

第83回  
日本細菌学会北海道支部学術総会  
プログラム・抄録集



会期： 平成 28 年 9 月 17 日（土）

会場： 北海道大学大学院歯学研究科・歯学部講堂（2F）

〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

総会長： 柴田 健一郎

（北海道大学大学院歯学研究科 口腔分子微生物学教室・教授）

事務局： 〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

北海道大学大学院歯学研究科 口腔分子微生物学教室



## プログラム概要

8 : 25	～		開会の辞
8 : 30	～	8 : 56	セッション 1 (座長・長谷部)
8 : 56	～	9 : 01	休憩
9 : 01	～	9 : 40	セッション 2 (座長・大久保)
9 : 40	～	9 : 45	休憩
9 : 45	～	10 : 37	セッション 3 (座長・佐伯)
10 : 37	～	10 : 42	休憩
10 : 42	～	11 : 21	セッション 4 (座長・佐藤)
11 : 21	～	11 : 26	休憩
11 : 26	～	12 : 05	セッション 5 (座長・村田)
12 : 05	～	13 : 00	昼休み (評議員・幹事会)
13 : 00	～	13 : 30	総会
13 : 30	～	13 : 40	休憩
13 : 40	～	14 : 45	セッション 6 (座長・楠本)
14 : 45	～	14 : 50	休憩
14 : 50	～	15 : 55	セッション 7 (座長・白石)
15 : 55	～	16 : 00	休憩
16 : 00	～	17 : 15	特別講演
17 : 15	～	17 : 30	表彰式・閉会の辞
17 : 30	～		懇親会

## 目次

プログラム概要	1
目次	2
参加されるみなさまへのご案内	3
会場案内	4
プログラム	6
講演要旨	13
特別講演	14
一般演題	15
協賛一覧	41

## 参加されるみなさまへのご案内

### 1. 参加受付

受付時間： 9月17日（土） 8:00~  
受付場所： 北海道大学大学院歯学研究科2F・講堂入口前  
参加費： 無料  
懇親会費： 3,000円（参加希望者のみ）

ただし、支部会のみに入会されている方、また新たに支部会のみに入会される方は、当日支部会年会費1,000円を受付にて申し受けます。

### 2. 一般演題について

演者の先生へ

発表時間は、発表10分、質疑3分（演者交代時間を含む）です。発表時は、9分で予鈴、10分で本鈴となり、質疑応答終了時にもアラームが鳴ります。

講演の発表はノートパソコンによるプレゼンテーションとし、演者の方は、ご自身のノートパソコンをご持参いただき、発表をするようお願い致します。

ご自身のノートパソコンをご持参いただく事が無理な場合は、事務局にご連絡ください。

ご持参いただくノートパソコンはWindows、Machintoshのいずれでも結構ですが、会場の液晶プロジェクターとの接続はD-sub15ピンとなりますので、コネクタが必要な場合はご持参ください。また、電源アダプターもご持参いただき、発表中にスクリーンセーバーや省電力モードにならないように設定をお願い致します。万が一に備えてバックアップデータをお持ちくださるようお願い致します。

座長の先生へ

発表時間は、発表10分、質疑3分です。演者交代も含めて13分といたしますので、質疑応答終了の最終アラームは12分30秒で鳴ります。座長席から経過時間等を確認できるようにしていますので、時間厳守をお願い致します。

### 3. 日本細菌学会北海道支部会賞選考要領

本学術総会では、一般演題のうち、学生、ポスドク、助教を対象に最優秀発表者（1名）と優秀発表者（2名）の表彰を行います。選出対象となる発表については、各演題要旨の左上にそのように記載しておりますのでご確認ください。

選出は参加者全員の投票によって行われます。当日配布された投票用紙に必要事項を記入し、一般演題終了後、投票用紙を会場の投票箱に投函ください。

## 会場案内

学会会場： 北海道大学大学院歯学研究科・歯学部講堂（2F）

懇親会会場： 北海道大学大学院歯学研究科・リフレッシュラウンジ（1F）

評議員・幹事会： 口腔分子微生物学教室医局（5F）



北海道大学大学院歯学研究科

札幌市北区北13条西7丁目

地下鉄南北線北12条駅から徒歩5分



歯学部講堂

矢印にしたがって歯学研究科までお越しく  
ださい。

この玄関からしか入館はできません。

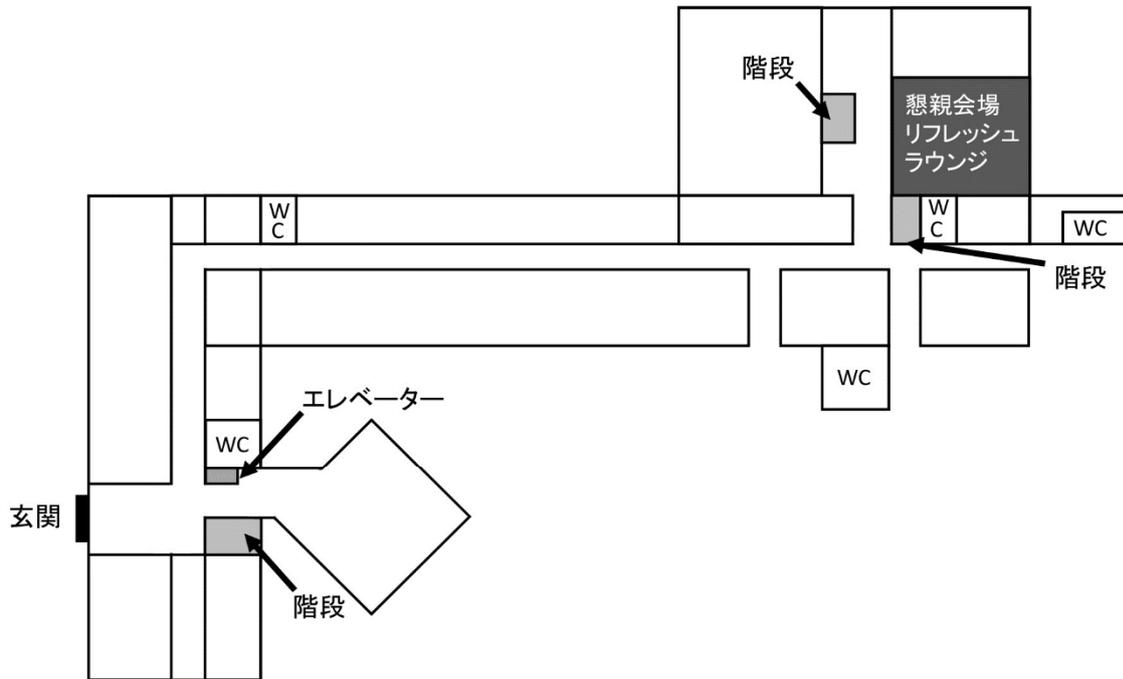
なお、セキュリティの関係上、休日の歯学部玄関は基本的に終日施錠されており、館内からのみ解錠可能です。

みなさまの円滑な入館のため、係のものを歯学部玄関に配置し、入館に対応する予定ですが、万が一何らかの理由により入館不可能となった場合は、長谷部か佐伯までメールを送ってください。すぐに対応させていただきます。

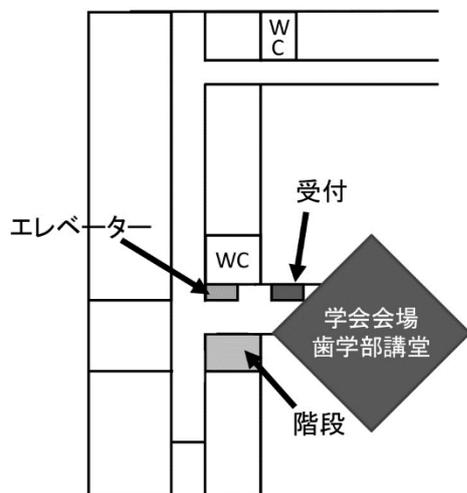
長谷部 晃： [akkun#den.hokudai.ac.jp](mailto:akkun#den.hokudai.ac.jp) (#→@に書き換えて送信して下さい)

佐伯 歩： [saeki23#den.hokudai.ac.jp](mailto:saeki23#den.hokudai.ac.jp) (#→@に書き換えて送信して下さい)

講堂へは、玄関ホール左手のエレベーター、もしくは右手の階段で2階に上がり、建物内の案内表示にしたがってお越してください。



歯学部1階



歯学部2階

## 第 83 回日本細菌学会北海道支部学術総会 プログラム

8 : 25 ～ 開会の辞

8 : 30 ～ 一般演題 セッション 1 座長 長谷部 晃 (北大院・歯)

8 : 30～8 : 43

### 1. **MIRU-VNTR typing of the Beijing genotype Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Myanmar**

○Lai Lai San<sup>1,2</sup>, Nan Aye Thida Oo<sup>1,2</sup>, Khin Saw Aye<sup>2</sup>, Chie NAKAJIMA<sup>1</sup>, Yasuhiko SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan

<sup>2</sup>Department of Medical Research, Myanmar

8 : 43～8 : 56

### 2. **Detection of drug resistance-associating mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar**

○Nan Aye Thida Oo<sup>1,2</sup>, Lai Lai San<sup>1,2</sup>, Khin Saw AYE<sup>2</sup>, Wah Wah AUNG<sup>2</sup>, Chie NAKAJIMA<sup>1</sup>, Yasuhiko SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, <sup>2</sup>Department of Medical Research, Ministry of Health and Sports, Myanmar,

<sup>3</sup>Hokkaido University The Global Station for Zoonosis Control

8 : 56 ～ 休憩

9 : 01 ～ 一般演題 セッション 2 座長 大久保 寅彦 (北大院・保健科学)

9 : 01～9 : 14

### 3. **Distribution of Oral Veillonella species Associated with Oral Hygiene Status**

○Citra Fragrantia THEODOREA<sup>1</sup>, Izumi MASHIMA<sup>1, 2</sup>, Futoshi NAKAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, <sup>2</sup>Postdoctoral Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

9 : 14～9 : 27

4. 口腔 *Veillonella* 全 6 菌種同定 One Step PCR 法の開発

○眞島 いづみ<sup>1,2</sup>、Citra F. THEODOREA<sup>2</sup>、中澤 太<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 日本学術振興会特別研究員 PD、<sup>2</sup> 北海道医療大学歯学部微生物学分野

9 : 27～9 : 40

5. 致死性菌血症を惹起するセレウス菌の系統解析

○赤松 玲子<sup>1</sup>、鈴木 仁人<sup>2</sup>、沖中 敬二<sup>3</sup>、藤倉 大輔<sup>1</sup>、鈴木 里和<sup>2</sup>、大西 なおみ<sup>4</sup>、馬場 尚志<sup>3</sup>、江崎 孝行<sup>5</sup>、柴山 恵吾<sup>2</sup>、東 秀明<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター、<sup>2</sup> 国立感染症研究所細菌第二部、<sup>3</sup> 国立がん研究センター中央病院 感染制御室、<sup>4</sup> 公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター、<sup>5</sup> 岐阜大学大学院医学系研究科再生分子統御学講座 病原体制御学分野

9 : 40 ～ 休憩

9 : 45 ～ 一般演題 セッション 3 座長 佐伯 歩 (北大院・歯)

9 : 45～9 : 58

6. *Helicobacter pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

○永島 裕之<sup>1,2,3</sup>、横田 伸一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 札幌医科大学腫瘍内科、<sup>2</sup> 札幌医科大学微生物学教室、<sup>3</sup> バイラー医科大学、<sup>4</sup> 大分大学環境・予防医学講座

9 : 58～10 : 11

7. 納豆抽出物由来ペプチドの殺菌作用の特異性

○北川 学<sup>1,2</sup>、白石 宗<sup>1</sup>、山本 聡<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>1</sup>、小笠原 徳子<sup>1</sup>、宮本 篤<sup>2</sup>、横田 伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 札幌医科大学医学部微生物学講座、<sup>2</sup> 札幌医科大学附属病院薬剤部

10 : 11～10 : 24

**8. *Aspergillus flavus* 国内臨床分離株の Maus 病原性に関する研究**

○濱田 早帆、豊留 孝仁

帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター 食品リスク分野

10 : 24～10 : 37

**9. マイコプラズマ由来リポペプチド・リポタンパク質によるインフラマソームの活性化**

○佐伯 歩<sup>1</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、亀崎 良助<sup>1</sup>、鈴木 敏彦<sup>2</sup>、柴田 健一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院 歯学研究科 口腔分子微生物、<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 細菌感染制御学分野

10 : 37～ 休憩

10 : 42～ 一般演題 セッション 4 座長 佐藤 豊孝 (札幌医大・医)

10 : 42～10 : 55

**10. 十勝地方における酪農場の土壌からのレプトスピラ分離**

○神田 珠希<sup>1</sup>、森谷 浩明<sup>2</sup>、村田 亮<sup>1</sup>、菊池 直哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット、<sup>2</sup>十勝 NOSAI

10 : 55～11 : 08

**11. 北海道におけるヒトのレプトスピラ症例発生報告**

○村田 亮<sup>1</sup>、小笠原 卓<sup>2</sup>、大島 美保<sup>2</sup>、成田 光生<sup>2</sup>、岡 敏明<sup>2</sup>、菊池 直哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット、<sup>2</sup>札幌徳洲会病院・小児科

11 : 08～11 : 21

**12. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. among large ruminants in the Philippines**

Marvin A. Villanueva<sup>1</sup>, Claro N. Mingala<sup>2</sup>, Michelle M. Balbin<sup>2</sup>, Chie Nakajima<sup>1,3</sup>, Norikazu Isoda<sup>3,4</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1,3</sup>, Nobuo Koizumi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University. <sup>2</sup> Animal Health Unit, Philippine Carabao Center National Headquarters and Gene Pool, Science City of Muñoz, Nueva Ecija Philippines. <sup>3</sup> Hokkaido University The Global Station for Zoonosis Control. <sup>4</sup> Unit of Risk Analysis and Management, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University. <sup>5</sup> Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo.

11 : 21～ 休憩

11 : 26～ 一般演題 セッション 5 座長 村田 亮 (酪農学園大・獣医)

11 : 26～11 : 39

**13. Evaluation of the newly developed enrichment broth for the growth of *Listeria monocytogenes***

○Letlhogonolo Koogotsitse<sup>1</sup>, Akiko Kusumoto<sup>1</sup>, Shintaro Shichinohe<sup>1</sup>, Takayuki Ezaki<sup>2</sup>, Keiko Kawamoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section of Food Microbiology and Immunology, Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine. <sup>2</sup> Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Gifu University.

11 : 39～11 : 52

**14. 札幌地下歩行空間での空气中浮遊細菌の調査**

○酒井 昂平<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保健科学・病態解析

11 : 52～12 : 05

**15. メタゲノム解析による鶏肉表面細菌叢の経時的変化の検出**

○瀧 圭介<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保健科学・病態解析

12 : 05～ 昼休み

評議員・幹事会（於 歯学部5階・口腔分子微生物学教室医局）

13：00～ 総会

13：30～ 休憩

13：40～ 一般演題 セッション6 座長 楠本 晃子（帯広畜産大・動物・食品  
検査診断センター）

13：40～13：53

**16. 巨大ウイルス *Mimivirus* の蛋白間相互作用に関与するアンキリンリピートをコードする遺伝子とクラミジアの進化**

○山崎 すみれ<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保科・病態解析

13：53～14：06

**17. 唐辛子の辛味成分 Capsaicin による *Chlamydia trachomatis* の細胞内増殖抑制効果について**

○山川 和也<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保健科学・病態解析、<sup>2</sup>順大・医・研究基盤センター

14：06～14：19

**18. DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析による *Neochlamydia S13* 共生アメーバのレジオネラ撃退に関わる遺伝子の探索**

○松下 瑞江<sup>1</sup>、米田 千夏<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、三宅 正紀<sup>2</sup>、永井 宏樹<sup>3</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保健科学・病態解析、<sup>2</sup>静岡県立大・薬・免疫微生物、<sup>3</sup>大阪大学微生物病研究所

14：19～14：32

**19. アメーバに共生する *Neochlamydia S13* による宿主アメーバのアクチンの修飾について**

○米田 千夏<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、永井 宏樹<sup>3</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保科・病態解析、<sup>2</sup>順大院・医・研究基盤センター、<sup>3</sup>阪大  
微研

14 : 32～14 : 45

**20. *Chlamydia trachomatis* 低酸素培養モデルの構築**

○松尾 淳司<sup>1</sup>、酒井 昂平<sup>1</sup>、山川 和也<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保健科学・病態解析、<sup>2</sup>順大院・医・形態解析イメージン  
グ

14 : 45～ 休憩

14 : 50～ 一般演題 セッション7 座長 白石 宗 (札幌医大・医)

14 : 50～15 : 03

**21. タゾバクタム／ピペラシリン耐性大腸菌の耐性機構の解析**

○鈴木 裕樹<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>1</sup>、山本 聡<sup>1</sup>、小笠原 徳子<sup>1</sup>、白石 宗<sup>1</sup>、品  
川 雅明<sup>2</sup>、高橋 聡<sup>3</sup>、横田 伸一<sup>1</sup>

札幌医大・<sup>1</sup>医学部・微生物学、<sup>2</sup>附属病院検査部、<sup>3</sup>医学部・感染制  
御・臨床検査医学

15 : 03～15 : 16

**22. 北海道大学病院にて分離されたニューデリー・メタロベータラクタ  
マーゼ NDM-5 産生大腸菌の性状解析**

○大久保 寅彦、松尾 淳司、山口 博之

北大院・保健科学・病態解析

15 : 16～15 : 29

**23. *Actinobacillus pleuropneumoniae* のキノロン耐性決定領域におけるア  
ミノ酸変異**

○井澤 将規、真能 敬弘、村田 亮、菊池 直哉  
酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット

15 : 29～15 : 42

**24. 牛及び食肉由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の特徴とヒトへの影響**

○佐藤 友美<sup>1</sup>、臼井 優<sup>1</sup>、小西 典子<sup>2</sup>、甲斐 明美<sup>1</sup>、田村 豊<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>酪農大・獣医・食品衛生、<sup>2</sup>東京・健安研

15 : 42～15 : 55

**25. 日本における大腸菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(mcr-1)保有状況とヒト医療に与える影響**

○福田 昭<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>2</sup>、鈴木 裕樹<sup>2</sup>、臼井 優<sup>1</sup>、浅井 鉄夫<sup>3</sup>、横田 伸一<sup>2</sup>、田村 豊<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>酪農大 獣医・食品衛生、<sup>2</sup>札幌大 医・微生物、<sup>3</sup>岐阜大院連獣

15 : 55～ 休憩

16 : 00～ 特別講演 座長 柴田 健一郎（北大院・歯）

**特別講演**

**病原細菌、マイコプラズマの滑走運動-メカニズムと起源**

**宮田 真人**

（大阪市立大学大学院理学研究科・教授）

17 : 15～ 表彰式・閉会の辞

17 : 30～ 懇親会（1階・リフレッシュラウンジ）

## 講演要旨

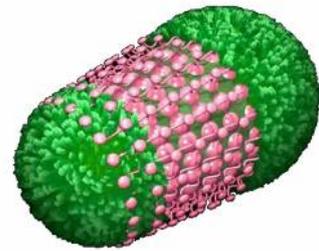
## 病原細菌，マイコプラズマの滑走運動

### -メカニズムと起源-

宮田 真人

大阪市大・大学院理学研究科・細胞機能学研究室

魚病原性細菌であるマイコプラズマ・モービレは、菌体の片側に滑走の装置を形成し、固形物表面をすべるように動く‘滑走運動’を行います。この運動は毎秒4.5ミクロンにも達しますが、他の生体運動と根本的に異なるユニークなものです。私たちは1997年から現在までに、装置の構造、構成タンパク質、結合対象、エネルギー源、力学特性、などを明らかにし、そのメカニズムを提案しました。「ATP合成酵素に由来する特殊なモーターで発生した力が、外部表面に伝わる。その力は巨大な“クランク”タンパク質を介して、もうひとつの巨大な“あし”タンパク質450分子を動かす、宿主表面のシアル酸オリゴ糖を、つかみ、引っ張り、離すことにより、菌体を前に進める」セミナーでは、生体運動の起源と分布についての議論も行います。



参考)

Miyata M, Hamaguchi T (2016) Current Opinion in Microbiology. 29, 15-21. PMID 26711226. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527415001307>

Miyata M, Hamaguchi T (2016) Frontiers in Microbiology 7, 960. PMID 27446003. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00960/full>

# 1. MIRU-VNTR typing of the Beijing genotype Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Myanmar

○Lai Lai San<sup>1,2</sup>, Nan Aye Thida Oo<sup>1,2</sup>, Khin Saw Aye<sup>2</sup>, Chie NAKAJIMA<sup>1</sup>,  
Yasuhiko SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control,  
Hokkaido University, Sapporo, Japan

<sup>2</sup>Department of Medical Research, Myanmar

## Introduction

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a high burden for many countries. Myanmar is among the 22 countries with the highest burden of tuberculosis (TB) and also one of the 27 high MDR-TB burden countries in the world. The estimates of MDR-TB burden in Myanmar by WHO in 2014 is 5% of new cases and 27% of retreated cases. Previous studies on genotyping in Myanmar pointed out that the Beijing strain has a significant association with MDR-TB. Hence we tried to identify the transmission status of MDR Beijing genotype MTB strains using detailed genotyping methods.

## Materials and Methods

To determine the genotype and to identify the transmission pattern, a total of 212 Beijing MDR-MTB isolates collected from Myanmar were analyzed by variable number of tandem repeat(s) of mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU-VNTR) typing. Fifteen loci of MIRU-VNTR (QUB26, Mtub21, MIRU31, MIRU10, QUB11b, MIRU26, MIRU4, MIRU39, MIRU40, Mtub4, QUB4156, Mtub30, MIRU39, ETRA, and MIRU16) were used and the results were analyzed by Bionumeric software.

## Results

There were 38 clusters in 212 isolates and 102 unique patterns in phylogenetic analysis. The biggest cluster consisted of 8 isolates. MIRU-VNTR pattern of isolates from Myanmar was different from that of neighboring countries. The strains from Myanmar showed no significant clonal expansion and less clustering.

## Conclusion

VNTR set used in this study was suitable for the discrimination of Beijing genotype MDR-MTB. The finding of the highly diverse Beijing genotype MDR-MTB can be inferred that the outbreak is less likely to occur. It can be concluded that the strains may be emerging in each patient individually. This study contributes to make effective measures for the better treatment strategies and prevention from further development of multidrug-resistant TB.

## 2. Detection of drug resistance-associating mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar

○Nan Aye Thida Oo<sup>1,2</sup>, Lai Lai San<sup>1,2</sup>, Khin Saw AYE<sup>2</sup>, Wah Wah AUNG<sup>2</sup>,  
Chie NAKAJIMA<sup>1</sup>, Yasuhiko SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University,

<sup>2</sup>Department of Medical Research, Ministry of Health and Sports, Myanmar,

<sup>3</sup>Hokkaido University The Global Station for Zoonosis Control

ayethidaoo@czc.hokudai.ac.jp

### Background

Tuberculosis (TB) caused by *M. tuberculosis* (MTB) still remains as one of the leading causes of morbidity and mortality in the world. Controlling TB has become troublesome with the emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Currently, mutation detection of specific genetic loci associated with drug resistance is the most valuable approach for rapid and reliable diagnosis of DR-TB. Pyrazinamide (PZA) is important first-line TB drug, as well as streptomycin (STR), is included in both retreatment and MDR-TB treatment regimen. To elucidate mutations responsible for the resistance to these drugs, we performed sequence analysis of PZA resistance associating gene, *pncA*, and STR-resistance associating genes (*rpsL*, *rrs* and *gidB*) in MDR-MTB isolates of Myanmar.

### Materials and Methods

From 230 MDR-MTB isolates, DNA fragments encoding *pncA* were amplified by PCR and sequenced. In addition, *rpsL*, *rrs* and *gidB* fragments were amplified from 141 STR-resistant and 10 STR-susceptible isolates and the nucleotide sequences were analyzed. Mutations associating with PZA and STR resistance were identified by comparing obtained sequences with those of the susceptible strains.

### Results

Sixty-nine different types of mutations were dispersed on the *pncA* and thirty-four of them were novel. Only 3.5% (5/141) of STR-resistant isolates had mutation in *rrs*, but 70.2% (99/141) carried mutations in *rpsL*. Fourteen different types of mutations throughout *gidB* were found in 21.3% (30/141) of STR resistant isolates.

### Conclusion

In this study, most of the MDR-MTB isolates carried drug resistance-associating mutations in the analyzed genes. The findings from this study could contribute to detail understanding of drug resistance acquisition mechanisms and lead to a good way for the rapid and effective method for the diagnosis and monitoring of drug-resistant TB in Myanmar.

### 3. Distribution of Oral *Veillonella* species Associated with Oral Hygiene Status

○Citra Fragrantia THEODOREA<sup>1</sup>, Izumi MASHIMA<sup>1,2</sup>, Futoshi NAKAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, <sup>2</sup>Postdoctoral Fellow of Japan Society for the Promotion of Science

**Background:** Oral hygiene status has influence to the microbial profile in terms of both numbers and diversity of microorganisms in oral biofilms. In addition, it was reported that oral *Veillonella* species had been frequently isolated and known to have a central role in the biofilm formation at early stage. Six species of genus *Veillonella* such as *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* have been isolated from human oral cavities. The main habitats of these oral *Veillonella* species are tongue, buccal mucosa, and saliva. However, the pathogenicity roles and the distribution of oral *Veillonella* species in saliva associated with oral hygiene status in the children have not been clarified.

**Aim:** This study aimed to evaluate the distribution and frequency of oral *Veillonella* species in the saliva of Thai children associated with oral hygiene status.

**Methods:** A total of 107 saliva samples (subjects) were collected from Thai children and divided into 3 groups (Good, Moderate and Poor oral hygiene) depended on the results of *Simplified Oral Hygiene Index*. After homogenization, aliquots of serial 10-fold dilution (100µl) were used to inoculate on Bacto™ Brain Heart Infusion (BHI) agar and the selective medium, *Veillonella* agar. After inoculation, all samples were incubated under anaerobic condition. Samples on *Veillonella* agar were incubated for 5 days and those on BHI agar were incubated for 7 days. CFUs were counted and stainability were confirmed by using light microscopy after gram staining. Afterward, Genomic DNA was extracted by using the Instagene® Matrix kit (Bio-Rad) from each samples for polymerase chain reaction (PCR) analysis. Oral *Veillonella* species were assessed by using one-step PCR method based on sequences of the *rpo B* gene after PCR at genus level.

**Results:** The total number of *Veillonella* isolates in poor oral hygiene was higher than that in good oral hygiene. *V. rogosae* was detected as the most predominant species in all groups. The next was unknown strains of genus *Veillonella*. Interestingly, the number of *V. rogosae* and *V. atypica* decreased from good to poor oral hygiene. Otherwise, the number of *V. parvula* increased from good to poor oral hygiene. *V. denticariosi* had less number in all groups, whereas the number of *V. dispar* and *V. tobetsuensis* did not change in all groups.

**Discussion and Conclusion:** Based on the results, *V. parvula* might have potential association with deterioration of oral hygiene status of Thai children. In addition, it was suggested that these unknown strains might be novel species of genus *Veillonella*.

## 4. 口腔 *Veillonella* 全6菌種同定 One Step PCR 法の開発

○眞島 いづみ<sup>1,2</sup>、Citra F. THEODOREA<sup>2</sup>、中澤 太<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 日本学術振興会特別研究員 PD、<sup>2</sup> 北海道医療大学歯学部微生物学分野

【目的】 *Veillonella* 属細菌はグラム陰性の偏性嫌気性菌であり、口腔 *Veillonella* として、現在、*V. atypica*, *V. dispar*, *V. denticariosi*, *V. parvula*, *V. rogosae*, *V. tobetsuensis* の全6菌種が分離同定されている。これまでの研究によって、う蝕や歯周病巣からこれらの菌種が高頻度に分離されることが明らかとなっている。しかし、これら6菌種を同定するには、複数遺伝子の塩基配列解析や、数段階に渡る PCR 法など、その同定法が複雑で時間を要していた。

本研究では、上記の欠点を克服した、6菌種を一度に同定できる One Step PCR 法を開発したので、その成果を報告する。

【材料と方法】 供試株は口腔 *Veillonella* 全6菌種とも標準株を使用し、BHI 血液寒天培地で 37°C、5 日間、嫌気条件下で培養した。培養後、ゲノミック DNA を抽出し、PCR テンプレートとした。

特異的プライマーを設計するにあたり、ハウスキーピング遺伝子の一つである *rpo B* (RNA polymerase  $\beta$  subunit) 遺伝子を使用した。6菌種間の *rpo B* 遺伝子の類似性解析には LASERGENE (DNASTAR 社) を使用し、CLUSTAL W 解析を行った。また、同解析により可変領域の検出を行い、菌種特異的プライマーの設計を行い、その特異度と感度を検証した。

【結果】 *rpo B* 遺伝子の6菌種間の類似性は 73.7 - 90.9% であり、2500 - 3100 番の領域で最も塩基配列に差が見られた。本領域において6本のリバースプライマー、本領域外の6菌種間共通配列部分において、1本のフォワードプライマーの設計を行った。これら7本の混合プライマーと6菌種の DNA テンプレートを用いた PCR の結果、各菌種固有の産物を確認することが出来た。各プライマーは DNA テンプレート量 1pg - 0.01 ng の間で検出することが出来た。

【考察と結論】 本研究により、口腔 *Veillonella* 全6菌種を一度に同定できる One Step PCR 法を開発できた。今後、口腔 *Veillonella* の各菌種を本手法で容易に同定することで、う蝕や歯周病の予防、診断、及び治療に役立つことが示唆される。

## 5. 致死性菌血症を惹起するセレウス菌の系統解析

○赤松 玲子<sup>1</sup>、鈴木 仁人<sup>2</sup>、冲中 敬二<sup>3</sup>、藤倉 大輔<sup>1</sup>、鈴木 里和<sup>2</sup>、大西 なおみ<sup>4</sup>、  
馬場 尚志<sup>3</sup>、江崎 孝行<sup>5</sup>、柴山 恵吾<sup>2</sup>、東 秀明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター、<sup>2</sup>国立感染症研究所 細菌第二部、<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院 感染制御室、<sup>4</sup>公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター、<sup>5</sup>岐阜大学大学院医学系研究科 再生分子統御学講座 病原体制御学分野

【背景】一般にセレウス菌 (*Bacillus cereus*) は、食中毒原因菌として知られる。しかし近年、セレウス菌に感染した患者が血流感染症等の極めて重篤な症状を示すアウトブレイク事例が報告されている。multilocus sequence typing (MLST) 法を用いた遺伝子解析から、これらセレウス菌アウトブレイク株は、セレウス菌標準株よりも、炭疽菌 (*B. anthracis*) に近いゲノム性状を持つ菌種である可能性が示唆されている。

【目的】ある医療機関で2013年に発生したアウトブレイクに関与した *B. cereus* について、その遺伝子学的背景を明らかにすることを目的として、アウトブレイクに関連した株を収集し解析するとともに、過去の他地域におけるアウトブレイク株、炭疽菌並びにセレウス菌標準株のゲノム情報と比較し、系統解析を行った。

【材料と方法】アウトブレイク関連株 (患者由来及び院内備品由来計 69 株) からゲノムを抽出し、7つのハウスキーピング遺伝子を用いた MLST 解析、ならびに炭疽菌ゲノムマーカー (Ba813) を標的とした PCR を行った。

【結果・考察】MLST 解析の結果から、アウトブレイク関連株の 47 株 (68%) は炭疽菌に非常に近い *Cereus* III lineage<sup>1)</sup> に分類されることが明らかになった。さらに、*Cereus* III lineage に分類された 47 株中の 17 株 (36%) は、Ba813 に陽性であることを見出した。特に患者由来株 13 株に着目すると、12 株 (92%) が *Cereus* III lineage に分類され、3 株 (25%) が Ba813 陽性であった。以上の結果から、今回のアウトブレイクは、炭疽菌様のゲノム性状を持つセレウス菌により引き起こされたことが示唆された。

1) Priest *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2004

## 6. *Helicobacter pylori* LPS は TLR2/TLR10 に認識される

○永島 裕之<sup>1)2)3)4)</sup>、山岡 吉生<sup>2)</sup>、横田 伸一<sup>3)</sup>

<sup>1</sup>札幌医科大学腫瘍内科、<sup>2</sup>大分大学環境・予防医学講座、

<sup>3</sup>札幌医科大学微生物学教室、<sup>4</sup>留萌市立病院

【目的】*Helicobacter pylori* 感染症では virulence factors の研究は多くされているものの、host factors に関する研究は未だ十分とはいえない。今回、疫学調査で得られた標本を用いて感染にかかわる host factors を検索した。

【方法】健常者 293 例を対象とした。*H. pylori* 感染者と *H. pylori* 非感染の胃粘膜生検組織からマイクロアレイを行った。候補遺伝子について全症例を対象に定量 RT-PCR にて測定した。免疫染色を行い、変動遺伝子の組織発現部位を同定した。胃癌患者由来細胞株 NCI-N87 に対して *H. pylori* 株 26695 を感染実験させ、遺伝子変動のパターンを検討した。TLR を遺伝子導入した HEK 細胞を用いて *H. pylori* LPS の ligand の同定を行った。

【結果】マイクロアレイ解析では *H. pylori* 感染者で *H. pylori* 非感染者に比較して全 TLR 中 *TLR10* が最も上昇していた[fold change (FC)=15]。全症例を対象とした定量 RT-PCR においても、*TLR10* は *H. pylori* 感染者で有意な上昇を認めた (FC=3)。*TLR10* の発現は *TLR2* と正の相関を認めた(R = 0.583)。免疫染色では、主に胃上皮細胞に *TLR10* の発現を認めた。In vitro で NCI-N87 に 26695 菌体を感染させると、時間、菌量依存的に *TLR10* の上昇を認めた。HEK 細胞に TLR の遺伝子導入を行い、heat-killed *H. pylori*、および *H. pylori* LPS で刺激したところ、TLR2,TLR10 の共導入において、その他の組み合わせよりも有意に高い NF-κB 活性の上昇を認めた。

【考察】*H. pylori* LPS が TLR2/TLR10 の ligand であること示された。GWAS を用いた解析でも *TLR10* は重要な host factor であることが報告されている (JAMA 2011)。*H. pylori* LPS は tetra-acyl lipid A の構造を有しており、*TLR10* の ligand 構造を示唆する所見と考えられた。

## 7. 納豆抽出物由来ペプチドの殺菌作用の特異性

○北川 学<sup>1,2</sup>、白石 宗<sup>1</sup>、山本 聡<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>1</sup>、小笠原 徳子<sup>1</sup>、  
宮本 篤<sup>2</sup>、横田 伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>札幌医科大学医学部微生物学講座、<sup>2</sup>札幌医科大学附属病院薬剤部

【目的】 納豆は日本固有の伝統的発酵食品の代表格であり、健康によい食物であると古来より考えられている。近年、納豆抽出画分に殺がん細胞作用があることが報告され、活性画分の精製により分子量約 5 000 のペプチド (納豆ペプチド) が同定された【畠山、伊藤ら 素材物質学雑誌 第 27 卷 第 1/2 号 2016】。また、本ペプチドは抗菌ペプチドに特徴的とされる  $\alpha$ -ヘリックスに富む両親媒性の構造を有していたことから、我々は納豆ペプチドの殺菌作用の評価を行った。

【方法】 納豆をホモジナイズ後に上清を回収して、30-50%飽和硫酸沈殿画分を取得した。透析後、Butyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーによって納豆ペプチドを精製した。①最小発育阻止濃度 (MIC) 測定は Clinical Laboratory Standards Institute が定める方法を参考にして行った。培地は Todd Hewitt broth (THB) に適宜 5%ウマ溶血液 (HHL) を添加したものをを用いた。②納豆ペプチドによる *Streptococcus pneumoniae* R6 株の殺菌曲線を THB + 5% HHL 培地を用いて作成した。③納豆ペプチド作用時の菌の形態を R6 株を用いて光学顕微鏡および透過電子顕微鏡にて観察した。④HHL に含まれる納豆ペプチドの殺菌作用に対する増強因子を検討した。

【結果と考察】 ①MIC による抗菌活性を検討したところ、測定した細菌の中で *S. pneumoniae* および *Bacillus* 属細菌の一部に対してのみ抗菌効果が認められた (MIC: 80-160  $\mu\text{g/ml}$ )。また、MIC 測定に使用する培地に対して HHL を添加することにより、菌の増殖の亢進と抗菌作用の増強が認められた。納豆ペプチドは非常に狭いユニークな抗菌スペクトルを示した。②*S. pneumoniae* R6 株の納豆ペプチドによる殺菌曲線から、納豆ペプチド添加直後は菌の増殖は正常に起きるが、添加数時間後から殺菌効果が出ることが示唆された。③納豆ペプチド作用時の R6 株の形態を観察すると、本来双球菌である *S. pneumoniae* が数珠つなぎ状になっており、分裂異常の起きていることが示唆された。④ヘミン存在下で濃度依存的に納豆ペプチドの MIC の低下が見られたことから、HHL 成分のヘミンが納豆ペプチドの殺菌効果を増強していると考えられた。

## 8. *Aspergillus flavus* 国内臨床分離株の Maus 病原性に関する研究

○濱田 早帆、豊留 孝仁

帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター 食品リスク分野

【目的】 *Aspergillus flavus* はアスペルギルス症の原因真菌の1つであり、免疫抑制状態の動物やヒトでしばしば致命的経過をとる。肺アスペルギルス症の原因真菌として最も一般的である *A. fumigatus* に比べ、*A. flavus* については感染実験による十分な知見が積み上げられていない。本研究では国内臨床検体から分離された *A. flavus* 3株、および米国の環境中から分離された *A. flavus* 1株をそれぞれ Maus に経気道感染させ、病原性の比較検討を行った。

【方法】 C57BL/6 Maus の気管内に *A. flavus* の孢子懸濁液を投与し、生存率の比較を行った。Maus には感染前後にヒドロコルチゾンによる免疫抑制処置を行った。死亡時もしくは実験終了時点で Maus を解剖、肺の摘出を行い、菌の定量および病理学的評価を行った。

【結果および考察】 今回検討を行った国内臨床分離株3株は、米国由来 *A. flavus* である NRRL3357 株に比べていずれも生存率が高く、病原性が低いと考えられた。今回用いた国内臨床分離株はアフラトキシン産生能を欠いており、アフラトキシン産生性を有する NRRL3357 株と大きく異なっている。また、我々が行っているゲノム比較の結果からも国内臨床分離株と NRRL3357 株との間にいくつかの違いが見られており、これら差異の中に病原性に寄与する因子が含まれていることが示唆された。

## 9. マイコプラズマ由来リポペプチド・リポタンパク質によるインフラマソームの活性化

○佐伯 歩<sup>1</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、亀崎 良助<sup>1</sup>、鈴木 敏彦<sup>2</sup>、柴田 健一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院 歯学研究科 口腔分子微生物、

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 細菌感染制御学分野

【目的】インフラマソームは炎症性サイトカインのひとつである IL-1 $\beta$ の産生を制御する細胞内センサーである。IL-1 $\beta$ は歯周炎の病態形成において重要な役割を果たしている。我々はこれまで *M. salivarium* (Ms) ならびに *M. pneumoniae* (Mp) の菌体が樹状細胞ならびにマクロファージに対して NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 $\beta$ を産生することを明らかにした。本研究では、これらのマイコプラズマの活性物質の一つがリポタンパク質 (LP) ・リポペプチドであることを明らかにしたので報告する。

【方法】*M. salivarium* ATCC23064 (Ms)ならびに *M. pneumoniae* ATCC15492(Mp)から TritonX-114 二相分離法で LP を調製し、それぞれ MsLP ならびに MpLP とした。標的細胞は C57BL/6 (B6)マウス、caspase-1、NLRP3 あるいは ASC あるいは TLR2 ノックアウトマウス(caspase-1KO、NLRP3KO、ASCKO あるいは TLR2KO)より採取した骨髓由来マクロファージ(BMM)を用いた。IL-1 $\beta$ の産生は大腸菌由来の精製リポ多糖 (LPS)で4時間プライミングした後、MsLP、MpLP あるいは Ms 由来リポペプチド FSL-1 で更に 24 時間刺激した後、反応上清中に含まれる IL-1 $\beta$ 量を ELISA 法で測定した。

【結果ならびに考察】MsLP、MpLP あるいは FSL-1 は B6 由来の BMM に IL-1 $\beta$ の産生を誘導したが、それらの活性は caspase-1、NLRP3 ならびに ASC をノックアウトすることによりほぼ完全に消失した。そこで、リポタンパク質のどの部分に活性があるのかを調べるために、MsLP を種々の濃度のプロテナーゼ K で処理したところ、IL-1 $\beta$ 産生誘導活性は、減弱することなく逆に増強した。このことより活性部位は LP のタンパク部分ではなく、N 末端のリポペプチド部分にあることが示唆された。また、MsLP、MpLP あるいは FSL-1 の IL-1 $\beta$ 産生誘導活性は TLR2KO でほぼ完全に消失した。さらに、P2XR および P2YR 阻害剤である oATP は本活性を有意に抑制した。以上の結果から、マウスマクロファージに対する Ms ならびに Mp の IL-1 $\beta$ 産生誘導活性を示す活性物質の一つは LP であり、その活性発現には TLR2 ならびに NLRP3 インフラマソームが重要な役割を果たし、さらに、細胞外に放出された ATP が関与している可能性が示唆された。

## 10. 十勝地方における酪農場の土壌からの レプトスピラ分離

○神田 珠希<sup>1</sup>、森谷 浩明<sup>2</sup>、村田 亮<sup>1</sup>、菊池 直哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット、<sup>2</sup>十勝 NOSAI

【背景・目的】レプトスピラ症は世界各国で発生が認められる人獣共通感染症である。牛のレプトスピラ症の多くは不顕性に経過するが、発症した場合貧血・黄疸・血色素尿の他、泌乳牛は乳量低下や流死産を起こす。レプトスピラを保菌する動物は尿中に菌を排泄し水系や土壌を汚染し感染源となる。牛のレプトスピラ症の発生は1970年以降少数例のみであるが、血清あるいはバルク乳を用いた抗体検査では高い陽性率を示している。このような農場の陽性牛はレプトスピラを排菌し土壌を汚染し、感染源となることが考えられる。本研究では血清学的に陽性を示した酪農場の土壌からレプトスピラの検出を試みた。

【材料・方法】対象農場：2015年8月北海道十勝地方の5酪農場から採集した。これらの酪農場はバルク乳の調査によりレプトスピラ血清型 Hardjo に対して抗体陽性を示した農場である。土壌：各農場から10か所、計50検体を採取した。レプトスピラの分離：これらの土壌に HEPES(25mM, pH7.4)を加え、その上清を5種類の抗菌薬 STAFF を含む EMJH 培地および Korthof 培地に接種した。30°C2週間培養後、暗視野顕微鏡下でらせん菌の有無を確認した。雑菌の汚染が認められた検体についてはポアサイズ 0.45 μm のフィルターで濾過し継代培養した。レプトスピラの確認：培養菌体から DNA を抽出し 23S rRNA 遺伝子、鞭毛遺伝子 (*flaB*) を標的とした PCR を行い病原性レプトスピラと確認した。病原性レプトスピラと確認した株を EMJH 寒天培地を用いてクローニングし、その *flaB* PCR 産物のシーケンス解析等を行い菌種同定を行った。*flaB* PCR の PCR 産物については RFLP を行い既知の血清型と比較した。

【結果・考察】レプトスピラ様菌は5農場すべての農場から検出され、土壌50検体中37検体で確認された。23S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った結果、35検体(70%)がレプトスピラ属菌であることが判明した。さらに *flaB* 検出 PCR により、5株(10%)が病原性レプトスピラと推定された。EMJH 固形培地を用いてクローニングした結果、3株の病原性レプトスピラが得られた。これらの株の *flaB* のシーケンス解析を行った結果、病原性レプトスピラ *L.alstonii* と中等度病原性レプトスピラ *L.licerasiae* と同定された。また RFLP パターンの比較の結果、3株とも既知の血清型切断パターンと一致しなかった。以上のように十勝地方の酪農場の土壌から病原性レプトスピラが分離された。対象農場は血清学的には Hardjo 陽性であったが、本血清型については分離できなかった。

## 11. 北海道におけるヒトのレプトスピラ症例発生報告

○村田 亮<sup>1</sup>、小笠原 卓<sup>2</sup>、大島 美保<sup>2</sup>、成田 光生<sup>2</sup>、岡 敏明<sup>2</sup>、菊池 直哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット、<sup>2</sup>札幌徳洲会病院・小児科

【背景】レプトスピラ症は、野生動物だけでなくウシやイヌなど人と密に関わる動物に至るまで、北海道でも広く発生が見られる人獣共通感染症である。これまで道内でのヒト症例は見当たらなかったが、2016年2月にヒトにおけるレプトスピラ感染が疑われたので報告する。

患者は10歳男児。2月11日から発熱、頭痛、腓腹筋の筋痛等を発症。第8病日に札幌徳洲会病院に入院。結膜充血および舌尖端の発赤などレプトスピラ症が疑われる皮膚粘膜症状が認められたことから当研究室に検査依頼があった。

入院前にトスフロキサシントシル酸塩（オゼックス）投与。入院時のγグロブリンおよびドキシサイクリン塩酸水和物（ビブラマイシン）の投与を経て症状の改善が見られ、3週間後に退院し、後遺症はない。

【材料・方法】①2月24日（第13病日）の患者尿及び血清について、ウマ血液寒天培地による37°C48時間の好気および嫌気培養、EMJH培地による30°C3ヶ月間好気培養、および病原性レプトスピラが保有する鞭毛遺伝子（*flaB*）を標的としたNested PCRを実施した。②2月24日（第13病日）、4月14日（第61病日）、8月6日（第177病日）の患者血清について、*Leptospira interrogans*の各種血清型株（Autumnalis、Australis、Ballum、Grippotyphosa、Hebdomadis、Copenhageni、Icterohaemorrhagiae、Pomona、Hardjo、Canicola、Pyrogenes、Tarassovi、Bratislava）を用いた顕微鏡下凝集試験（MAT）を行った。

【結果・考察】血液寒天培地を用いた一般細菌の培養、およびEMJHやPCRによるレプトスピラの病原学的検出については全ての結果が陰性であった。

MATによる抗体検査では、第13病日の血清は全ての抗原と反応を示さなかった。しかし第61病日の回復期血清が血清型Copenhageniに対して100倍の凝集価を示したことから、本症例の原因がレプトスピラであることが示唆された。

患者はハムスターをゲージ内ではなく自宅に放し飼いにしていた。また、患者の第13病日にこのハムスターも体調を崩し、同日中に死亡していることから、感染経路と何らかの関係があったと考えられる。

本症例の発生によって、温暖な地域の疾病と考えられがちなヒトのレプトスピラ症が、道内でも発生リスクが存在することが明らかとなったため、注意喚起が必要である。

## 12. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. among large ruminants in the Philippines

○Marvin A. Villanueva<sup>1</sup>, Claro N. Mingala<sup>2</sup>, Michelle M. Balbin<sup>2</sup>, Chie Nakajima<sup>1,3</sup>, Norikazu Isoda<sup>3,4</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1,3</sup>, Nobuo Koizumi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan. <sup>2</sup>Animal Health Unit, Philippine Carabao Center National Headquarters and Gene Pool, Science City of Muñoz, Nueva Ecija Philippines. <sup>3</sup>Hokkaido University The Global Station for Zoonosis Control, Sapporo, Japan. <sup>4</sup>Unit of Risk Analysis and Management, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Japan <sup>5</sup>Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

### Introduction

The extent of *Leptospira* infection in large ruminants resulting to economic problems in livestock industry in a leptospirosis-endemic country like the Philippines has not been extensively explored. Therefore, we determined the prevalence and carrier status of leptospirosis in large ruminants using molecular techniques and assessed the risk factors of acquiring leptospirosis in these animals.

### Materials and methods

Water buffalo and cattle urine samples (n=831) collected from 21 farms during 2013-2015 were subjected to *flaB*-nested PCR to detect pathogenic *Leptospira* spp. Positive amplicons were subjected to direct sequencing and then analyzed. Amplicons with overlapping sequences were cloned and sequenced.

### Results and Discussion

Leptospiral *flaB* was detected in water buffalo and cattle with a detection rate of 17.3% and 7.8%, respectively. Overall prevalence of *Leptospira* infection is 16.1%. Leptospiral DNA was mainly detected in samples from animals managed in communal farms. Sequence analysis of *Leptospira flaB* from positive animals revealed the formation of three major clusters with *L. borgpetersenii* or *L. kirschneri*. One farm contained *Leptospira flaB* sequences from all identified clusters in this study, suggesting that this farm was the main source of leptospires for other farms, in accordance with its role as the main distributor of milking water buffaloes in the country. Water buffalo, in particular, was infected with multiple *Leptospira* species that diversified as a possible consequence of interaction with host animals and environmental factors.

### Conclusion

This study suggested that these large ruminants are infected with various pathogenic *Leptospira* species causing possible major economic loss in the livestock industry as well as potential *Leptospira* reservoirs that can transmit infection to humans and other animals in the Philippines.

### 13. Evaluation of the newly developed enrichment broth for the growth of *Listeria monocytogenes*

○Letlhogonolo Koogotsitse<sup>1</sup>, Akiko Kusumoto<sup>1</sup>, Shintaro Shichinohe<sup>1</sup>, Takayuki Ezaki<sup>2</sup>,  
Keiko Kawamoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section of Food Microbiology and Immunology, Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Gifu University.

**[Aim]** The aim of this study is to evaluate a growth support ability of Food Pathogen Enrichment (FPE), a newly developed enrichment broth, for the detection of *Listeria monocytogenes* in food.

**[Background]** *L. monocytogenes* is a foodborne pathogen that causes severe and often fatal disease in susceptible individuals. For detection of *L. monocytogenes* in food, ISO 11290-1, USDA-FSIS and IDF methods are generally used. These standard methods are adequately sensitive; however, they are complicated and time consuming. It is therefore important to establish methods for rapid isolation and detection.

**[Method]** We compared growth in FPE and conventional enrichment media (LED, UVM and Half Frazer broth), using low levels of *L. monocytogenes* (Scott A strain) cells. Growth was evaluated by plate count at 4, 8 and 24 h post incubation (hpi). The same experiment was repeated using heat injured cells to evaluate recovery. Growth of *L. monocytogenes* was further assessed in milk spiked with 15 CFU/ml cells at 24 hpi.

**[Results]** Growth of both injured and uninjured *L. monocytogenes* in FPE broth was better than in LEB, UVM and Half Frazer broth at 8 hpi. Recovery of heat injured cells was at least sevenfold higher in the FPE than either media at the same time of incubation. On the other hand, growth of uninjured cells was approximately double fold higher in FPE compared to LEB. Among commonly used media, LEB showed the best growth followed by Half Frazer broth. In the spiked milk experiments, FPE yielded highest concentration of *L. monocytogenes* cells even ahead of recommended LEB. These results show that FPE is able to increase the population of both injured and uninjured *L. monocytogenes* within a short time compared to commonly used enrichment media. FPE present the possibility to shorten time required for detection of *L. monocytogenes*. Further assessments to determine detection limit of this enrichment protocol is still to be done.

## 14. 札幌地下歩行空間での空气中浮遊細菌の調査

○酒井 昂平<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保健科学・病態解析

<背景>ヒトやその生活環境に見いだされる菌叢は、ヒトの密集度と共にダイナミックに変動しながら、健康や感染症の発症に少なからず影響を与えていると予想されるが、ヒトの密集度をその環境の菌叢と共に正確に把握できるフィールドは少なく、このような視点からの調査は限られている。一方、平成23年3月12日に完成した札幌地下歩行空間は全長約520mに渡る誰もが自由に行き来できる直線空間であり、ヒトの密集度と環境細菌叢を同時にしかも容易に調査可能な最適な場と考えられる。そこで、我々は札幌地下歩行空間において空気を採取し、そこに含まれる細菌数および薬剤耐性菌を経月的に調査した。

<方法>作業は2016年5月2日、6月1日、7月5日の計3日で、各日午前8時から午後8時の間に、ローボリウムエアサンプラーLV-40(柴田科学)に0.3 $\mu\text{m}$ ガラス繊維フィルターを装着して40L/minで吸気し、2時間ごとにフィルターを交換してエアサンプルを得た。また、吸気部は地上1.5mに設置し、空气中的粒子数はハンドヘルドパーティクルカウンターP311(エアリーテクノロジー)を用いて0.3~0.5 $\mu\text{m}$ 、0.5~1.0 $\mu\text{m}$ 、1.0~5.0 $\mu\text{m}$ の3分画を測定した。通行量調査では10分あたりの通過人数をカウントした。回収したエアサンプルは0.05% TritonX 添加 PBS で洗浄し、遠心した後沈渣をPBSで再懸濁した。細菌数測定ではその懸濁液をトリプトソイ寒天培地、R2A寒天培地に接種して25 $^{\circ}\text{C}$ 3日間培養し、コロニー数から空气中細菌数を算出した。また、その中の一部を選抜してグラム染色し、鏡検した。薬剤耐性菌検出では、懸濁液をアンピシリン、アミカシン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン10mg/L 添加トリプトソイ寒天培地/R2A寒天培地に接種、発育株を耐性菌候補として継代し、16S rDNA 配列に基づいて菌種を同定した。空気の採取は、札幌駅前通まちづくり株式会社の許可を得て実施した。

<結果・考察>測定した細菌数は3 CFU/m<sup>3</sup>から2,000 CFU/m<sup>3</sup>と大幅に変動した。また通行量と粒子数の間には明確な相関関係は見いだせなかった。一方、歩行空間内の温度の上昇とともに検出される菌数は増加した。耐性菌の検出においては、*Staphylococcus saprophyticus* や *Pseudomonas sp.* のアンピシリン耐性株などが検出された。今後は菌叢解析を実施し、地下空間における細菌の構成の可視化を試みる予定である。

<会員外協力者>植村 央 (北大・医学部保健学科)

## 15. メタゲノム解析による鶏肉表面細菌叢の経時的変化の検出

○瀧圭介<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保健科学・病態解析

【目的】 土壌や河川水、建物の床や溜め水さらに生野菜や食肉など身の回りのさまざまな環境中に普遍的に生息するアメーバなど原生生物は、微小生態系食物連鎖の頂点に位置する細菌捕食性微生物を含んでいる。その一方で、試験管内での実験では、原生動物に捕食された一部の食中毒菌が、捕食されたアメーバ内や表面で維持あるいは増殖することが報告されている。しかしながら、これら実験に使用されている原生動物は ATCC 基準株などに限られており、実際の環境を必ずしも反映するものではない。そこで本研究では、実際の流通食品上で繰り返し広げられる食中毒菌とアメーバとの関わり合いが、食中毒菌の生存性や病原性の発動へのインパクトを明らかにすることを目的とし、流通生鮮鶏肉表面上の放置に伴う生菌数・菌叢変化と、その表面からの原生動物の検出・株化を試みた。

【方法】 鶏肉(5 検体)はスーパー店頭で購入し、冷蔵条件 4°C と、中温菌が発育できる 15°C でそれぞれ静置した。購入直後、購入 2 日後 (消費期限日)、購入 7 日後の時点で、100mL/100g sample の PBS で洗浄後に遠心沈渣を得た。沈渣は標準寒天培地での混釈培養で一般細菌数を、DHL 寒天培地での培養で腸内細菌科細菌数を計測し、それぞれ CFU/1mL 洗浄液として算出した。また、遠心沈渣から DNA を抽出後、16S rDNA を増幅し、メタゲノム解析は北海道システムサイエンスに委託した。

【結果・考察】 各検体ともに、購入直後の生菌数は約  $10^3$  CFU/mL だった。4°C 静置の場合、購入 2 日後には  $10^5$  CFU/mL 程度、購入 7 日後には約  $10^8$  CFU/mL 程度にまで増加した。一方、15°C 静置の場合、購入 2 日後の時点で  $10^8$  CFU/mL 程度に達し、購入 7 日後にもほぼ同数であった。メタゲノム解析では購入直後でガンマプロテオバクテリアやバシルスなどが多く、細菌叢に多様性が見られたのに対し、4°C 静置ではガンマプロテオバクテリアが圧倒的多数となっていた。属レベルで見た場合、こうしたガンマプロテオバクテリアの多くはエロモナス、シュードモナスなどの水系細菌・低温発育菌であったことから、こうした細菌は冷蔵した鶏肉の上で増殖し続けていたと考えられた。一方、15°C 静置においては、2days 時点ではガンマプロテオバクテリアが優占化したが、7days 時点ではバクテロイデスの大幅な増加が見られた。これは好気性菌の増殖によって鶏肉表面の酸素が消費されたことによるものと考えられる。また、食肉表面からは細菌を捕食すると思われる鞭毛虫 (*Parabodo* sp., *Sandona* sp.) の株化にも成功した。これらの結果は、私達が食する流通生鮮鶏肉の表

セッション5 (支部会賞候補演題)

面上にて細菌と原生動物の複雑なせめぎ合いが繰り広げられていることを示唆している。

## 16. 巨大ウイルス **Mimivirus** の蛋白間相互作用に關与するアンキリンリピートをコードする遺伝子とクラミジアの進化

○山崎 すみれ<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保科・病態解析

クラミジアの祖先は、7-10億年前に二つの系統に分岐した。一方は比較的変動の少ない安定した環境である脊椎動物の祖先にゲノムのスリム化(約1.0Mbp)を介して順応し、肺炎や性感染症等さまざまな感染症を起こす病原体(病原性クラミジア: 約1,000 ORFs)へと変貌した。もう一方は、過酷な環境に生息するアメーバの祖先の共生体として適応進化を遂げ(環境クラミジア: 約2,500 ORFs)、そのゲノムサイズは約2.5Mbpとゲノムのスリム化は認められず、太古のクラミジアの特性を維持したまま進化してきたと考えられている。しかしながらこの多様性進化の誘因については不明である。一方、近年の研究で、土壌、水系環境、さらに3万年前のロシアの永久凍土といったさまざまな自然環境からアメーバを宿主とする光学顕微鏡でも可視化できる巨大なDNAウイルスが多数見つけられた。この事実は、太古の昔、アメーバの祖先を伴い宿主とするクラミジアと巨大ウイルスの間で起こった生き残りをかけた闘ぎ合いが、クラミジアの進化に大きな影響を与えた可能性を示唆している。そこで本研究では、クラミジアの進化における巨大ウイルスの痕跡を見出すために、クラミジアと巨大ウイルスとの比較ゲノム解析を行った。ゲノム情報(環境クラミジア  $n=12$ 、病原性クラミジア  $n=12$ 、巨大ウイルス  $n=5$ )は、NCBIデータベースより取得した。ORFの抽出、遺伝子のアノテーション、BLASTp解析、比較ゲノムは、主にRASTサーバー(<http://rast.nmpdr.org/>)を用いた。その結果、病原性クラミジアゲノム上では約4%、環境クラミジアゲノム上では菌株間で差が見られるが、約4-8%のORFが巨大ウイルスとヒットした。このヒット数はウイルスによって異なり、Mimivirusにおいて最もヒット数が多く、環境クラミジアのORF数と強い相関を示した( $r=0.82786$ )。環境クラミジアにおいてそのヒットした遺伝子の多くが、蛋白間相互作用に深く関わるアンキリン蛋白(Ank)をコードしていることが分かった。その一方で、病原性クラミジアゲノム中にはAnkをコードする遺伝子を見いだせなかった。これらの結果より、二つの系統に分岐する前の太古のクラミジア祖先と巨大ウイルス特にMimivirusの間では、遺伝子の水平伝播が頻繁に起こっていた可能性が示唆された。またAnkを規定する遺伝子配列の存在の有無が、クラミジアの多様性進化を規定する要因の一つであった可能性がある。

## 17. 唐辛子の辛味成分 Capsaicin による *Chlamydia trachomatis* の細胞内増殖抑制効果について

○山川 和也<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保健科学・病態解析、<sup>2</sup>順大・医・研究基盤センター

*Chlamydia trachomatis*(Ct)は偏性細胞内寄生性細菌であり、性感染症の起原菌として知られている。Ctは宿主細胞内においてユニークな二相性の増殖サイクルを持つ。細胞内でのCtの増殖には、食胞をリソソームと融合しない封入体の形成や脂質代謝の修飾変化を要求する。またCtは、細胞への侵入や封入体膜を安定化させるために、感染細胞のアクチンを修飾することも知られている。一方、唐辛子の辛味成分であるCapsaicinには、鎮痛作用、抗炎症作用、抗菌作用のみならず細胞の脂質代謝や炎症応答、さらにアクチンといった細胞骨格の修飾作用があることも明らかになっている。

そこで本研究では、CapsaicinがCtの発育を抑制するならば、Ctの細胞内修飾機構を紐解くモデルとなりうるのではないかと仮定し、CapsaicinがCtの細胞内増殖に与える影響について検証した。

その結果、HeLa細胞内でのCt(UW-3/CX)の増殖は、Capsaicinの添加濃度依存的に、未添加感染細胞に比べ、有意に100倍程度抑制された。100 $\mu$ g/ml添加濃度で最も強いCt発育抑制効果が認められた。また真核細胞に特異的な蛋白合成阻害剤サイクロヘキサミド添加によっても、この抑制効果は阻害できなかった。さらにCt菌数の増減を、Ct16SrRNAを標的としたリアルタイムRT-PCRによって確認したところ、その値はCapsaicin濃度100 $\mu$ g/mlにおいてコントロールに比べ有意に減少した。共焦点レーザー顕微鏡とTEM像観察では、封入体サイズの減少や封入体内の菌数の減少が認められた。一方、CapsaicinレセプターのアンタゴニストであるTRPV1やCapsaicinの添加で活性化するPPAR $\gamma$ やLXR $\alpha$ の阻害剤による処理は、CapsaicinのCt増殖抑制効果には、ほとんど影響を与えなかった。これらの結果より、CapsaicinによるCtの増殖抑制効果は、細胞内の修飾機構を介したものというよりむしろ、封入体や菌体への直接的な作用により誘導された可能性が高い。

## 18. DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析による *Neochlamydia S13* 共生アメーバのレジオネラ撃退に関わる遺伝子の探索

○ 松下 瑞江<sup>1</sup>、米田 千夏<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、三宅 正紀<sup>2</sup>、  
永井 宏樹<sup>3</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保科・病態解析、<sup>2</sup> 静岡県立大・薬・免疫微生物、

<sup>3</sup> 大阪大学微生物病研究所

クラミジアには、哺乳細胞に適応進化し性感染症や呼吸器疾患を引き起こす病原性クラミジアと、自然環境に生息するアカントアメーバ(以下アメーバ)に共生する原始クラミジアの2系統が存在する。本来アメーバにとってレジオネラは天敵であるが、原始クラミジアの一種 *Neochlamydia S13* が共生するアメーバ(S13WT アメーバ)内では、レジオネラ(*Legionella pneumophila*: Lp)が増殖できない。共生菌をリファンピシンで除菌するとこの抵抗性がなくなることから、*Neochlamydia S13* 依存的な防御機構の存在が予想され、その防御に関わる菌体エフェクター分子は、感染症の新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。一方、Lp は、アメーバなど宿主細胞に感染し生存には、IV 型分泌装置(T4ASS と T4BSS)とそのエフェクター蛋白を要求する。それ故に *Neochlamydia S13* は Lp のこれら分泌装置関連蛋白を感知しその撃退現象が惹起している可能性がある。そこでこのアメーバ内の *Neochlamydia S13* が認識する Lp 側分子と、それに呼応して発現が上昇する共生菌側責任遺伝子を DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析にて探索した。S13WT アメーバは、PYG 培地を用いて培養した。GFP を発現する 4 種類の Lp を用いた [JR32 (T4ASS<sup>+</sup>/T4BSS<sup>+</sup>/Tra<sup>-</sup>), JR32Δ (T4ASS<sup>+</sup> / T4BSS<sup>-</sup> / Tra<sup>-</sup>), Lp01 (T4ASS<sup>-</sup> / T4BSS<sup>+</sup> / Tra<sup>+</sup>), Lp02 (T4ASS<sup>-</sup> / T4BSS<sup>-</sup> / Tra<sup>+</sup>)]. これらの Lp はクロラムフェニコール添加 B-CYE 寒天培地にて培養した。アメーバに 4 種類の Lp を感染(4 時間)後、30°C で 20 時間培養した。DNA マイクロアレイは、*Neochlamydia S13* ドラフトゲノム情報 (BASK01000001- 01001342)をもとにカスタマイズした。DNA マイクロアレイ解析: DNA マイクロアレイへのハイブリダイゼーションと比較解析は北海道システムサイエンスに委託した。その結果、いずれの Lp 菌株を感染させた際にも *Neochlamydia S13* の遺伝子発現パターンは類似しており、Lp 菌株特異的に発現してくるような遺伝子は見いだせなかった。これらの結果より、S13 アメーバの Lp 撃退現象は、Lp の認識には依存しない副次的な現象である可能性が考えられた。

## 19. アメーバに共生する *Neochlamydia* S13 による宿主アメーバのアクチンの修飾について

○米田 千夏<sup>1</sup>、松尾 淳司<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、

永井 宏樹<sup>3</sup>、山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保科・病態解析、<sup>2</sup> 順大院・医・研究基盤センター、<sup>3</sup> 阪大微研

原始的なクラミジアに属する *Neochlamydia* S13 は、アcantアメーバ (以下アメーバ) に共生する偏性細胞内寄生性の難培養性細菌である。性感染症や呼吸器疾患を引き起こす病原性クラミジアと比べてゲノムサイズが約2倍程度大きく、このことは進化の過程において病原性クラミジアが宿主である哺乳動物に適応するために捨て去った機能分子を今なお保持している可能性を示唆している。また *Neochlamydia* S13 は、一度アメーバから取り出すと二度とアメーバに感染できないが、除菌アメーバが共生アメーバに比べ良く増殖することから、*Neochlamydia* S13 の共生が宿主アメーバにとって極めて大きな負担になっている可能性がある。その一方で、*Neochlamydia* S13 が共生しているアメーバでは本来天敵であるはずのレジオネラ (*Legionella pneumophila*: Lp) の感染・増殖が有意に抑制されることから (除菌アメーバではこのような現象は見られない)、このアメーバは天敵 Lp から身を守るために *Neochlamydia* S13 との共生を成立させたとも考えられる。しかしながら Lp が感染した僅かな *Neochlamydia* S13 が共生するアメーバにおいても、除菌アメーバと同様に Lp が増殖した。このことは、共生アメーバでは Lp の取り込みに何らかの異常が生じている可能性を示唆している。

そこで本研究ではその可能性を検証するために、GFP 発現 Lp や蛍光ラテックスビーズの取り込み実験を行うと共に、ファロイジン染色や RT-PCR によりアメーバアクチンの局在や発現について検討を行った。その結果、除菌アメーバに比べ共生アメーバにおいて Lp の感染、取り込み能が有意に低下していた。また RT-PCR では、アクチンの発現には差異は認められなかった。また以前に行った実験より、2D-DIGE と質量分析からは、除菌アメーバでのアクチンの発現が顕著に低下していることが既に明らかになっている。これらの結果から、このアメーバは、アクチンの重合や再構成系に何らかの障害があり、その欠陥を共生する *Neochlamydia* S13 が補っている可能性が示唆された。恐らく Lp 撃退現象は、その二次的な副産物として起こっている可能性があると考えられる。

## 20. *Chlamydia trachomatis* 低酸素培養モデルの構築

○松尾 淳司<sup>1</sup>、酒井 昂平<sup>1</sup>、山川 和也<sup>1</sup>、大久保 寅彦<sup>1</sup>、中村 眞二<sup>2</sup>、  
山口 博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・保健科学・病態解析

<sup>2</sup>順大院・医・形態解析イメージング

【目的】 偏性細胞内寄生性細菌 *Chlamydia trachomatis* は、世界中で感染者が認められる主要な性感染症起因菌である。*C. trachomatis* 感染の多くは無症候性に進行するため、無治療のまま放置されることも多い。その結果、*C. trachomatis* は上向性に卵管へと移行し、骨盤内炎症性疾患の発症に関与すると共に、卵管は繊維化に伴い閉塞し不妊の原因となる。しかしながら、*C. trachomatis* 感染に伴う卵管の繊維化に関与する因子は明らかではない。一方、低酸素状態は、組織の繊維化を誘導する重要な因子であり、また低酸素条件下では、炎症応答が修飾されることが知られている。そこで本研究では、*C. trachomatis* 感染が繊維化形成に与える影響を明らかにするために、*C. trachomatis* 低酸素培養モデルを構築し、低酸素状態における *C. trachomatis* 感染動態を検証した。

【方法】 菌株と細胞株：*C. trachomatis* D型 UW3/C<sub>x</sub>株（ATCC VR885）をヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞で2日間培養し、凍結融解後に精製したものを用いた。感染実験：*C. trachomatis* を HeLa 細胞に遠心吸着法にて感染させ、低酸素培養チャンバー（MIC-101、Billups-Rothenburg 社）を用いて、低酸素（酸素2%）ならびに通常酸素（酸素21%）条件下で2日間培養し、*C. trachomatis* 感染粒子数ならびにDNA量をモニタリングした。また通常酸素濃度では *C. trachomatis* を異常体へと誘導するインターフェロン $\gamma$ （5 ng/ml）の効果を、低酸素条件下でも検討した。

【結果と考察】 まず低酸素培養条件における酸素濃度を測定したところ、少なくとも培養開始60時間までは、低酸素濃度（1.9–2.1%）が維持されることが確認された。次に低酸素培養条件下で、*C. trachomatis* 感染粒子数を算定したところ、酸素濃度に関わらず *C. trachomatis* の増殖が認められた。その一方で、インターフェロン $\gamma$  存在下では、通常酸素濃度では *C. trachomatis* 感染粒子数が有意に減少したのに対し、低酸素条件下では、そのような効果は認められなかった。このように我々が構築した *C. trachomatis* 低酸素培養モデルは、低酸素状態を正確に再現できることが確認された。現在、構築した低酸素培養モデルを用いて、*C. trachomatis* 感染が誘導する宿主炎症応答に関する検討を進めている。〔非会員共同研究者：渡辺宜典<sup>1</sup>〕

## 21. タゾバクタム／ピペラシリン耐性大腸菌の耐性機構の解析

○鈴木 裕樹<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>1</sup>、山本 聡<sup>1</sup>、小笠原 徳子<sup>1</sup>、白石 宗<sup>1</sup>、  
品川 雅明<sup>2</sup>、高橋 聡<sup>3</sup>、横田 伸一<sup>1</sup>

札幌医大・<sup>1</sup>医学部・微生物学、<sup>2</sup>附属病院検査部、

<sup>3</sup>医学部・感染制御・臨床検査医学

ピペラシリン (PIP) は緑膿菌を含むグラム陰性桿菌に対して抗菌活性を示す。しかし、近年では基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌などの出現により、PIP 耐性株が増加している。これに対して PIP に  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤であるタゾバクタム (TAZ) を配合したタゾバクタム／ピペラシリン (TZP) が  $\beta$ -ラクタマーゼを有する菌に対して使用され、大腸菌では 95%以上が感受性を示している。

我々は大腸菌臨床分離株 513 株の TZP 感受性を調査したところ、TZP に耐性を示す株を 5 株認めた。これら TZP 耐性株は、感受性株と比較して耐性株に特有の  $\beta$ -ラクタマーゼは認められなかった。本研究では、なぜこのように同じ  $\beta$ -ラクタマーゼを有するにもかかわらず、TZP に耐性を示す株が存在するのかに注目し、TZP 耐性機構の解析を行った。今回は菌株間で増殖の違いが TZP 耐性に影響がないかを調査した。また抗菌薬などの取り込みに関与するポーリン (OmpF, OmpC)、 $\beta$ -ラクタマーゼ、薬剤排出ポンプの AcrAB の発現について解析した。

TZP 感受性株及び耐性株で増殖を比較したが大きな違いはなく、TZP 耐性には菌株間での増殖の違いによる影響はなかった。また TZP 感受性株及び耐性株の両間において OmpF, OmpC の発現量と  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の発現量に差は認められなかった。AcrAB の発現量は TZP 耐性株 2 株で高く、これら 2 株の *acrAB* を欠損させたところ、ともに TZP の耐性度が 8 倍以上減少し、TAZ に対して 4 倍感受性が増加した。また DH5  $\alpha$  株の *acrAB* 欠損株では PIP と TAZ それぞれの感受性が増加した。このことから、AcrAB の高発現が TZP 耐性をもたらすと考えられた。

## 22. 北海道大学病院にて分離されたニューデリー・メタロベータラクタマーゼ NDM-5 産生大腸菌の性状解析

○大久保 寅彦、松尾 淳司、山口 博之

北大院・保健科学・病態解析

【目的】ニューデリー・メタロベータラクタマーゼ(NDM)はカルバペネム系を含むほぼ全てのβラクタム系抗菌薬を分解する酵素であり、NDM-1からNDM-14までのバリエーションが報告されている。NDM産生菌はその耐性スペクトルの広さから『最も警戒すべき薬剤耐性菌』として知られており、国内でも海外渡航歴のある患者から散発的に分離されている。今回、NDM-5産生大腸菌が道内で分離されたため、その性状について解析を行なった。

【材料・方法】被検株は北海道大学病院の細菌検査室において分離された、海外渡航歴のある20代女性の糞便由来の大腸菌1株(strain 9/III)である。最小発育阻止濃度測定は寒天平板希釈法で行なった。PCRによりNDM産生遺伝子(*bla<sub>NDM</sub>*)およびその他の抗菌薬耐性遺伝子を検出し、*bla<sub>NDM</sub>*についてはシーケンス解析でバリエーションを決定した。染色体上のキノロン耐性決定領域(QRDR)についてもシーケンス解析を行なった。また、被検株の病原性を検討するため、O抗原型別と系統発生分類を行なうとともに、MLSTにより被検株のST型を決定した。接合伝達試験は大腸菌ML4909を受容株としてブロスメイティング法で実施し、得られた伝達株と被検株で性状を比較した。

【結果・考察】被検株はセフトキシム、セフトジジム、イミペネムなどのβラクタム系抗菌薬に耐性だった他、テトラサイクリン、シプロフロキサシンにも耐性を示した。一方、NDM産生菌に対する切り札的抗菌薬であるコリスチン、チゲサイクリンには感受性だった。被検株は*bla<sub>NDM-5</sub>*を保有していたほか、*bla<sub>CTX-M-15</sub>*と*tetA*も検出された。QRDRには*gyrA*, *parC*, *parE*に遺伝子変異があった。O抗原型は決定できず、系統発生型もA<sub>1</sub>型(腸管内常在型)だったため、被検菌は非病原性大腸菌だと推察された。MLST型別ではST410と判定された。接合伝達試験では、 $1.47 \pm 1.58 \times 10^{-4}$ の頻度で*bla<sub>NDM-5</sub>*が伝達した。被検株は2本のプラスミドを保有しており、*bla<sub>NDM-5</sub>*伝達株にはそのうち1本が伝達していたが、*bla<sub>CTX-M-15</sub>*や*tetA*は伝達していなかった。NDM産生大腸菌の脅威は世界的に懸念されている問題であり、本例のように海外渡航者が持ち込むケースが今後も予想されることから、引き続き動向を注視していく必要がある。

【会員外協力者】 大原佑季子(北大・医・保健)、早坂かすみ、秋沢宏次、澁谷 斉、加畑 馨、清水 力(北海道大学病院 検査・輸血部)

## 23. *Actinobacillus pleuropneumoniae* のキノロン耐性決定領域におけるアミノ酸変異

○井澤 将規、真能 敬弘、村田 亮、菊池 直哉

酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット

【背景・目的】豚胸膜肺炎は、世界各地の養豚現場に大きな経済的損失を与えているブタの呼吸器感染症である。本感染症の原因菌である *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*) は、既にキノロン系抗菌薬に対する耐性を獲得しつつある。我々はこれまでに、国内分離 *App* 株の中に、アミノ酸残基変異を伴うフルオロキノロン耐性株が含まれていることを明らかにした。そこで本研究では、*App* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) のアミノ酸残基変異部位の特定、耐性値との相関、および変異蓄積の順序を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】国内分離 *App* 株 5 株 (血清型 1、2、5 型各 1 株、*gyrA* に変異を示す血清型 1 型株、*gyrA* と *parC* に変異を示す血清型 1 型株) と基準株 (ATCC 27088<sup>T</sup>) の計 6 株について、エンロフロキサシン、オルビフロキサシンの MIC 値を測定した。また、耐性値上昇試験は毎回 MIC 値を測定しながら 30 継代、抗菌薬の入った培地のみで 30 継代の計 60 継代行い、これら継代株について QRDR (*gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE*) に変異が生じているかどうかを確認した。変異の確認された *App* 株については、増殖率や他の抗菌薬への感受性の変化を調べた。また、プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子保有の有無についても確認した。

【結果・考察】オルビフロキサシンの耐性値上昇試験の結果、*gyrA* に 1 箇所塩基変異を示す株が 1 株、*gyrA*、*parC* に 1 箇所ずつ変異を示す株が 1 株、*gyrA*、*gyrB*、*parC* にそれぞれ 1 箇所ずつ変異を示す株が 1 株生じた。*gyrA* の変異はアミノ酸残基部位 83、87 に生じていた。他の 3 株は、MIC 値は上昇したものの新たな変異はなかった。変異前後の株で増殖率を比較したところ、変異後の株では増殖率が著しく低くなっていた。また、変異後の株では多剤耐性傾向にあることがわかった。プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子は、すべての株で検出されなかった。

本研究での *gyrA*、*parC* における変異部位は、大腸菌やパスツレラ属菌で報告されている変異部位と一致したことから、*App* においてもこれらのアミノ酸残基変異が耐性獲得に関与していると考えられる。しかし、アミノ酸の変異数が多ければ MIC 値の上昇が見られるものの、新たな変異が生じることなく MIC 値が上昇している株もあり、変異数と MIC 値が一概に相関関係にあるとは言えない。耐性値上昇が QRDR の変異以外の要因 (排出系の活性化など) によって起こる可能性もあるため、今後も検討の必要がある。

## 24. 牛及び食肉由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)の特徴とヒトへの影響

○佐藤 友美<sup>1</sup>、白井 優<sup>1</sup>、小西 典子<sup>2</sup>、甲斐 明美<sup>1</sup>、田村 豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農大・獣医・食品衛生 <sup>2</sup>東京・健安研

### 【背景】

MRSAは院内感染の原因菌として医療上、重要である。海外では家畜からMRSAが高率に分離され、食肉を介したヒトへの伝播が懸念されている。今回、わが国の家畜と食肉由来MRSAの関連を明らかにするため、分子疫学的特徴を比較した。

### 【材料・方法】

東日本の乳房炎牛由来7株、近畿地方と東京で流通していた食肉由来8株の計15株のMRSAについて、SCC*mec*型別、MLST、*spa* typing、*pvl* 遺伝子、エンテロトキシン(SEs)遺伝子、TSST-1 遺伝子および表層タンパクであるCWASP/J 遺伝子の検索、11薬剤に対する薬剤感受性試験、PFGE解析を実施した。

### 【結果】

牛由来7株・食肉由来株2株がST8/t1767/SCC*mec*IV1に分類され、*sec, sel, tet*とCWASP/Jを保有し、これら9株はβラクタム系抗菌薬(100%)及びアミノグリコシド系抗菌薬(92%)に耐性を示した。PFGE解析の結果、牛由来1株と食肉由来3株で100%の相同性を示した。また、食肉由来8株中7株がSEs遺伝子を保有し、1株は食中毒と強く関連する*sea*を保有していた。台湾産冷凍鴨肉由来MRSAはST573/t3523に分類された。

### 【考察】

牛および食肉由来株に関連が認められたことから、家畜由来MRSAが食肉を介してヒトへ伝播する可能性がある。今回、多く認められたST8-MRSAは世界的に流行するUSA300とは異なり、国内で近年増加している市中感染型MRSA“Japanese clone”の特徴を示した。台湾産冷凍鴨肉由来から分離されたST573MRSAは、台湾などアジアで分離報告があるが国内での報告はないため、国内での汚染ではなく、海外から持ち込まれたものと推定された。食肉は、国内の家畜由来・市中感染型MRSAだけでなく海外由来株の伝播媒体となり、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性がある。

## 25. 日本における大腸菌のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*)保有状況とヒト医療に与える影響

○福田 昭<sup>1</sup>、佐藤 豊孝<sup>2</sup>、鈴木 裕樹<sup>2</sup>、臼井 優<sup>1</sup>、浅井 鉄夫<sup>3</sup>、  
横田 伸一<sup>2</sup>、田村 豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農大 獣医・食品衛生、<sup>2</sup>札医大 医・微生物、<sup>3</sup>岐阜大院連獣

### 【目的】

2015年11月に中国でプラスミド性コリスチン(CL)耐性遺伝子(*mcr-1*)が報告され、その後、日本を含む世界各国で存在が確認された。現在、CLは、ヒト医療において多剤耐性グラム陰性感染症菌に対する最終選択薬として使用されている。一方、獣医療においては、飼料添加物や抗菌剤として長年使用されており、ヒト医療への影響が懸念されている。そこで、日本における大腸菌の *mcr-1* 保有状況を調査した。また、CLを用いた治療への影響を明らかにするため、多剤耐性グラム陰性菌への接合伝達試験を行った。

### 【材料・方法】

2008-2015年に分離された大腸菌1384株(離乳後下痢症豚:600株、成豚:42株、和牛:38株、乳牛:65株、ハエ:125株、ヒト:514株)を用い、*mcr-1* 遺伝子の検出とCLの薬剤感受性試験を行った。*mcr-1* 保有株を用い、実験室保存株大腸菌とヒト由来緑膿菌・*Acinetobacter baumannii* への接合伝達試験(broth/filter mating)を行い、*mcr-1* 伝達株のCL感受性を測定した。

### 【結果】

1384株中2012-2013年に分離された174株(離乳後下痢症豚:171株、成豚:1株、和牛:1株、ハエ:1株)から *mcr-1* が検出されたが、ヒト由来株からは検出されなかった。*mcr-1* 保有株では、CLのMICは4  $\mu$ g/ml以上を示した。Broth matingにより大腸菌へ $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ の頻度で *mcr-1* が伝達し、CLのMICは3-4管上昇した。Broth matingに加え、filter matingを行ったが、多剤耐性株を含む緑膿菌・*A. baumannii* への伝達は確認されなかった。

### 【考察】

日本全国で分離された家畜由来大腸菌から *mcr-1* が検出された。*mcr-1* はCLに対する感受性を低下させるが、現在多剤耐性化が問題となっている緑膿菌と *A. baumannii* への伝達は確認されず、ヒト医療への影響は少ないと考えられる。

## 協賛一覧

株式会社 ヤクルト

医療法人 馨心会 よつば歯科

**Meiji Seika** ファルマ株式会社

株式会社 ホクドー

アステラス製薬株式会社

株式会社 ムトウ

**OM** リサーチ&コンサルティング株式会社

株式会社 モリタ

高信化学株式会社

# 続ける理由が、ありすぎる。

乳酸菌 シロタ株が400億個

※1本80ml 当たり

生きて腸にとどく

良い菌を増やす

悪い菌を減らす

腸内環境を改善する

おなかの調子を整える

特定保健用食品



ヤクルト400に比べ  
甘さひかえめ  
カロリー  
30%カット

## ヤクルト400

【許可表示】生きてまま腸内に到達する乳酸菌シロタ株 (L. カゼイ YIT 9029) の働きで、良い菌を増やし悪い菌を減らして、腸内の環境を改善し、おなかの調子を整えます。

○1日当たりの摂取目安量：1本

○食生活は、主食、主菜、副菜を基本に、食事のバランスを。

ヤクルト400/ヤクルト400LTはヤクルトレディがお届けしています。



人も地球も健康に  
**Yakult**

ヤクルトお客さま  
相談センター



0120-11-8960

シロタ株

検索

医療法人 馨心会

# よつば歯科クリニック

院長 木浦 和人

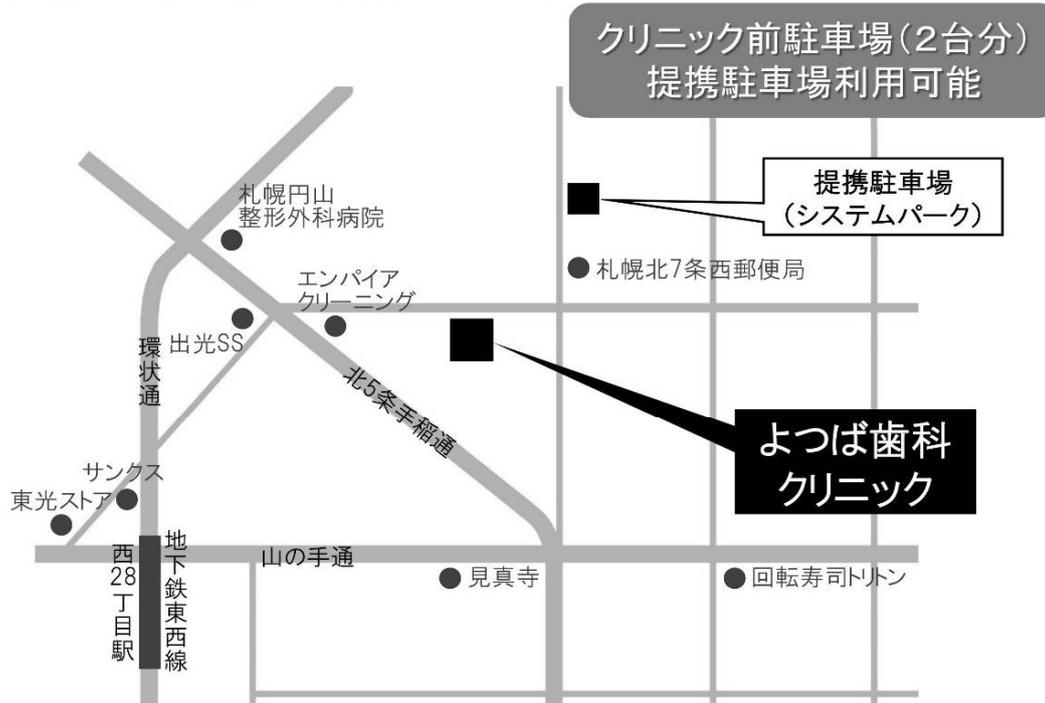
診療科目 歯科・小児歯科

火水木金土は

夜9時まで  
診療

診療時間	月	火	水	木	金	土	日・祝日
10:00~13:30	休	●	●	●	●	●	●
15:00~19:00	診	●	●	●	●	●	●
19:00~21:00	日	●	●	●	●	●	×

※最終受付は終了時間の30分前までとなります。



札幌市中央区北6条西25丁目3-8 山下ビル2階

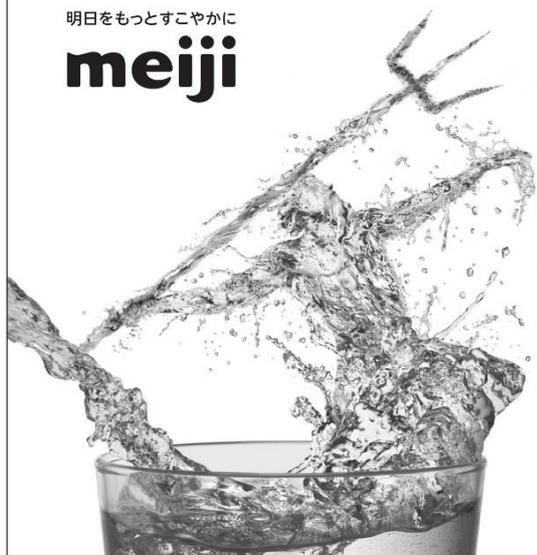


011-611-6918

<http://yotsuba-dental.net>

明日をもっとすこやかに

meiji



経口用カルバペネム系抗生物質製剤 薬価基準収載

テビペネムピボキシル細粒

**オラペネム<sup>®</sup>小児用細粒10%**

ORAPENEM<sup>®</sup> FINE GRANULES 10% FOR PEDIATRIC

略号 TBPM-PI

製造販売元

Meiji Seika ファルマ株式会社

東京都中央区京橋 2 - 4 - 16

<http://www.meiji-seika-pharma.co.jp/>

まだないくすりを  
創るしごと。

世界には、まだ治せない病気があります。

世界には、まだ治せない病気とたたかう人たちがいます。

明日を変える一錠を創る。

アステラスの、しごとです。



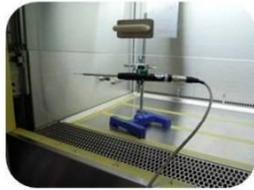
[www.astellas.com/jp/](http://www.astellas.com/jp/)

明日は変えられる。

 **astellas**  
Leading Light for Life  
アステラス製薬

**安全キャビネット（ハイザート対策用クラスIIキャビネット）  
の定期検査を実施していますか？**

定期検査により性能が保障されます



安全キャビネットの性能が維持されているかどうかは、目で見ただけでは分かりません。

JIS規格に基づいた定期検査を実施することにより、安全キャビネットの性能維持を確認し、作業者の安全およびコンタミネーションの防止を確保することができます。

**安全キャビネット定期検査  
各メーカー不問！**

同時作業 2 台目以降  
割引いたします！

**1台280,000円(税抜)~**

<作業内容>

○ホルムアルデヒドガス殺菌

○性能検査

(風速・フィルタ透過率・気流方向等)

※HEPA フィルタ、部品交換が必要な場合は別途見積いたします。

お問い合わせ いのちをつなぐ、夢をつなぐ

**Hokudo ホクドー**

本社 〒063-0849 札幌市西区八軒9条西10丁目4番28号  
衛生課 TEL 011(641)7507 FAX 011(644)9209  
E-mail:sale@hokudo.co.jp http://www.hokudo.co.jp



**WISM 21は、21世紀の医療をトータルでサポートし、  
お客様のニーズと共に成長するシステムです。**

病院の近代化が進むなか、取り巻く環境が厳しさを増しつつある医療施設において、WISM21は医療の変化に対応すべく、お客様のためにご用意させていただいた医療総合支援システムです。必要な時に必要なシステムを選び、ご利用ください。

- 医療・理化学機器の販売・アフターフォロー
- 最新医療情報の提供
- 医療機器の設置・メンテナンス・保守契約
- 学会イベントの企画・運営
- 旅行・広告代理
- 情報システムの提案・開発
- 経営分析・診断・改善
- 資金計画・償還計画・物件調査及び建築
- 大型プロジェクトコンサルティンク
- SPD SPDシステム
- 在宅医療・福祉
- 通信販売
- 貿易

総合医療機器商社

**WISM 株式会社 ムトウ**

取扱品目 医療機器・理化学機器・ME機器・病院設備  
放射線機器・メディカルコンピューター・貿易業務・歯科機器  
福祉機器・介護用品

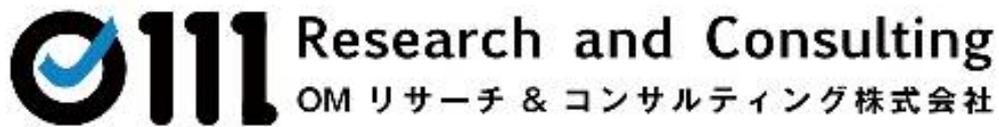
- 札幌本社(北海道事業本部) / 〒001-0011 札幌市北区北11条西4丁目1番15号  
TEL 011-746-5111
- 東京本社(東京事業本部) / 〒110-8681 東京都台東区入谷1丁目19番2号  
TEL 03-3874-7141
- 名古屋支社(名古屋事業本部) / 〒465-0014 名古屋市名東区上管2丁目1108番地  
TEL 052-799-3011
- 大阪支社(大阪事業本部) / 〒537-0002 大阪市東成区深江南2丁目13番20号  
TEL 06-6974-0550
- 福岡支社(福岡事業本部) / 〒812-0044 福岡市博多区千代4丁目29番27号  
TEL 092-641-8161

支店 / 札幌中央・札幌西・札幌白雲・新札幌・旭川・函館・釧路・帯広・北見・遠紋・八雲・室蘭・苫小牧・日高・小樽・千歳・岩見沢・空知・名士・稚内・秋田・仙台・いわき・群馬・栃木・日立  
水戸・茨城・熊谷・埼玉東・埼玉・埼玉中央・所沢・東京西・本郷・城北・城西・城南・城東・多摩・多摩西・武蔵野・練馬・柏・千葉西・千葉・鴨川・神奈川・横浜・横浜南・横浜市大前・川崎  
川崎北・相模・名古屋南・伊勢志摩・北大阪・南大阪・西大阪・奈良・広島・鳥取・小倉・飯塚・筑豊・大川・久留米・佐賀・大牟田・唐津

営業所 / 青森・島根  
出張所 / 鹿島



http://www.wism-mutou.co.jp/



〒060-0033 札幌市中央区北 3 条東 2 丁目 2-22 ひがしビル 3 階

TEL : 011-252-1717 FAX : 011-252-1718 <http://www.omrc.co.jp/>

**【食品衛生コンサルティング会社として先端の技術を提供します！！】**

リアルタイム PCR による便中ノロウイルス検査

新規遺伝子型ノロウイルス GII. 17 の検出

PCR による便中の全ての腸管出血性大腸菌タイプの検出

H A C C P 認証取得コンサルティング

食品製造施設（工場・大量調理施設・飲食店）の衛生指導