種除外株	ワクチン株
JNBP_01003	<i>Bacillus anthracis</i> 34F2 株	既に 2 種除外株	ワクチン株
JNBP_01004	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 株	既に 2 種除外株	ワクチン株
JNBP_01005	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> B38 株	既に 2 種除外株	ワクチン株
JNBP_01006	<i>Clostridium botulinum</i> C nontoxic 92-13 株	弱毒株(2種)	btntC Toxin C gene 欠損
Not available	<i>Yersinia pestis</i> LcrV 株	弱毒株(2種)	Vaccine strain
Not available	<i>Clostridium botulinum</i> Toxin negative 株	弱毒株(2種)	Botulinum toxin A,B,C,G, F 欠損
Not available	<i>Brucella melitensis</i> serovar Abortus RB51 株	弱毒株(3種)	ワクチン株
Not available	<i>Brucella melitensis</i> serovar Melitensis Rev-1 株	弱毒株(3種)	ワクチン株
JNBP_01011	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Ty21a 株	弱毒株(4種), 申請中	ワクチン株
JNBP_01012	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis Inv A 欠損株	弱毒株(対象外)	Invasion 欠損
JNBP_01013	<i>Vibrio cholerae</i> O1, CT 欠損株	弱毒株(4種)	CT gene 欠損 wild strain
JNBP_01014	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> TDH/TRH 欠損株	弱毒株(対象外)	TDH/TRH 欠損 wild strain
JNBP_01015	<i>Shigella flexneri</i> 2a IpaH 欠損株	弱毒株(4種)	Invasion 欠損 (iPaH)
JNBP_01016	<i>Shigella sonnei</i> IpaH 欠損株	弱毒株(4種)	Invasion 欠損 (iPaH)
JNBP_01017	<i>Shigella boydii</i> IpaH 欠損株	弱毒株(4種)	IpaH, Shiga toxin 欠損
JNBP_01018	<i>Shigella dysenteriae</i> IpaH 欠損株	弱毒株(4種)	IpaH, Shiga toxin 欠損
JNBP_01019	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Toxin 欠損株	弱毒株(対象外)	Diphtheria toxin 欠損
JNBP_01020	<i>Bordetella pertussis</i> Pertactin 欠損株	弱毒株(対象外)	Pertactin 欠損
JNBP_01021	<i>Clostridium tentani</i> Toxin 欠損株	弱毒株(対象外)	Tetanospasmin 欠損

JNBP : Japan National Collection of Bacterial Pathogens

式にレベルダウンした株を作成し、安全を担保した株を教育現場や、民間の食品検査業務を実施している場所に供給する事業も重要な社会貢献だと考えているが、この活動には長い時間がかかる<sup>30, 31)</sup>。

安全を担保した新鮮な食材を国民に届けるため、加工食品の現状の検査方法は時間がかかりすぎるため、これを見直し、網羅的にかつ迅速に実施する検査システムの構築にも取り組んでいる。食品調達がグローバル化した日本にとっては重要な課題である。加工食品を市場に出荷する前に微生物検査を終了し、安全を担保した食材を消費者に届ける社会基盤を構築することは細菌学者の重要な社会的義務と認識している<sup>32, 33)</sup>。

## VI. 今後の感染症医療への展望

欧米では感染症の診断は時間がかかる培養法から遺伝子検査によるスクリーニング法に向かっている。遺伝子検査の最大の利点は迅速性にある。遺伝子検査機器の改良が進み、遺伝子検査試薬も10～20分で標的遺伝子を百万倍に増幅できるようになってきた。そこに増幅した核酸を識別する新しい核酸クロマト法を併用し、目視で増幅産物を識別する方法にも力を注いでいる(図4)。これを使って開業医レベルで遺伝子検査ができるような環境を構築できる。患者症状から可能性の高い細菌検査を発注し、数日後に答えを受け取り、検査結果を再診療時に患者に伝える現状の医療体制は時代遅れだと感じている。

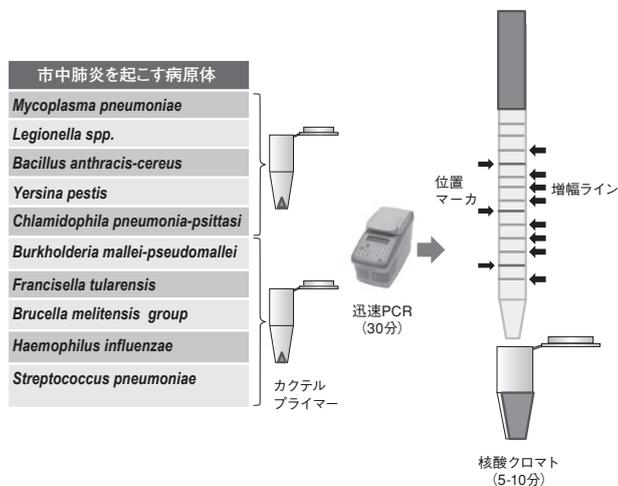


図4 市中肺炎・バイオテロのスクリーニングカクテルと核酸クロマト  
(全部を対象とした場合核酸クロマトは2枚必要)

生化学検査のように多種類の可能性のある病原体を一気にスクリーニングし、臨床材料ごとの多項目の病原体検査を迅速に決定する医療体制の構築が必要と考えている。その最終的な姿は次のように考えている。病院受付でうがい液を渡し、患者が診察を待っている間に可能性のある病原体を網羅的にスクリーニングし、診察室に入った時点ではすでに医師の手には病原体が特定されていて、適切な抗菌剤を選択できる(図5)。

現在、多項目検査は原則としてわが国の医療現場では認められていない。肺炎、下痢、STD、髄膜炎と臨床材料ごとに多項目スクリーニングにかけ、病原体を迅速に特定することは患者側からも行政からも医療費を削減できる重要な手段である。欧米ではすでに遺伝子検査を多項目でスクリーニングする方法が承認され実用化されている。最新の分類学の知見を効率よく遺伝子検査のスクリーニングに活用し、初診外来、あるいは在宅患者の診断に利用する検査体制は人への伝播が懸念される感染症医療にとって特に重要な課題である<sup>34～38)</sup>。引退まで2年間は最後のエネルギーを絞り出して、この仕事に励む覚悟でいる。

## おわりに

伝統ある小島三郎記念文化賞をいただき、身の引き締まる思いで後輩と学生の指導にあたっています。無芽胞嫌気性菌の研究で第7回目の小島三郎記

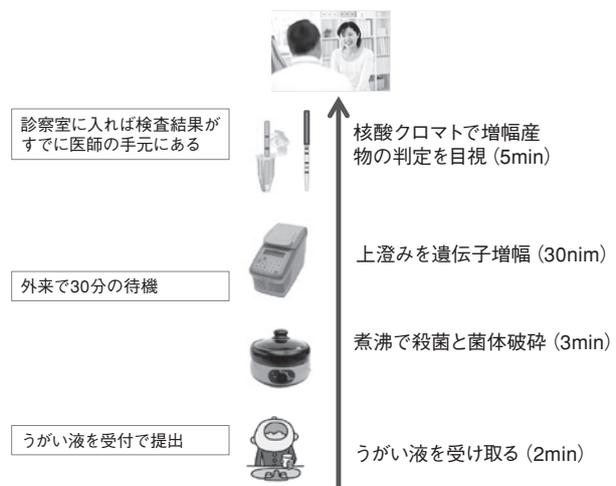


図5 初診外来で感染症診断する医療体制

念文化賞をいただいた恩師鈴木祥一郎先生・上野一恵先生、私の分類学に対する気持ちに火をつけていただいた藪内英子先生、アフリカで感染症医療の機会を与えていただいた小澤敦先生、その他、刺激と意欲を与えてくださった多くの同胞に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Johnson, J.L. Nucleic acid in Bacterial Classification *In* Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol1. Krieg, N.R, and Holt, J.G. (Ed) . pp5-8, 1984. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
- 2) De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A, The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem.* **12** : 133-142, 1970.
- 3) Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi.. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 224-229, 1987.
- 4) Ezaki T, Hashimoto Y, Yamamoto H, Lucida ML, Liu SL, Kusunoki S, Asano K, Yabuuchi E, Evaluation of the microplate hybridization method for rapid identification of *Legionella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **9** : 213-217, 1990.
- 5) Ezaki, T., Y. Hashimoto, N. Takeuchi, H. Yamamoto, S.L. Liu, H. Miura, K. Matsui and E.Yabuuchi. Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* **26** : 1708-1713, 1988.
- 6) Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **36** : 1251-1275, 1992.
- 7) Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1993. Validation List. No.45. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43** : 398-399, 1993.
- 8) Woese CR, Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, **51** : 221-271, 1987.
- 9) Stackebrandt E, Goebel BM, Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.*, **44** : 846-849, 1994.
- 10) Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* **57** : 81-91, 2007.
- 11) 江崎孝行. 三原一優. 石油汚染対策におけるバイオレメデーエーションの生態系影響評価法. 産業と環境 4巻 : 87-89, 2006.
- 12) Ruiting Lan and Peter R. Reeves. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics *TRENDS in Microbiology* **9** : 419-424, 2001.
- 13) Lan R, Reeves PR, *Escherichia coli* in disguise : molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect.*, **4** : 1125-1132, 2002.
- 14) Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR, Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun.*, **72** : 5080-5088, 2004.
- 15) Jian Yang, Huan Nie, Lihong Chen, Xiaobing Zhang, Fan Yang, Xingye Xu, Yafang Zhu, Jun Yu, Qi Jin, Revisiting the Molecular Evolutionary History of *Shigella* spp. *J Mol Evol.*, **64** : 71-79, 2007.
- 16) Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D and Grayon, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35** : 292-295, 1985
- 17) Osterman, B., and Moriyon, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56** : 1173-1175, 2006.
- 18) Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah MM, Goto K, Ezaki T, Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57** : 1232-1237, 2007.
- 19) Yamada-Noda M, Ohkusu K, Hata H, Shah MM, Nhung PH, Sun XS, Hayashi M, Ezaki T, *Mycobacterium* species identification—a new approach via *dnaJ* gene sequencing. *Syst Appl Microbiol.* **30** : 53-62, 2007.
- 20) Nhung PH, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Shah MM, Sun X, Hayashi M, Ezaki T. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **58** : 153-161, 2007.
- 21) Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, Noda M, Hata H, Sun XS, Iihara H, Goto K, Masaki T, Miyasaka J, Ezaki T, The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Syst. Appl. Microbiol.*, **30** : 309-315, 2007.
- 22) Toidi Adékambi, Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58** : 1807-1814, 2008.
- 23) Osterman, B., and Moriyon, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56** : 1173-1175, 2006.

- 24) Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM, DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57** : 81-91, 2007.
- 25) Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **52** : 1043-1047, 2002.
- 26) Adékambi T, Drancourt M.. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** : 2095-2105, 2004.
- 27) Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S., Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on gyrB sequences : comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** : 87-95, 1999.
- 28) 江崎孝行, 微生物の開放系利用に係る評価手法マニュアル. 団法人バイオインダストリー協会, 2000.
- 29) 江崎孝行, Real time PCRと系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法, 団法人バイオインダストリー協会, 2003.
- 30) Takayuki Ezaki, Masahiro Hayashi, Jiwei Zhang, Takuya Mizuno, Tatsuya, Natori, and Kiyofumi Ohkusu. Role of Culture Collections in Disasters. *Disaster Research.* **7** : 768-774, 2012.
- 31) Zhao, L., Kawamura, Y. and Ezaki, T. Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational purposes. *Microbiol. Cult. Coll.* **17** : 13-21, 2001.
- 32) 江崎孝行, 食中毒細菌の検出・同定システムの新展開—カクテル増幅法を使った食品中の生きた菌の網羅的な遺伝子検査法—日本食品微生物学会雑誌): 150-151, 2009.
- 33) Hayashi M, Kubota-Hayashi S, Natori T, Mizuno T, Miyata M, Yoshida S, Zhang J, Kawamoto K, Ohkusu K, Makino S, Ezaki T. Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* **163** (1): 41-461, 2013.
- 34) 江崎孝行, 大楠清文. 外来で利用可能なSTDの網羅的遺伝子診断法を求めて. *泌尿器外科* **18** : 798-804, 2005.
- 35) 大楠清文, 江崎孝行, 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応. *日本化学療法学雑誌* 59巻 : 441-453, 2011.
- 36) 江崎孝行, Yuing Li, 大楠清文, 河村好章, 呼吸器感染症の網羅的診断に向けて, *分子呼吸器病* **8** : 341-344, 2004.
- 37) 江崎孝行, 腔プロバイオテイクス・アンチバイオテイクス—検査から始まる細菌の新しいコントロール法—鴨井久一編著, 永末書店, 2013.
- 38) 江崎孝行, 発熱外来のバイオセーフティ, バイオセーフティ指針, 岡田淳(編), 医歯薬出版, pp99-150. 東京. 2010.