

# 第 82 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 27 年 9 月 5 日土曜日

会場 北海道医療大学心理科学部講義室 4-5 (4 F)  
(北海道医療大学あいの里キャンパス内)  
〒002-8072 札幌市北区あいの里 2 条 5 丁目

総会長 中澤 太 北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野 教授

事務局 〒061-0293 石狩郡当別町金沢 1757  
北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野  
第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会事務局  
Tel: 0133-23-1385 (直通)  
Fax: 0133-23-1385  
Email: [bisei@hoku-iryu-u.ac.jp](mailto:bisei@hoku-iryu-u.ac.jp)

# 目次

プログラム概要	2
会場案内	3
JR 時刻表	5
会場周辺の昼食ガイドマップと懇親会会場案内図	6
参加者へのご案内	7
第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会プログラム	8
特別講演	14
ランチオンセミナー	16
一般演題抄録	18

# プログラム概要

8:55	開会の辞
9:00~11:03	午前の部 一般講演
11:10~11:40	評議員会・幹事会
11:50~12:30	ランチョンセミナー
12:40~15:34	午後の部 一般講演
15:50~16:20	総会
16:25~17:25	特別講演
17:30~17:40	表彰式と閉会の辞
17:50~19:50	懇親会

# 会場案内

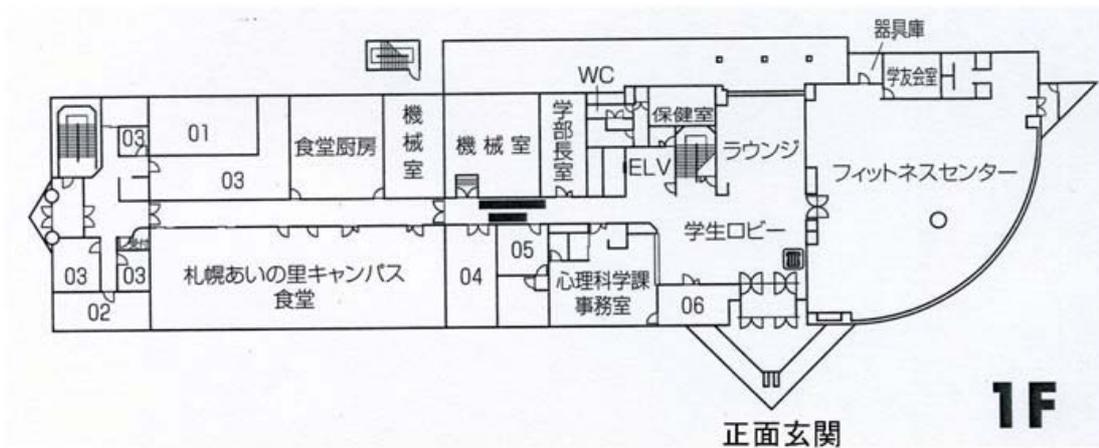


## アクセス

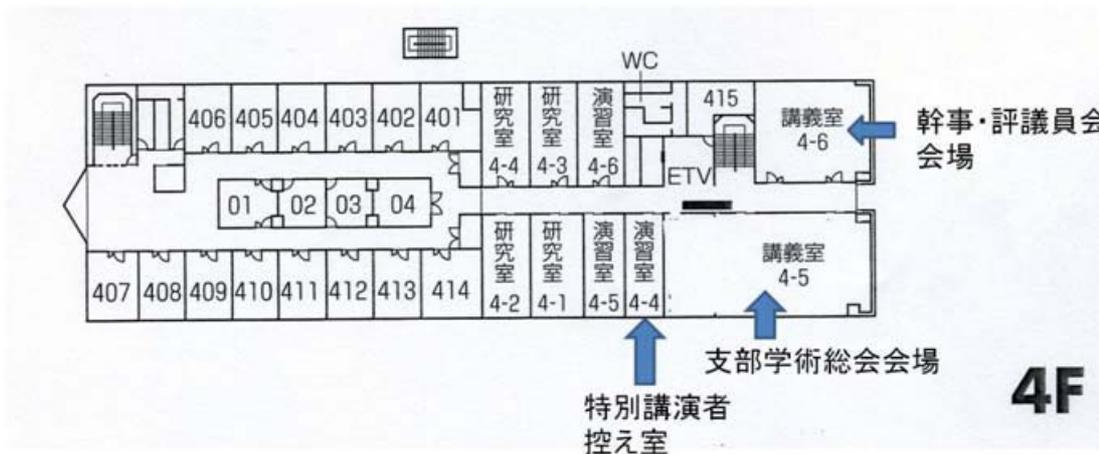
### 札幌駅から

- ・ JR 学園都市線 『あいの里教育大駅』 (25 分) 下車、徒歩 5 分  
(あいの里公園行、石狩当別行、または北海道医療大学行のいずれか)
- ・ 地下鉄南北線 『麻生』下車、中央バスあいの里教育大線麻 24 番  
『あいの里 2 条 5 丁目』 (30 分) 下車、徒歩 1 分
- ・ 地下鉄東豊線 『栄町駅』下車、中央バス栄町教育大線栄 20 番、23 番  
『あいの里教育大駅』 (20 分) 下車、徒歩 5 分

# 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会会場案内図



北海道医療大学心理科学部 1F 正面玄関から入り左前方のエレベーター(ELV)にて 4F までお上がりください。



4F にてエレベーターを降りますと、学会会場および幹事・評議員会会場があります。

# J R 学園都市線時刻表

下り		上り	
札幌駅発	あいの里教育大駅着	あいの里教育大駅発	札幌駅着
8:02	8:27	12:03	12:32
8:14	8:38	12:31	12:55
8:29	8:53	12:50	13:14
8:55	9:23	13:03	13:33
9:28	9:52	13:30	13:55
9:55	10:21	13:51	14:15
10:20	10:43	14:03	14:33
10:40	11:04	14:34	14:58
11:00	11:23	14:50	15:14
11:20	11:43	15:19	15:47
11:40	12:03	15:42	16:06
12:00	12:23	16:02	16:27
12:20	12:43	16:14	16:38
12:40	13:03	16:32	16:55
13:00	13:23	16:47	17:13
13:20	13:43	17:07	17:36
13:40	14:03	17:25	17:52
14:00	14:23	17:39	18:07
14:20	14:43	17:56	18:21
14:40	15:03	18:11	18:36
15:00	15:25	18:27	18:52
15:20	15:43	18:41	19:07
15:40	16:03	18:57	19:22
16:00	16:23	19:12	19:36
16:20	16:48	19:28	19:52
16:40	17:07	19:57	20:22
17:00	17:25	20:27	20:52
17:15	17:39	20:44	21:13
17:30	17:55	21:27	21:53
17:45	18:11	21:46	22:11
18:00	18:28		

# 会場周辺の昼食ガイドマップと懇親会会場案内図



## 昼食ガイドマップ

- ① パールフィオーレ (ランチ)
- ② ヒマラヤ (カレー専門店)
- ③ マクドナルド
- ④ 手風琴 (ランチ)
- ⑤ 東光ストアあいの里店内  
サブウェイ (パン)、魚一心 (回転寿司)、サザエ (おにぎり等)、  
ノア (パン)、Fruitcake factory (パン、ケーキ)
- ⑥ セイコーマート
- ⑦ ローソン

## 懇親会会場

⑤東光ストアあいの里店 2F 『いろはにほへと あいの里店』

札幌市北区あいの里1条5目 東光ストアあいの里店 2F  
電話 011-770-5546

# 参加者へのご案内

【重要】今回は冊子版の抄録集は作成いたしません。PDF版をダウンロードされるか、印刷されるかしてご利用くださいますようお願い申し上げます。

## 1. 参加受付

受付時間： 9月5日（土） 8:30~

受付場所： 北海道医療大学心理科学部 4F 4-5 講義室前

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。

懇親会にご参加される方は、当日受付で、懇親会費 3,000 円（予定）をお願い致します。

## 2. 一般演題

座長の先生へ

発表時間は、発表 8 分、質疑 2 分です。時間厳守をお願い致します。

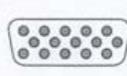
演者の先生へ

発表時間は、発表 8 分、質疑 2 分です。

講演の発表は全てノートパソコンによるプレゼンテーションをお願い致します。発表の方は、ご自身のノートパソコンをご持参いただき、発表をお願い致します。

ご自身の PC 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、Macintosh 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。一部のノートパソコンではコネクタが必要な場合があります。必ずご持参ください。



電源アダプターもご持参ください。

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、バックアップデータ(USB 等)をお持ちください。

## 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、一般演題より最優秀発表者（1 名）と優秀発表者（2 名）の表彰を行います。対象は、学生、ポスドク、助教となります。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対象演題一覧を記載しておりますので、一般演題終了後、投票用紙に評価結果をご記入頂き、会場の投票箱に投函ください。

# 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会プログラム

8:55~ 開会の辞

一般演題 セッション 1 座長 白石 宗 (札幌医科大学 医学部)

9:00~9:10

1. わが国の酪農場におけるバルク乳からのレプトスピラ遺伝子の検出

○芦澤春香、小西なつこ、村田亮、中野良宣、菊池直哉

酪農学園大学 獣医学群 獣医細菌学ユニット

9:12~9:22

2. 北海道に生息するアライグマから分離されたレプトスピラの遺伝学的解析

○橋場和野、高崎真理枝、吉織綾子、村田亮、中野良宣、菊池直哉

酪農学園大学 獣医学群 獣医細菌学ユニット

9:24~9:34

3. レプトスピラ血清型 Hardjo 感染が牛の繁殖成績へ与える影響およびレプトスピラ不活化ワクチンの有効性について

○鎌口綾華<sup>1</sup>、山川和宏<sup>2</sup>、安富一郎<sup>2</sup>、村田亮<sup>1</sup>、中野良宣<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>ゆうべつ牛群管理サービス

9:36~9:46

4. マイコプラズマ性乳房炎罹患牛の病理学的および微生物学的解明

○山本 剛史<sup>1</sup>、根布 貴則<sup>1</sup>、権平 智<sup>1</sup>、岩野 英知<sup>2</sup>、松田 一哉<sup>3</sup>、小岩 政照<sup>4</sup>、樋口 豪紀<sup>1</sup>、永幡 肇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医衛生学ユニット

<sup>2</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医生化学ユニット

<sup>3</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医病理学ユニット

<sup>4</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・生産動物内科学

9:48~9:58

5. MALDI-TOF MS を用いた *Mannheimia haemolytica* の遺伝子型解析

○井上正亮、村田亮、中野良宣、菊池直哉

酪農学園大学 獣医学群 獣医細菌学ユニット

一般演題 セッション2 座長 松尾淳司 (北大 大学院 保健科学研究所)

10:05~10:15

6. ピロリ菌感染経路解析法としての multilocus sequence typing (MLST) の有用性

○横田伸一<sup>1</sup>、今野武津子<sup>2</sup>、藤原伸一<sup>2</sup>、戸板成昭<sup>2</sup>、高橋美智子<sup>2</sup>、  
山本聡<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、佐藤豊孝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>札幌医科大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>札幌厚生病院小児科

10:17~10:27

7. 抗菌薬処理による緑膿菌菌体から遊離するリポ多糖量の変化

○袴田浩<sup>1</sup>、山本聡<sup>1</sup>、佐藤豊孝<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、北川学<sup>2</sup>、宮本篤<sup>2</sup>、  
横田伸一<sup>1</sup>

札幌医科大学医学部 <sup>1</sup>微生物学講座, <sup>2</sup>医療薬学講座

10:29~10:39

8. 鶏舎環境での薬剤耐性菌の伝播及び維持におけるハエの役割

○福田 昭<sup>1</sup>、岡村 雅史<sup>2</sup>、臼井 優<sup>1</sup>、胡 東良<sup>2</sup>、田村 豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット、<sup>2</sup>北里大学獣医学部人獣共通感染症学  
研究室

10:41~10:51

9. イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較

○臼井優<sup>1</sup>、鈴木要人<sup>1</sup>、岡健太郎<sup>2</sup>、高橋志達<sup>2,3</sup>、稲松孝思<sup>4</sup>、神谷茂<sup>3</sup>、田村豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット、<sup>2</sup>ミヤリサン製薬株式会社

<sup>3</sup>杏林大学医学部感染症学講座、<sup>4</sup>東京都健康長寿医療センター

10:53~11:03

10. チゲサイクリン非感受性大腸菌はフルオロキノロン耐性株に多く認められる

○佐藤豊孝<sup>1</sup>、鈴木裕樹<sup>1</sup>、大越康雄<sup>1</sup>、山本聡<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、  
田村豊<sup>2</sup>、横田伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>札幌医大・医学部・微生物学、<sup>2</sup>酪農大・獣医・食品衛生学

11:10~11:40 評議委員会、幹事会

11:50~12:30 ランチョンセミナー 座長 横田伸一 (札幌医科大学 医学部)  
演者 佐藤寿夫 先生  
(株) 日本微生物研究所  
演題 『 腸管出血性大腸菌健康保菌の実態 』

12:30~12:40 休憩

一般演題 セッション3 座長 臼井 優 (酪農学園大学 獣医学群)

12:40~12:50

11. *Streptococcus sanguinis* によるマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおける  
IL-1 $\alpha$ 産生誘導活性

○佐伯 歩<sup>1</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、亀崎 良助<sup>1</sup>、中澤 太<sup>2</sup>、鈴木 敏彦<sup>3</sup>、  
柴田 健一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大・歯・口腔分子微生物, <sup>2</sup>北海道医療大・歯・微生物, <sup>3</sup>東京医科歯科大・歯・  
細菌感染制御学

12:52~13:02

12. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* によるインフラマソームの活性化

○亀崎 良助<sup>1,2</sup>、佐伯 歩<sup>1</sup>、阿部 亜美<sup>3</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、北川 善政<sup>2</sup>、  
鈴木 敏彦<sup>4</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病態学講座口腔分子微生物学教室

<sup>2</sup>北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室

<sup>3</sup>福岡歯科大学 成長発達歯学講座 成育小児歯科学分野

<sup>4</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

13:04~13:14

13. 繊毛虫との共培養で大腸菌から漏れ出すクオラムセンシング分子 autoinducer-2  
について

○大久保寅彦<sup>1</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、山崎智弘<sup>1</sup>、花輪智子<sup>2</sup>、中村眞二<sup>3</sup>、神谷 茂<sup>2</sup>、  
山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学保健科学研究院病態解析学分野、<sup>2</sup>杏林大学医学部感染症学教室、

<sup>3</sup>順天堂大学大学院医学研究科形態解析イメージング研究室

13:16~13:26

14. 豚由来 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 株の遺伝子学的解析

○村田亮、大田真理、中野良宣、菊池直哉

酪農学園大学 獣医学群 獣医細菌学ユニット

13:28~13:38

15. *Salmonella* Typhimurium DT104 が産生する ArtAB の RAW264.7 細胞に対する細胞内 cAMP 濃度上昇活性

○玉村 雪乃<sup>1</sup>、田中 聖<sup>1</sup>、内田 郁夫<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>動衛研北海道支所、<sup>2</sup>動衛研、<sup>3</sup>岐阜大院連獣

一般演題 セッション4 座長 村田 亮 (酪農学園大学 獣医学群)

13:45~13:55

16. 原始クラミジア *Parachlamydia acanthamoebae* Bn<sub>9</sub> の低温条件下におけるヒト上皮系細胞 HEP-内での増殖について

○瀧圭介<sup>1</sup>、山根千夏世<sup>1</sup>、山崎智拓<sup>1,2</sup>、中村眞二<sup>3</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>北海道大学大学院 保健科学研究院、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC1、

<sup>3</sup>順天堂大学医学部形態解析イメージング

13:57~14:07

17. *Chlamydia trachomatis* 男性生殖器分離株における多型性外膜タンパク F (PmpF) の系統学的な特徴

○山川和也<sup>1</sup>、山崎智拓<sup>1,2</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>北海道大学大学院 保健科学研究院、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC

14:09~14:19

18. GFP 発現 *Chlamydia trachomatis* 変異株の確立

○山崎智拓<sup>1,2</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、大久保寅彦<sup>1</sup>、中村眞二<sup>3</sup>、山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院・保健科学研究院・病態解析学分野、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC、<sup>3</sup>順天堂大学・医学部・形態解析イメージング研究部門

14:21~14:31

19. 院内環境から株化したアメーバ共生原始クラミジアのヒト株化細胞への二次感染能と炎症誘導能について

○松尾淳司<sup>1</sup>、中村眞二<sup>2</sup>、大久保寅彦<sup>1</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> 順天院・医・形態解析イメージング

14:33~14:43

20. 原始クラミジア *Neochlamydia* S13 が共生するアメーバはレジオネラを撃退する：トランスクリプトーム解析による責任遺伝子の探索

○米田千夏<sup>1</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、山崎智祐<sup>1,2</sup>、大久保寅彦<sup>1</sup>、中村眞二<sup>3</sup>、永井宏樹<sup>4</sup>、山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保科・病態解析、<sup>2</sup> 日本学術振興会特別研究員 DC1、

<sup>3</sup> 順大院・医・研究基盤センター、<sup>4</sup> 阪大微研

14:45~14:55

21. 北海道内で臨床より分離された *Aspergillus fumigatus* の抗真菌薬感受性評価

○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

一般演題 セッション5 座長 長谷部 晃 (北大 大学院 歯学研究科)

15:00~15:10

22. Detection of *pncA* gene mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar

○Nan Aye Thida Oo, Lai Lai San, Chie NAKAJIMA, Yasuhiko SUZUKI

Lab. Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

15:12~15:22

23. MIRU-VNTR Typing of Beijing MDR-TB strains from Myanmar

○Lai Lai San, Nan Aye Thida Oo, Chie NAKAJIMA, Yasuhiko SUZUKI

Div. Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University.

15:24~15:34

24. Investigation of *Leptospira* infection and its circulation in one intensive-type water buffalo farm in the Philippines: its economic and zoonotic implications

○Marvin A. Villanueva<sup>1</sup>, Claro N. Mingala<sup>2</sup>, Nina G. Gloriani<sup>3</sup>, Nobuo Koizumi<sup>4</sup>, Yasutake Yanagihara<sup>5</sup>, Chie Nakajima<sup>1</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Animal Health Unit, Philippine Carabao Center, Muñoz, Nueva Ecija, Philippines

<sup>3</sup>Department of Medical Microbiology, College of Public Health, University of the Philippines–Manila, Manila, Philippines

<sup>4</sup>Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

15:34~15:45

休憩

15:50~16:20

総会

16:25~17:25

特別講演 座長 中澤 太 (北海道医療大学 歯学部)

演者 光山正雄 先生

京都大学名誉教授

京都大学大学院総合生存学館 特定教授

演題 『 細胞内寄生菌研究 37年間から学んだもの 』

17:30~17:40

表彰式と閉会の辞

17:50~19:50

懇親会

# 特 別 講 演

9月5日（土）

16:25~17:25

演者 光山正雄 先生

京都大学名誉教授

京都大学大学院総合生存学館（思修館）副館長・専任特定教授

（併任）京都大学白眉センター センター長

（併任）京都大学次世代研究創成ユニット ユニット長

演題 『 細胞内寄生菌研究37年間から学んだもの 』

# 細胞内寄生菌研究 37 年間から学んだもの

光山正雄（京都大学名誉教授、大学院総合生存学館(思修館)特定教授）

昭和 48 年に九州大学医学部を卒業し、内科臨床医として 3 年間の臨床経験を重ねた後、感染の機構への興味から一時的に九大細菌学で研究に従事する機会を得たが、結局臨床に戻らぬまま、2 年半前の京大医学部定年退職までの 37 年間で大学医学部の研究室で過ごしてきた。

その間、九大、ハーバード大、新潟大、京大と、所在もカラーも異なる医学部で研究教育に従事したが、幾つかの研究テーマのなかで最も中心的課題とし最後まで目指したのが、リステリア *Listeria monocytogenes* の病原因子と感染宿主免疫応答の相互関係の解明であった。

振り返ってみれば、それぞれの時代に応じて、まるごと動物（近交系マウス）への感染実験、感染マウス脾臓における T 細胞応答、in vitro でのマクロファージへの感染実験、菌の病原因子リステリオリシン O (LLO) のカラム精製、LLO 刺激に対するマクロファージのサイトカイン応答、LLO の変異リコンビナントタンパク質作製、LLO 変異菌株の作出など、様々な手法やアプローチを駆使して少しずつ解明を進めて来た。

研究室在籍中その成果は多くの英文原著論文として公表してきたが、一体何を解明できたのか？と問われれば、細菌毒素タンパク質には毒素活性のみでなく、宿主自然免疫応答を強力に刺激するドメインを有するものがあり、リステリア感染マウスに誘導される強い TH1 応答の誘導には LLO のそのようなドメインが不可欠の役割をはたしている、ということに尽きるであろう。

ここでは、自身の 37 年に亘る主な研究成果を経時的に示しながら、その間私が学んだことや想いも併せて紹介させて頂きたい。

# ランチオンセミナー

9月5日（土）

11:50~12:30

演者 佐藤寿夫 先生

(株)日本微生物研究所

演題 『 腸管出血性大腸菌健康保菌の実態 』

# 腸管出血性大腸菌健康保菌の実態

佐藤寿夫

（株）日本微生物研究所

【目的】 ヒトに病原性を持つ大腸菌の中でも *stx* を産生し感染症対策上重要な腸管出血性大腸菌(以後 EHEC)の検査は、一部の血清型に偏った選択培地で分離培養が行われている。しかし、EHEC とは *stx* を産生する全ての大腸菌を指すものであり、血清型から検査を進めていくものでないことは衆知の事である。また、市販されている抗血清に関しても病原性大腸菌免疫血清と謳ってはいるが、菌体の抗原性を区別するもので病原性をみている試薬ではない。EHEC を正しく検査するには *stx* を直接検査することが必須で、現在検査可能な方法は毒素を検出するか毒素遺伝子を検出する方法である。毒素の産生性は培養などの条件や *in vivo* or *vitro* の違いに左右されるため *stx* 遺伝子を検出する方法が確実である。

■今回、無症状の受検者由来糞便を PCR 法で *stx* 遺伝子を検出した EHEC について調査した。ここでいう無症状受検者とは食品衛生法の中で検便が義務付けられている食品製造工場従事者あるいは医療食などにかかわる職種の人を指しているが、今回の調査対象は全国に及んでいるので無作為に選んだ全国的な市中データとしても意味づけられる。

■2009年1月から2014年12月までの検便検査データから EHEC の陽性率は 0.024%となった。血清型内訳は OUT-46.8%、O91-22.0%、O103-5.3%、O128-4.7%、O146-3.4%、O157-2.4%、O26-2.2%、O8-2.1%、O18-1.1%、O174-1.1%、O111-0.2% その他となった。この都道府県検出比率に関して地域差はあまり見られなかった。また、Vero 毒素型別は、*stx*1(+)*stx*2(-)-56.3%、*stx*1(-)*stx*2(+)-37.2%、*stx*1(+)*stx*2(+)-6.6% となった。

■病原菌に感染して発症するか否かは個体差もあるが、今回の調査では健康保菌者由来の EHEC と発症者のそれとの違いを直接の病原因子である *stx* 以外に病原性関連因子であるインチミンに着目した。インチミン遺伝子(*eae*)を PCR 法で検査したところ健康保菌者由来 EHEC の陽性率は 17%であった。発症者由来のそれは 98%以上との報告があるので発症の有無にインチミンが大きくかかわっていることが推定できた。日本では直接発症に関与している *stx* のみに関心が向いているが、米国における牛肉の EHEC 検査は、*stx* だけでなくインチミンも同時に検査することになっており、両因子共に陽性の時を EHEC 陽性と定めている。

【考察】 現在、EHEC が検出された場合、医師は届け出の義務があり無症状の場合でも届け出の対象となっている。発症者からの EHEC 検出はそれだけで起因菌と推定できるが、検便のような無症状のヒト糞便由来 EHEC の場合は、病原性関連因子であるインチミンも同時に検査しなければならない必要性を感じた。

# 一 般 演 題

9月5日(土)

セッション1            9:00~

セッション2            10:05~

セッション3            12:40~

セッション4            13:45~

セッション5            15:00~

演題番号横の\* (アスタリスク) は支部会賞候補演題です。

# 1\* わが国の酪農場におけるバルク乳からの

## レプトスピラ遺伝子の検出

○芦澤春香、小西なつこ、村田亮、中野良宣、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】レプトスピラ症は病原性 *Leptospira* によって引き起こされる人獣共通感染症である。病原性レプトスピラ血清型 Hardjo は牛のレプトスピラ症の原因の1つであり、わが国でも広く浸潤していることが鳥海（2002）と小西（2014）のバルク乳および血清を用いた抗体調査により明らかにされた。このように、血清学的には本症の浸潤が証明されているが、病原学的には証明はされておらず、詳細については不明である。

本研究では、小西が抗体調査に使用したバルク乳からレプトスピラ遺伝子の検出を試みたので、その概要を報告する。

【材料・方法】2013年8月から2014年7月まで全国各地で採取され、冷凍して保管していたバルク乳347検体を使用した。これらのバルク乳からDNA抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN)を用いてDNAを抽出した後、病原性レプトスピラに特異的である鞭毛をコードする遺伝子領域(*flaB*)を標的としたNested PCRを実施し特異遺伝子を検出した。さらに、PCR陽性サンプルについてシーケンス解析を行い、その後Bio Editを用いて塩基配列を決定して、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)に公開されているレプトスピラの塩基情報と比較してMEGA6(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて系統樹を作成した。

【結果・考察】バルク乳347例中25例(7.2%)がPCR陽性を示した。これらのうちELISAにより強陽性(+++)を示したバルク乳9例中1例(11%)が、中等度陽性(++)を示した100例中7例(7.0%)が、弱陽性(+)を示した91例中9例(9.9%)がPCR陽性を示した。ELISA陰性(-)を示した147例中8例(5.4%)も陽性を示した。PCR陽性を示した25例中First PCRで検出できたものは1例のみで、残りのサンプルはNested PCRで検出できた。そのPCR産物を解析した結果、7例中5例は*L. interrogans*と一致し、残りの2例で*L. interrogans*と*L. borgpetersenii*の2種類が混在していることが判明した。

以上のように、バルク乳からレプトスピラ血清型 Hardjo の遺伝子が検出されたことからわが国においても本菌が浸潤している事が病原学的にも明らかになった。

乳汁中にレプトスピラが排菌されることが推測されるため、子牛あるいは人への感染の可能性や、搾乳作業等にも十分注意する必要があると思われる。

## 2\* 北海道に生息するアライグマから分離された

### レプトスピラの遺伝学的解析

○橋場和野、高崎真理枝、吉織綾子、村田亮、中野良宣、菊池直哉  
酪農学園大学 獣医学群 獣医細菌学ユニット

【目的】レプトスピラは病原性レプトスピラの感染によりおこる人獣共通感染症の一つである。保有体であるネズミなどのげっ歯類や他の保菌動物が尿中に排菌することで川や土壌などの環境を汚染し、ヒトや家畜、野生動物などへの感染源となっている。近年北海道では多くのアライグマが野生化し、農作物などに多大な影響を与えている。吉織(2004年)は北海道空知・胆振地方に生息するアライグマからレプトスピラを分離し、本菌が広く浸潤していることを明らかにした。さらに高崎(2009年)はそれらの分離株の菌種および血清型の同定を行い、*Leptospira borgpetersenii* 血清型 Javanica と *interrogans* 血清型 Autumnalis に近縁な血清型であることを明らかにした。本研究ではそれらの分離株についてさらに遺伝学的解析を実施した。

【材料・方法】吉織がアライグマから分離したレプトスピラ株 12 株 (*borgpetersenii* 10 株、*interrogans* 2 株) を用いた。各分離株の遺伝子種を決定するために 16S rRNA・*flaB*・*gyrB* 遺伝子の塩基配列の解析を行った。さらに菌株間の異同を推定するため PFGE を行った。PFGE では全ゲノムを抽出後、制限酵素 *Not I* を用いて切断し、そのパターンを解析した。

【結果・考察】16S rRNA・*flaB* 遺伝子の解析により血清型 Javanica と同定された 10 株は *Leptospira borgpetersenii* に近縁な遺伝子種であり、血清型 Autumnalis と推定された 2 株は *Leptospira interrogans* に近縁な遺伝子種であることが確認できた。*gyrB* 遺伝子の解析では、血清型 Javanica と同定された 10 株は血清型 Javanica に近縁であり血清学的にも遺伝学的にも血清型 Javanica と証明された。しかし血清型 Autumnalis と推定された 2 株は血清型 Canicola に近縁であり血清学的解析と異なる結果となった。PFGE の切断パターンを調べた結果、10 株は *borgpetersenii* 血清型 Javanica の参照株と類似した切断パターンを示した。これらの 10 株はそれぞれ 6 つの切断パターンを示し、同一個体から分離された菌株にもかかわらず切断パターンが一致しない例も認められた。Autumnalis と推定されていた 2 株は本血清型の参照株と類似した切断パターンを示し、これら 2 株の切断パターンを比較するとわずかに異なっていた。

以上、シーケンス解析の結果より、遺伝子種はそれぞれ 12 株のうち 10 株は *Leptospira borgpetersenii*、2 株は *Leptospira interrogans* と同定された。また、PFGE の結果より、北海道に生息するアライグマの保有するレプトスピラは多様性を示していることが示唆された。

### 3\* レプトスピラ血清型 Hardjo 感染が牛の繁殖成績へ与える影響およびレプトスピラ不活化ワクチンの有効性について

○鎌口綾華<sup>1</sup>、山川和宏<sup>2</sup>、安富一郎<sup>2</sup>、村田亮<sup>1</sup>、中野良宣<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>ゆうべつ牛群管理サービス

【背景・目的】*Leptospira* 血清型 Hardjo (Hardjo-bovis 型、Hardjo-prajitno 型) は繁殖牛に感染した場合、流死産、虚弱子牛、不妊などの繁殖障害を引き起こすことが知られている。我が国における血清学的調査において、本症は乳牛に広く浸潤し、特に北海道では高濃度に汚染されていることが確認されている。しかし、血清型 Hardjo の感染により繁殖への程度の影響があるかは十分に明らかになっていない。また、諸外国ではワクチンが応用されているが、我が国では承認された直後のため、ワクチンの効果を比較検討した報告はまだない。本研究では、Hardjo 感染が繁殖成績に及ぼす影響を検討するとともに、ワクチン接種により繁殖成績が向上するか否かについて検討を行ったので報告する。

【材料・方法】試験 1：血清型 Hardjo の感染が繁殖成績に及ぼす影響を調べた。北海道東部に存在するレプトスピラ感染陽性酪農場 A (成牛 460 頭) において、分娩牛 139 頭を対象とした。分娩後 21～33 日と 43～49 日に採血を行い Hardjo 抗体価を測定した。検査項目：抗体陽性群と抗体陰性群に区分し、受胎率、空胎日数、妊娠鑑定後の胚死滅・流産割合を比較した。抗体の検出：ELISA キット (*Leptospira* ELISA kit, Linnodee Animal Care, Northern Ireland, UK) を使用した。試験 2：血清型 Hardjo の感染が繁殖成績に及ぼす影響およびレプトスピラ不活化ワクチンの有効性を調べた。北海道東部に存在するレプトスピラ感染陽性酪農場 B (成牛 480 頭) において、分娩牛 170 頭を対象とした。ワクチン接種群とワクチン非接種群に区分し、繁殖成績を比較した。

【結果と総括】試験 1：抗体陽性 101 頭と抗体陰性 31 頭に群別し、これらについて繁殖成績を比較した。牛群全体の抗体陽性率は 72% であり、初産から 2 産にかけて抗体陽性率 (初産：25.0%、2 産：91.9%) の増加が見られた。また、抗体陽性群と抗体陰性群の比較において、空胎日数 (陽性群：108.9 日、陰性群：86.6 日) に有意な差が見られた。試験 2：ワクチン投与 63 頭、ワクチン非投与 107 頭に群別し、繁殖成績を比較した結果、胚死滅・流産の割合 (投与群：9.5%、非投与群：22.4%) に有意な差が見られた。以上の結果から、レプトスピラ感染は空胎日数を延長させる可能性があることが明らかとなった。また、ワクチン接種は、胚死滅・流産発生を低減させる可能性があることが明らかとなった。しかし、本研究ではそれぞれ 1 牧場のみを対象としていたため、今後更に対象牧場を増やし検討する必要があると思われる。

## 4\* 演題名：マイコプラズマ性乳房炎罹患牛の病理学のおよび微生物学的解明

○山本 剛史<sup>1</sup>、根布 貴則<sup>1</sup>、権平 智<sup>1</sup>、岩野 英知<sup>2</sup>、松田 一哉<sup>3</sup>、  
小岩 政照<sup>4</sup>、樋口 豪紀<sup>1</sup>、永幡 肇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医衛生学ユニット

<sup>2</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医生化学ユニット

<sup>3</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・獣医病理学ユニット

<sup>4</sup>酪農学園大学・獣医学群・獣医学類・生産動物内科学

【背景および目的】牛マイコプラズマ性乳房炎は伝染性乳房炎に分類され、抗生物質に対する応答性が乏しいことから、農場における制御が困難な感染症の一つとされている。牛マイコプラズマ性乳房炎は搾乳器具を介して牛群内に広く伝搬するが、一方で、肺などの感染部位から血液を介して乳腺に移行することも指摘されている。本研究では、酪農場で発生したマイコプラズマ性乳房炎罹患牛の剖検により病理学のおよび微生物学的解明を試みた。

【材料および方法】①試験期間：2014年8月から2014年9月、②供試動物：ホルスタイン種(雌、4歳齢)1頭、③採材：左前(A)、左後(B)、右後(D)の分房乳、組織サンプル(耳道、咽頭、鼻腔、唾液腺、扁桃、脳、眼球、呼吸器、心臓、生殖器、脾臓、乳腺、乳頭管、各種リンパ節)、ぬぐい液(気管、耳道、鼻腔、膺、関節、乳頭管)、④乳汁中白血球数(体細胞数)の測定：Fossmatic90、⑤*Mycoplasma* spp.の同定と菌数の測定：培養法(Hayflick 培地)およびPCR法、⑥*M. bovis*の遺伝子型別：RAPD法

【結果】①AおよびB分房の乳汁から*Mycoplasma bovis*(*M. bovis*)が分離され、菌数はA分房 $1.5 \times 10^3$ CFU/ml、B分房 $5.5 \times 10^4$ CFU/mlであった。D分房の乳汁から*Mycoplasma* spp.は分離されなかった。②乳汁中白血球数はA分房 $1.5 \times 10^6$ cells/ml、B分房 $1.6 \times 10^7$ cells/ml、D分房 $2.8 \times 10^5$ cells/mlであった。③A、B、CおよびD分房の乳頭管および乳腺組織から*M. bovis*が分離された。④肺からは*M. bovis*、また、鼻腔スワブからは*M. bovirhinis*が分離されたが、その他の組織サンプルやスワブサンプルから*Mycoplasma* spp.は分離されなかった。⑤肺、乳汁、乳腺および乳頭管から分離された*M. bovis*が同一菌株である可能性が示唆された。

【考察】本研究の結果より*M. bovis*が乳腺において強い病原性を惹起することが示唆された。また、組織、乳汁から分離された*M. bovis*が同一菌株である可能性が高いことから菌が体内移行する可能性が推察された。

## 5\* MALDI-TOF MS を用いた

### *Mannheimia haemolytica* の遺伝子型解析

○井上正亮、村田亮、中野良宣、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】マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)とは、革新的なタンパク質質量分析システムである。細菌分野においても菌体構成タンパク質を測定し、得られた波形を Bruker 社提供の波形ライブラリと比較することで菌種を同定する方法が提案されている。本法は従来の生化学的検査や 16SrRNA 遺伝子配列の解析に比べてはるかに迅速であり、ランニングコストが非常に低いことが特徴である。

菌種レベルよりもさらに詳細な遺伝子型の鑑別は、宿主の特定や疾病の流行状況など疫学的情報につながる。遺伝子型の特定には MLST(Multi locus Sequence Typing)などが用いられているが、複数の PCR 反応と塩基配列の解析に長い時間を要するなど欠点が存在する。

Petersen は、欧米諸国を中心とした牛由来 *Mannheimia haemolytica* 株について MLST 解析を行い、少なくとも 7 種類の Sequence type (ST) が存在することを示した。我々は、国内各地で分離された牛由来 *M.haemolytica* について MLST 解析を実施し、各地域の ST 型の分布を比較するとともに、MALDI-TOF MS による解析も行い、遺伝子型の鑑別に応用できるか検証した。

【方法】*M.haemolytica* の国内分離株 33 株および基準株 1 株 (ATCC33396<sup>T</sup>) について、MLST 解析を実施し ST 型を決定した。次にこの 34 株について MALDI-TOF MS を用いて解析を行った。マススペクトルの解析には、MALDI Biotyper Version3.1 software を使用し、Bruker 社提供ライブラリおよび本研究で新たに作成したライブラリを用いた。

【結果と考察】MLST 解析の結果 ST1 型 28 株、ST2 型 6 株であることが判明し、国内の *M.haemolytica* 分離株は全て ST1 あるいは ST2 に分類されたことから、Petersen の成績と比較しても日本の牛由来株は遺伝的多様性が乏しいことが示唆された。

次にこの 34 株から MALDI-TOF MS によって得られたマススペクトルを利用して、研究室オリジナルライブラリ「*Mannheimia* ST1」、「*Mannheimia* ST2」の 2 つを作成した。次いで残りの野外分離株 94 株についてこのオリジナルライブラリを用いて ST1、ST2 への再分類を行った結果、全ての株で MLST による分類と完全に一致した。

本研究において MALDI-TOF MS による *M.haemolytica* の分類が遺伝子型による分類と 100%一致していることから、本法を用いた迅速かつ正確な同定を行なうことが可能であり、国内における疫学的情報収集への応用が期待できる。

## 6 ピロリ菌感染経路解析法としての

### multilocus sequence typing (MLST) の有用性

○横田伸一<sup>1</sup>、今野武津子<sup>2</sup>、藤原伸一<sup>2</sup>、戸板成昭<sup>2</sup>、高橋美智子<sup>2</sup>、  
山本聡<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、佐藤豊孝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>札幌医科大学医学部微生物学講座、<sup>2</sup>札幌厚生病院小児科

【目的】ピロリ菌の感染経路として、公衆衛生の状態が良い地域では家族内感染、特に母子感染が主体であることは、私たちの報告も含めてほぼコンセンサスが得られている。感染経路解析には、分離菌株のゲノムの相同性が用いられる。私たちはこれまで random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 法で検討を行ってきたが、この方法は簡便ながら実験間での結果の差異、類似のバンドパターンが出現した時の判定の困難さが欠点となる。本研究では複数の housekeeping genes の部分配列情報を基にした multilocus sequence typing (MLST)法の感染経路解析への有用性について検討した。

【方法】父母両方の感染状況が判明している日本人 35 家族について、分離したピロリ菌株からDNAを抽出した。RAPD-PCRは既報 [Konno et al. (2008) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27:999] に従った。MLST解析はweb site (<http://pubmlst.org/helicobacter/>) に従った。*atpA* (626-627 bp), *efp* (410 bp), *mutY* (419-420 bp), *ppa* (398 bp), *trpC* (456 bp), *ureI* (535-585 bp), *yphC* (504-531 bp)の 7 遺伝子の部分配列をPCRで増幅、ダイレクトシーケンス法により配列を解析し、MLSTデータベースに登録、各配列の配列番号とそれらを組み合わせた MLST番号を付与された。MLST番号決定には用いられないがデータベース上にある *vacA* (364-445 bp) についても各配列を解析、登録した。

【結果】RAPD-PCR 法と MLST 法での結果は非常に良い一致をみた。子と両親の菌株の遺伝子型がいずれも一致したのは 35 家族中 9 家族 (25.7%)、子と母親のみの一致は 12 家族 (34.3%)、子と父親のみの一致は 1 家族 (2.9%) であり、母子感染の優位性が確認された。また、夫婦で菌株が一致した 9 家族では、子供も同じ遺伝子型であり、家族全員が同一クローン由来株に感染していることが示された。一方、兄弟 3 人が同じ株で、母の株、父の株と異なる例が 1 家族、兄弟 2 人が同じ株で父が異なる株、母がピロリ菌陰性という例が 2 家族で認められた。親が感染源でない株の兄弟間感染と考えられた。

【考察・結論】MLST 法は大腸菌や黄色ブドウ球菌等では、全世界的にアウトブレイクしているクローンの追跡といった大まかな分類という位置づけである。一方、本研究からピロリ菌では MLST 法は菌株レベルの区別が可能であり、実験間差のない方法としてピロリ菌の感染経路を解析するのに有用であることが示された。ピロリ菌の感染経路として家族内感染が重要であり、特に母子感染が主であることが確認された。また、一部に兄弟感染が示唆される事例もあった。一方、父母子供すべて一致の 9 家族に関しては、子から親への感染より、夫婦間感染による可能性が高い、したがって家族内感染のある家族の約 25% で夫婦感染のあることが考えられる。

## 7\* 抗菌薬処理による緑膿菌菌体から遊離する

### リポ多糖量の変化

○袴田浩<sup>1</sup>、山本聡<sup>1</sup>、佐藤豊孝<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、  
北川学<sup>2</sup>、宮本篤<sup>2</sup>、横田伸一<sup>1</sup>

札幌医科大学医学部 <sup>1</sup>微生物学講座、<sup>2</sup>医療薬学講座

【目的】 コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌感染症治療の最終選択肢の抗菌薬として位置づけられており、他系統の抗菌薬との併用がガイドラインで推奨されている。我々は、緑膿菌においてリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) によりコリスチンの抗菌活性が抑制されることを報告してきた。一方、抗菌薬処理により LPS が菌体から遊離することが知られており、抗菌薬の種類によって遊離量に差が認められる。従って併用抗菌薬によっては菌体外 LPS 量が増加し、コリスチンの抗菌活性を阻害することが危惧される。これまでコリスチンとの併用療法に用いる抗菌薬の選択に関する臨床研究はなされているが、併用に最も適した抗菌薬に関する明確なエビデンスはない。そこで本研究では、コリスチンとの併用における抗菌薬の選択に関する有効なエビデンスを得るため、4 種類の異なる作用機序を有する抗菌薬の処理による緑膿菌生菌数および菌体外 LPS 量の経時的变化を検討した。

【方法】 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を使用した。メロペネム (MEPM)、ゲンタマイシン (GM)、レボフロキサシン (LVFX)、 コリスチン (CL) の薬剤感受性は最小発育阻止濃度 (MIC) を微量液体希釈法により測定した。Mueller-Hinton Broth で約  $1 \times 10^9$  cfu/mL に調製した菌液に MIC の 10 倍濃度の上記抗菌薬を添加した。0、2、4 時間後に菌液を一部回収し、生菌数をコロニーカウントにより求め、遠心後の上清中の LPS 量をコアオリゴ糖の構成成分である 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid の比色定量 (チオバルビツール酸法) で測定した。

【結果・考察】 PAO1 株の MEPM、GM、LVFX、CL の MIC はそれぞれ 0.5、0.25、0.125、1  $\mu\text{g/mL}$  であった。10 倍の MIC 濃度存在下で 4 時間培養後の上清中の LPS 濃度は高い順に MEPM  $\approx$  LVFX > 抗菌薬非存在下 > GM  $\approx$  CL (550, 540 > 310 > 220, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) であった。その時の生菌数は、抗菌薬非存在下で  $10^{10}$  cfu/mL オーダーであるのに対して、MEPM > GM > CL > LVFX (それぞれ  $10^6 > 10^5 > 10^4 > 10^2$  cfu/mL オーダー) であった。この結果から、抗菌薬非存在下よりも高い菌体外 LPS 量を示す抗菌薬のあることが明らかとなった。培養上清中の LPS 量が高かった MEPM と LVFX の結果を比較すると、殺菌力と菌体外 LPS 量増加は関連しないことが示唆された。今後、コリスチンとこれらの抗菌薬併用時における抗菌活性への菌体外 LPS の影響を検討していく予定である。

## 8\* 鶏舎環境での薬剤耐性菌の伝播及び維持における

### ハエの役割

○福田 昭<sup>1</sup>、岡村 雅史<sup>2</sup>、臼井 優<sup>1</sup>、胡 東良<sup>2</sup>、田村 豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット、<sup>2</sup>北里大学獣医学部人獣共通感染症学研究室

#### 【目的】

ハエは畜舎及びヒトの生活環境に生息する薬剤耐性菌のベクターとなる。我々は、第 81 回本学会において産卵及び変態を経てもハエは薬剤耐性菌を維持していることを明らかにした。ハエが生活環において薬剤耐性菌を維持することは薬剤耐性菌のベクターとしてだけでなくレゼルボアとしての役割を果たしている可能性がある。そこで畜舎環境におけるハエの役割をさらに明らかにするため、鶏へのセファロスポリン（CEP）耐性大腸菌保有ウジ投与試験を実施した。

#### 【材料・方法】

30 日齢の鶏群（各群 5 羽）に CEP 耐性大腸菌保有ウジ（ $10^4$  CFU）及び陽性コントロールとして CEP 耐性大腸菌液（ $10^9$  CFU）を経口投与した。CEP 耐性大腸菌保有ウジは、実験室内で飼育している CSMA 系のイエバエ成虫に CEP 耐性大腸菌を投与後、産卵、孵化を経て CEP 耐性大腸菌の保有を確認し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存したものを使用した。鶏に投与後 13 日まで経時的に落下盲腸便を、投与後 16 日に盲腸内容物を採材し、サンプルとした。これらを 10 倍階段希釈してセファゾリン添加 DHL 培地に接種することで、サンプル中の CEP 耐性大腸菌数を測定した。

#### 【結果・考察】

サンプル中に含まれる CEP 耐性大腸菌数は投与直後をピークとし時間経過と共に減少したが、投与後 16 日まで鶏盲腸内に維持し、ウジ投与群で  $10^2 \sim 10^7$  CFU/g、菌液投与群で  $10^5 \sim 10^8$  CFU/g の範囲であった。すなわち、CEP 耐性大腸菌を保有したウジから鶏へ CEP 耐性大腸菌が伝播し維持された。このことから、鶏舎外から侵入したハエが鶏舎内で産卵及び変態をすることで薬剤耐性菌が農場内において伝播・維持されることが示唆された。ハエは畜舎環境においてレゼルボアとしての役割を果たしていると考えられる。以上のことから、畜舎環境における薬剤耐性菌の制御には、畜舎内環境のみでなく、畜舎外環境からのハエの侵入防止対策も重要である。

## 9 イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較

○臼井優<sup>1</sup>、鈴木要人<sup>1</sup>、岡健太郎<sup>2</sup>、高橋志達<sup>2,3</sup>、稲松孝思<sup>4</sup>、神谷茂<sup>3</sup>、田村豊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット

<sup>2</sup>ミヤリサン製薬株式会社

<sup>3</sup>杏林大学医学部感染症学講座

<sup>4</sup>東京都健康長寿医療センター

【目的】 *Clostridium difficile*(CD)は、ヒトに対して偽膜性大腸炎、抗菌薬関連下痢症を引き起こす。海外ではヒトに対して強い病原性を示すリボタイプが動物(牛、豚、及びイヌ)で分離され、ヒトの感染と動物の関係が注目されている。CD を保有する動物の中でも、イヌはヒトの生活空間の中で飼育されており、ヒトとの接触の機会が多いため、ヒトに伝播する危険性は高い。そこで今回、ヒトの CD 感染とイヌの関連性を明らかにするため、イヌ糞便から CD を分離し、ヒト臨床由来株との性状比較を行った。

【材料及び方法】 イヌ糞便 204 検体から CD を分離した。PCR による同定と毒素遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*)の検出を行った。薬剤感受性試験(シプロフロキサシン:CPFX, クリンダマイシン:CLDM, セフトリアキソン:CTRX, エリスロマイシン:EM)、PCR リボタイプング、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)、ホールゲノムシーケンスを行い、ヒト臨床由来株 71 株との性状比較を行った。

【結果及び考察】 62/204 検体(30%)から CD が 68 株分離された。*tcdA*, *tcdB* 陽性株は、47%であり、*cdtA*, *cdtB* 陽性株は分離されなかった。薬剤感受性試験の結果、抗菌薬関連下痢症に関わる薬剤に多くの株が耐性を示した(CPFX, 47%; CLDM, 88%; CTRX, 59%; EM, 24%)。イヌ由来株は 29 のリボタイプに型別され、その中で最も多く見られたリボタイプの 16 株(24%)は、*tcdA*, *tcdB* 陽性であったことから、イヌ由来株がヒトに伝播した際、抗菌薬関連下痢症となる可能性がある。また、イヌ由来株 4 株のリボタイプはヒト臨床由来株 3 株と同一であり、さらにその中のイヌ由来株 1 株は PFGE 型がヒト臨床由来株と同一であり、ホールゲノムシーケンスもヒト臨床由来株と類似していた。以上のことから、イヌとヒトの間で CD の伝播が起こっていることが示唆された。

## 10\* チゲサイクリン非感受性大腸菌は

### フルオロキノロン耐性株に多く認められる

○ 佐藤豊孝<sup>1</sup>、鈴木裕樹<sup>1</sup>、大越康雄<sup>1</sup>、山本聡<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、白石宗<sup>1</sup>、  
田村豊<sup>2</sup>、横田伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>札幌医大・医学部・微生物学、<sup>2</sup>酪農大・獣医・食品衛生学

<背景> チゲサイクリン(TGC)は、多くのグラム陽性および陰性菌に良好な抗菌活性を示し、他に選択肢のない多剤耐性菌に使用される重要な抗菌薬として位置づけられている。大腸菌では99%以上がTGCに感受性でありTGC耐性株の報告は現状ではほとんどない。一方、フルオロキノロン系抗菌薬(FQ)は臨床現場での使用頻度が高い抗菌薬であり、近年FQ耐性大腸菌の増加が問題視される。特にFQを含む多剤に耐性を示すクローンであるO25b:H4-ST131-H30Rxは世界中の臨床現場で報告される。本研究では、大腸菌臨床分離株におけるFQ耐性とTGC感受性低下との関与を評価した。

<方法> TGC治療歴のない入院または外来患者から分離した大腸菌臨床分離株をFQ感受性株(100株)とFQ耐性株(118株)の2群に分け以下の解析を行った。

- 1) TGCに対する最小発育阻止濃度(MIC)の測定。
- 2) TGC非感受性株の血清型、phylogenetic groupおよびsequence typeの決定。
- 3) efflux pump 遺伝子(*acrA*, *acrB*)の発現量の測定(RT-PCR)。
- 4) 菌体内TGC濃度の測定。
- 5) efflux pump 遺伝子欠損させたTGC耐性株におけるTGC MICの測定。
- 6) FQ存在下での菌培養におけるTGC MICの変化の測定。

<結果>

- 1) TGC MICの分布はFQ耐性株群がFQ感受性株群より高い値に分布していた。FQ耐性株118株中5株はTGC非感受性であった。一方、供試したFQ感受性株はすべてTGCに感受性を示した。
- 2) 4株のTGC非感受性株はO25b:B2-ST131-H30Rxであった。
- 3) TGC非感受性株の*acrA*および*acrB*の発現量はTGC感受性株より有意に高く、これらの発現量とTGC MICに正の相関(*acrA*,  $r^2=0.769$ ; *acrB*,  $r^2=0.584$ )が認められた。
- 4) TGC非感受性株の菌体内TGC濃度もTGC感受性株より有意に低く、TGC MICとの間に負の相関が認められた( $r^2=0.813$ )。
- 5) *acrAB*および*tolC*を欠損させたTGC耐性株のTGC MICは耐性(TGC MIC, 16  $\mu\text{g/mL}$ )から感受性(TGC MIC, 0.125~0.25  $\mu\text{g/mL}$ )に低下した。
- 6) FQ剤存在下で培養した株は、TGC MICを上昇させた。

<考察> 本研究により、FQ耐性大腸菌の一部はAcrABの過剰発現によりTGC感受性の低下をもたらす菌株集団が存在することを明らかにした。さらにFQ存在下の培養でTGC MICを増加させたことから、大腸菌はTGCの暴露がなくともFQ等の他の抗菌薬選択下でTGC感受性の低下を獲得できることが明らかとなった。TGC非感受性株の多くが、世界規模で拡大している多剤耐性クローンO25b:H4-ST131-H30Rxであったことから、FQ耐性菌におけるTGC感受性の動向には注視が必要である。

# 11\* *Streptococcus sanguinis* によるマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおける IL-1 $\alpha$ 産生誘導活性

○佐伯 歩<sup>1</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、亀崎 良助<sup>1</sup>、中澤 太<sup>2</sup>、鈴木 敏彦<sup>3</sup>、柴田 健一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大・歯・口腔分子微生物、<sup>2</sup>北海道医療大・歯・微生物、<sup>3</sup>東京医科歯科大・歯・細菌感染制御学

【目的】*Streptococcus sanguinis* は、感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目されており、その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている。IL-1 は IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  からなり、昨年の本学術大会で、*S. sanguinis* がマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 $\beta$  の産生を誘導することを報告した。そこで、今回は、*S. sanguinis* の IL-1 $\alpha$  産生誘導活性について検証した。

【方法】菌株は *S. sanguinis* ATCC 10556 (Ss) を用いた。標的細胞としては A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞)、さらに、C57BL/6(B6) マウスならびに B6 マウスから caspase-1、ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスの骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。IL-1 $\alpha$  は ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した。

【結果】Ss は XS-106 細胞ならびに B6 由来の BMM に IL-1 $\alpha$  の産生を誘導した。本活性は、B6 由来の BMM に比べて caspase-1、NLRP3 ならびに ASC ノックアウトマウス由来 BMM では有意に減弱したが、caspase-1 阻害剤である Z-YVAD-FMK では阻害されなかった。

【考察】Ss は樹状細胞ならびにマクロファージに対して IL-1 $\alpha$  産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 インフラマソームが部分的に関与するが、caspase-1 のタンパク質分解活性は関与しないことが示唆された。

## 12\* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* による

### インフラマソームの活性化

○亀崎 良助<sup>1,2</sup>、佐伯 歩<sup>1</sup>、阿部 亜美<sup>3</sup>、長谷部 晃<sup>1</sup>、北川 善政<sup>2</sup>、  
鈴木 敏彦<sup>4</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病態学講座口腔分子微生物学教室

<sup>2</sup>北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室

<sup>3</sup>福岡歯科大学 成長発達歯学講座 成育小児歯科学分野

<sup>4</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

#### 要旨

インフラマソームは多様な生理活性をもつ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。近年、IL-1 $\beta$  が関与する炎症性疾患の多くがこの細胞内センサーの活性化と関連している可能性が示唆され、病態解明の手がかりとしてインフラマソームが注目されている。歯周炎はその病態形成に IL-1 $\beta$  が重要な役割を果たすが、歯周炎とインフラマソームとの関連を示した報告はほとんどない。そこで、本研究では、侵襲性歯周炎の主な病原菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の歯周疾患における病因論の一部を明らかにすることを目的とし、本菌によるインフラマソームの活性化について検証した。

*A. actinomycetemcomitans* JP2（北海道医療大学歯学部長澤 敏行先生より分与）の生菌および死菌で A/J マウス由来樹状細胞（XS106 細胞）を刺激したところ、生菌、死菌ともに IL-1 $\beta$  の産生を誘導したが、*A. actinomycetemcomitans* 培養上清では産生誘導はみられなかった。生菌および死菌での IL-1 $\beta$  産生誘導活性は z-VAD-FMK と z-YVAD-FMK で有意に阻害された。これらの IL-1 $\beta$  産生誘導活性は caspase-1 ならびに NLRP3 のノックダウンにより有意に減弱した。さらに、*A. actinomycetemcomitans* の生菌および死菌で caspase-1、ASC、NLRP3 のそれぞれをノックアウトしたマウス由来骨髄由来マクロファージを刺激したところ、生菌ならびに死菌の IL-1 $\beta$  産生誘導活性は共に有意に減弱した。以上の結果から、*A. actinomycetemcomitans* 菌体は NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 $\beta$  の産生を誘導していることが示唆された。

## 13\* 繊毛虫との共培養で大腸菌から漏れ出す

### クオラムセンシング分子 autoinducer-2 について

○大久保寅彦<sup>1</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、山崎智拓<sup>1</sup>、花輪智子<sup>2</sup>、中村眞二<sup>3</sup>、神谷 茂<sup>2</sup>、山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学保健科学研究所病態解析学分野、<sup>2</sup>杏林大学医学部感染症学教室、<sup>3</sup>順天堂大学大学院医学研究科形態解析イメージング研究室

#### 【目的】

これまで私達は細菌と原生生物との微生物間相互作用に着目し、繊毛虫(*Tetrahymena thermophila*)の小胞内へ高密度に取り込まれた大腸菌間で、薬剤耐性プラスミドの接合伝達頻度が上昇することを明らかにした (Matsuo et al., Res Microbiol. 2010; Oguri et al., J. Antimicrob. Chemother. 2011)。その一方で、細菌密度の上昇は細菌の密度認識機構(クオラムセンシング)にも影響を与えると考えられ、自然環境中において繊毛虫の存在が細菌にとって有利にはたらく可能性を示している。そこで本研究では、共培養時における細菌のクオラムセンシングの変化を明らかにすることを目的として、クオラムセンシング分子の中でも多菌種に影響する autoinducer-2 (AI-2) について、産生量や遺伝子発現量を測定した。また、大腸菌が集積した小胞の状態を可視化し、共培養時における AI-2 量が増える原因についても考察を加えた。

#### 【材料・方法】

大腸菌は CTX 耐性株と CPFX 耐性株を供試し、各々について AI-2 産生遺伝子 *luxS* 欠損株を作成した。繊毛虫には *T. thermophila* IB 株を供試した。共培養はいずれも Page's amoeba saline 500 $\mu$ L 内で、30 $^{\circ}$ C、24h の条件で行なった。まず、共培養時における大腸菌の AI-2 産生量を測定するため、培養液の上清を *Vibrio harveyi* 培養液に添加して、AI-2 量に反応して発生する蛍光量を測定し、*luxS* 欠損株と比較した。また、繊毛虫内に形成された小胞数を計測するとともに、生細胞染色にて小胞内に集積した大腸菌を可視化した。さらに、*luxS* および AI-2 輸送体遺伝子 *ydgG* の発現量を qRT-PCR で測定し、共培養時と単独培養時の発現量を比較した。

#### 【結果・考察】

大腸菌を繊毛虫と共培養した場合、培養上清中の AI-2 量は、単独培養時と比べて最大 20 倍程度増加した。一方 *luxS* 欠損株では、共培養時と単独培養時の間で AI-2 量に有意な差は認められなかった。繊毛虫内の小胞数は、培養上清中の AI-2 量が増えるにつれて増加し、正の相関を示した。生細胞染色により、大腸菌が繊毛虫の小胞内に集積していることが観察されたが、一部の菌体は破壊されていた。大腸菌を含んだ小胞は繊毛虫体外の培養液中にも観察され、小胞内容物が漏れ出しているのが観察された。大腸菌の *luxS* および *ydgG* 発現量は、共培養時と単独培養時の間で有意差がみられなかった。これらの結果から、共培養時における培養上清中 AI-2 量の増加は、①繊毛虫による大腸菌の取り込み、②大腸菌の小胞内集積と破壊、③小胞の排出、④小胞からの AI-2 の拡散、という機序によるものと推定された。以上より、繊毛虫の存在はその周囲に生息する細菌の生存性に、クオラムセンシングを介して影響を与えていると考えられた。

【会員外協力者】小栗 聡、福元達也、秋沢宏次、清水 力(北海道大学病院)

## 14 豚由来 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 株

### の遺伝子学的解析

○村田亮、大田真理、中野良宣、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】 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) は、ブタのレンサ球菌症を引き起こす病原体の一つである。また近年では、ヒトの劇症型レンサ球菌症の主要な原因菌であることも知られている。同じくブタのレンサ球菌症の原因となる *Streptococcus suis* (*S. suis*) は既に強毒な遺伝子集団が特定されており、人獣共通感染症として注目を集めている。一方で、*S. equisimilis* については遺伝子学的背景やブタ-ヒト感染の可能性について、ほとんど明らかになっていない。

本研究では、ヒト由来 *S. equisimilis* 株の病原性に関わる遺伝子について、ブタ由来株における保有状況の調査を行った。また Multi Locus Sequence Typing (MLST) を用いたブタ由来 *S. equisimilis* 株の分類およびヒト由来株との遺伝子類縁性の比較を行った。

【方法】 豚の関節膿瘍や心臓などから分離されたレンサ球菌野外株 20 株と基準株 5 株 (ATCC12388、ATCC12398、ATCC27957、ATCC43078、ATCC12344) の計 25 株について、3 遺伝子 (*slo*、*sagA*、*skcg*) の保有状況を調査した。さらにこのうち 10 株について、7 つのハウスキーピング遺伝子 (*gki*、*gtr*、*mur*、*mut*、*rec*、*xpt*、*ato*) の MLST を行った。解析後はヒト由来 *S. equisimilis* 株との塩基配列の比較、および系統樹解析を行った。

【結果と考察】 ブタ由来 *S. equisimilis* 株の中には、病原性に関わる 3 遺伝子を全て保有する株はなかった。ヒトの劇症型レンサ球菌症起因 *S. equisimilis* 株が *slo*、*sagA*、*skcg* の全てを保有しているのに対し、ブタにおいてこの 3 遺伝子全てを保有しない菌株も感染性もしくは病原性を示すと考えられる。

MLST では 7 遺伝子全てがヒト由来株の塩基配列と一致する株はなかったが、一部の遺伝子が一致する株は野外株で 4 株存在した。基準株を含むその他 6 株では 7 つの各遺伝子の塩基配列一致率は 88%以上と高いものの、完全に一致した遺伝子はなかった。このことから、ブタ由来株とヒト由来株の遺伝的系統は異なる可能性が高いと考えられる。

*S. suis* によるヒトのレンサ球菌症は、感染豚との接触や汚染生肉の摂取が主な感染経路である。しかし本研究の結果から、*S. equisimilis* においてはヒトがブタとの接触によりに感染し、劇症型レンサ球菌症に至る可能性は低いことが示唆された。今後は他の病原遺伝子の解析を進めるとともに、他の動物種や環境由来の *S. equisimilis* に対して同様の調査を行い、ヒトへの感染経路を明らかにする必要がある。

# 15 *Salmonella* Typhimurium DT104 が産生する ArtAB の RAW264.7 細胞に対する細胞内 cAMP 濃度上昇活性

○玉村 雪乃<sup>1</sup>、田中 聖<sup>1</sup>、内田 郁夫<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>動衛研北海道支所、<sup>2</sup>動衛研、<sup>3</sup>岐阜大院連獣

【目的】我々は *Salmonella* Typhimurium (ST) フェージ型 DT104 は Gi 蛋白質を含む百日咳毒素感受性 G 蛋白質を ADP-リボシル化する ArtA/ArtB (ArtAB) を産生することを明らかにしてきた (Saitoh et al. Microbiology 2005; Uchida et al. Microbiology, 2009)。精製 ArtAB はマウスへの腹腔内接種により致死活性を示す。今回、我々は ArtAB がマウスマクロファージ由来細胞である RAW264.7 細胞の細胞内 cAMP を上昇させる活性を有していることを見出したので報告する。【方法】DMEM で培養した RAW264.7 細胞に ArtAB を添加し、16 時間後、1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、10  $\mu$ M isoproterenol および 50  $\mu$ M の lysophosphatidic acid を含むバッファーを加え、37°C 15 分保温した後に細胞内 cAMP を測定した。cAMP の測定は cAMP EIA キットにより実施した。細胞膜分画中の Gi 蛋白質の ADP-リボシル化実験は、ArtAB で 16 時間処理した RAW264.7 細胞から調整した細胞膜分画とビオチン化 NAD を用いて実施した。【結果および考察】 $\beta$  受容体作動薬である isoproterenol を加えることにより、ArtAB の濃度依存的に細胞内 cAMP が増加した。濃度依存的 cAMP の増加は、lysophosphatidic acid の存在下でより顕著であった。また、ArtAB で処理した細胞から得た細胞膜分画の ADP-リボシル化反応において、培養液に添加した ArtAB の濃度に依存して in vitro で ArtAB によりリボシル化される細胞膜分画中の Gi 蛋白質量の減少が認められた。すなわち、ArtAB により RAW264.7 細胞内の Gi 蛋白質が in vivo で ADP-リボシル化されていることが確認された。以上のことから、ArtAB は百日咳毒素と同様に細胞内の Gi 蛋白質をリボシル化し、これにより Gi 蛋白質を介した cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼの抑制が阻害され、その結果細胞内の cAMP 濃度が上昇することが示された。

## 16\* 原始クラミジア *Parachlamydia acanthamoebae* Bn<sub>9</sub> の低温条件下におけるヒト上皮系細胞 HEp-2 内での増殖について

○瀧圭介<sup>1</sup>、山根千夏世<sup>1</sup>、山崎智拓<sup>1, 2</sup>、中村眞二<sup>3</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>北海道大学大学院 保健科学研究所、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC1、

<sup>3</sup>順天堂大学医学部形態解析イメージング

【目的】*Parachlamydia acanthamoebae* は、性感染症や呼吸器疾患を起こす病原性クラミジアの太古の姿を留めた偏性細胞内寄生性細菌と考えられている (以下原始クラミジア)。病原性クラミジアに比べ発育至適温度は 25-30°C と低く、37°C ではヒト株化細胞内では増殖できない。このことは、太古のクラミジアが温度ギャップを巧みに乗り越え、病原性クラミジアへと適応進化した可能性を示唆している。温度ギャップを乗り越えたプロセスは不明だが、ヒト細胞に感染後 37°C で細胞障害を惹起してしまう様な分子の喪失や基質特異性の変化により達成されたと考えられ、低温化ではヒト細胞内で原始クラミジアが活発に発育する可能性を暗示していた。予想通り、原始クラミジアは低温下 30°C において株化ヒト細胞 HEp-2 内で増殖することを見つけ以前の本学会にて報告した。一方、病原性クラミジアがヒト細胞に感染する際、アクチンの再重合や菌体の *de novo* 蛋白合成を要求する。さらに、セリンプロテアーゼの一種 CPAF をはじめ多くの分泌エフェクターも要求する。そこで原始クラミジアがヒト細胞内で増殖する際、病原性クラミジアと同様の分子を要求するか否かについて詳細に検討するとともに、ドラフトゲノム解析も行った。

【方法】原始クラミジア *P. acanthamoeba* Bn<sub>9</sub> (ATCC VR-1476: PaBn9) のヒト株化細胞 HEp-2 への感染後、cytochalasin D (アクチン重合阻害剤)、rifampicin (de novo 系蛋白合成阻害剤)、または lactacystin (CPAF 阻害剤) とともに最大 5 日間培養し、封入体形成 (TEM と共焦点レーザー)、感染率、生菌数 (AIU 法) と 16SrRNA の転写産物量生菌数 (リアルタイム RT-PCR) の推移をモニターした。ドラフトゲノム解析は、抽出したゲノム DNA から約 1kbp 程度のインサートライブラリーを構築し、ライブラリーよりリードを Illumina GAIIx にて取得し、ABYSS-pde (v1.2.0) によりアッセンブルした (北海道システムサイエンスに委託)。ゲノム上遺伝子の抽出とアノテーションは RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) にて行った。

【結果・考察】30°C 低温条件下において、PaBn<sub>9</sub> 特異的菌体クラスターが、核周囲に観察された。37°C では、菌体の核周囲への移動は観察されたが、クラスター形成は認められなかった。この菌体クラスター形成は、cytochalasin D、rifampicin、または lactacystin の添加で抑制された。興味深いことに、病原性クラミジアが細胞内に形成する典型的な封入体は確認できなかった。PaBn<sub>9</sub> ドラフトゲノム配列からは、病原性クラミジアと同様に III 型分泌装置をコードする遺伝子クラスターが確認された一方、封入体形成に必須である Inc 蛋白をコードする遺伝子を見つけ出せなかった。これらの結果より、原始クラミジア PaBn<sub>9</sub> 株が、病原性クラミジアと同様にヒト細胞内で増殖する能力を備えていることが明らかになった。太古のクラミジアがヒト細胞に適応する過程で、温度ギャップを乗り越えることが重要な要因であった可能性が示唆された。

## 17\* *Chlamydia trachomatis* 男性生殖器分離株における多型性外膜タンパク F (PmpF) の系統学的な特徴

○山川和也<sup>1</sup>、山崎智拡<sup>1,2</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>北海道大学大学院 保健科学研究院、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC1

【目的】 偏性細胞内寄生性細菌である *Chlamydia trachomatis* は、性感染症の原因菌として知られている。一方、生殖器での *C. trachomatis* 感染症の実態調査の主体は女性生殖器膣頸管部からの検出頻度の調査や株化された *C. trachomatis* の性状解析であり、解剖学的にも生理機能の面からも異なる男性生殖器で *C. trachomatis* が生存維持されることが、女性生殖器への感染にどのような影響を与えるのかいまだ不明な点が多く、男女生殖器から株化された *C. trachomatis* の詳細な比較解析が必要である。一方、*C. trachomatis* 外膜には、V型分泌装置と予想される9つの多型膜蛋白質 Pmp (polymorphic membrane protein) A-I が存在するが、近年の研究にて特に PmpF の多型が他の Pmp に比べ顕著であることが分かってきた。そこで本研究では、解剖学的あるいは生理機能学的な違いから男女間での *C. trachomatis* の特性に差異が生まれるか否かについて検証することを目的として、男性ならびに女性生殖器から株化された *C. trachomatis* の多型性外膜蛋白質 Pmp F の多型について、増幅した遺伝子配列を元に比較解析を実施した。

【方法】 菌株: 日本サーベランス委員会より購入した非淋菌性尿道炎男性患者より株化された *C. trachomatis* (n=12) を対象とした。以前私達が札幌にて株化した女性子宮頸管分離株 (n=11) も対象とした。PmpF配列の取得: 菌体からのゲノムDNAをQIAmp DNA Mini キットにて抽出し、PCRにて約 3kbpの *pmpF* 全長を増幅し、ダイレクトシーケンスにて配列を取得した。またNCBIデータベースより、国外の男性直腸分離株 (n=7) と女性子宮頸管分離株 (n=12) の *pmpF* 配列情報も取得した。系統解析と配列保存性の検証: 系統解析は、MEGA5を用いた近隣結合法にて行い、配列保存性は、MAFFT7を用いて算定・可視化した。構造予測: PmpF蛋白質の構造は、SMARTにて構築した。

【結果及び考察】 系統学的に3つのクラスターに分かれた。全てのクラスターにそれぞれ日本の女性子宮頸管分離株、国外の男性直腸分離株、国外の女性子宮頸管分離株は存在していたが、日本の男性生殖器分離株はクラスター1、2のみに存在していた。興味深いことに PmpF の N 末端から約 800 残基(外膜から外側に突き抜けたパッセンジャー領域)にかけて、日本の男性生殖器分離株は、他の株と比べて多様性が少なかった。これらの結果より、PmpF(パッセンジャー領域)は、系統学的なマーカーとして有用であると考えられた。日本の男性生殖器分離株はユニークなクラスターを形成している可能性もあり、細菌叢の選択圧に適合していないことも予想される。非会員共同研究者：高橋聡 (札幌医科大学医学部泌尿器科)

## 18\* GFP 発現 *Chlamydia trachomatis* 変異株の確立

○山崎智拡<sup>1, 2</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、大久保寅彦<sup>1</sup>、中村真二<sup>3</sup>、山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院・保健科学研究所・病態解析学分野、<sup>2</sup>日本学術振興会特別研究員 DC、<sup>3</sup>順天堂大学・医学部・形態解析イメージング研究部門

【目的】 偏性細胞内寄生性細菌 *Chlamydia trachomatis* は、世界中で最も流行している性感染症の原因菌である。私達も、札幌において健康な妊婦の約 14% ( $n=280$ ) が、*C. trachomatis* に感染していることを報告している(Yamazaki et al., BMC Infect Dis, 2012)。感染者の多くは無症候性であり、無治療放置されることで卵管閉塞や骨盤内感染へと移行し、不妊の原因となるので、*C. trachomatis* の病態形成機構の解明は極めて急務な研究課題である。しかしながら、シャトルベクターやクローニング法がないので *C. trachomatis* の遺伝子導入・組み換え株を構築することができず、その分子機序は厚いベールに包まれたままである。そのような中で、Wang らは、一般的に汎用されている大腸菌プラスミドに *C. trachomatis* の潜在的プラスミドをその *ori* を含め挿入することで、大腸菌とクラミジア間のシャトルベクターを構築し、そのベクターを用いて GFP 発現クラミジアの確立に成功した(Wang et al., PLoS Pathog, 2011)。そこで本研究では、Wang らの方法に従い *C. trachomatis* GFP 発現株を構築し、方法論の妥当性について検証することにした。

【方法】 *C. trachomatis* L2-434/Bu から抽出した潜在的プラスミド pL2(約 7kbp)を大腸菌の  $\bullet$ -ラクターマーゼ産生領域を有する pUC19 プラスミドとライゲーションし、大腸菌 Top10 に導入した (pL2-UC19)。pEGFP-C1 プラスミドの EGFP 領域とマルチクローニングサイトに加えて、*C. trachomatis* L2-434/Bu IncD プロモーター領域を pL2-UC19 にライゲーションし、形質転換用プラスミドとした (pL2-UC19-IncD\_prom-EGFP-C1)。 *C. trachomatis* L2-434/Bu を  $\text{CaCl}_2$  Buffer で処理し、pL2-UC19-IncD\_prom-EGFP-C1 プラスミドを加え、室温でインキュベートした後、HeLa 細胞に遠心感染させた。2 日間培養後、新たな HeLa 細胞に再感染させ、ペニシリンで選択した。このサイクルを 6-8 回繰り返す、遺伝子導入株を得た。遺伝子導入の成否は、顕微鏡下での封入体表現形の観察と蛍光の有無で判断した。プラスミドの導入と GFP の発現は PCR とウエスタンブロットにでも確認した。

【結果と考察】 Wang らの方法にて、GFP 発現株を構築できることが確認された。その一方で、ペニシリンでの選択に必要な日数が 2 週間と長く、また形質転換効率も良くない。大腸菌プラスミドへと挿入するプラスミド pL2 領域をより厳選するなど、さらなる工夫が必要である。現在、この変異体を利用し、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て絞り込んだ *C. trachomatis* 新規分泌エフェクターの感染細胞内での局在について検討を進めている。

# 19 院内環境から株化したアメーバ共生原始クラミジアの ヒト株化細胞への二次感染能と炎症誘導能について

○松尾淳司<sup>1</sup>、中村眞二<sup>2</sup>、大久保寅彦<sup>1</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>順天院・医・形態解析イメージング

【目的】偏性細胞内寄生性細菌 *Parachlamydia acanthamoebae* は、土壌や河川水などの様々な自然環境に普遍的に生息するアカントアメーバ(以下アメーバ)に共生する原始的なクラミジアの一種である。*Parachlamydia* のヒトへの病原性はまだ十分に理解されていないが、院内肺炎や流産との関連性が報告されている。そのため *Parachlamydia* は、適切な院内環境を構築する上で、考慮すべき院内感染症起因菌となりうる可能性がある。我々はこれ迄に、遺伝子検出系を用いて靴底についた土壌を介して *Parachlamydia* がアメーバと共に院内に持ち込まれている様子を明らかにしてきた (Fukumoto ら, J Clin Microbiol, 2010)。そこで本研究では、院内環境の拭き取り検体から培養系を用いて原始的なクラミジアが共生するアメーバを株化すると共に、株化したアメーバに共生していた *Parachlamydia* 近縁種 *Protochlamydia* W9 株のアメーバならびにヒト株化細胞へ二次感染能力およびヒト株化細胞への炎症応答誘導能力について検討した。

【方法】アメーバの株化: 北海道大学病院の床と水周りより採取した拭き取り液 50 検体を対象とした。検体は、大腸菌死菌塗布寒天培地中央にスポットし、餌を求め這い出したアメーバを顕微鏡下で拾い上げ株化した。株化アメーバ中 *Parachlamydia* の存在は、DAPI染色とPCR(増幅産物は配列を決定)にて検証した。二次感染能力について: 株化アメーバより回収した原始クラミジア *Protochlamydia* W9 株をC3 アメーバ標準株に感染させ、経日的 (5 日間)にクラミジア遺伝子量(16S rRNA)とDAPI染色による感染状況をモニターした。またヒト株化細胞 (THP-1、HEp-2)への感染性についても同様に検討した。炎症応答誘導能: *Protochlamydia* W9 株菌体刺激によるヒト株化細胞からの炎症性サイトカイン (IL-8) の産生誘導についてリアルタイムPCRにて検討を行った。また *Parachlamydia* Bn<sub>9</sub> 株 (ATCC VR-1476) についても対象として同様に実験を行った。

【結果・考察】院内環境から 21 クロンのアメーバの株化に成功した。アメーバ 3 株から共生細菌が見出され、分子系統解析からその一株には *Parachlamydia* 近縁種(*Protochlamydia*) が共生していた。*Protochlamydia* W9 株は、C3 アメーバに二次感染したが、いずれの株化ヒト細胞にも感染できなかった。その一方で、*Protochlamydia* W9 株菌体刺激によるヒト株化細胞において炎症性サイトカインの IL-8 mRNA の発現が誘導されることを見いだした。これらの結果は、環境より靴底についた土壌と共に院内へと持ち込まれた *Protochlamydia* W9 株が、アメーバを介して院内に拡散するとともに、その菌体刺激が炎症性サイトカインの誘導を介して、ヒトに炎症を惹起する可能性が示唆された。〔非会員共同研究者：福元達也、小栗聡、秋沢宏次、渋谷齊、清水力 (北大病院・検査・輸血部)〕

## 20\* 原始クラミジア *Neochlamydia* S13 が共生する

### アメーバはレジオネラを撃退する：トランスクリプトーム解析による責任遺伝子の探索

○米田千夏<sup>1</sup>、松尾淳司<sup>1</sup>、山崎智拓<sup>1,2</sup>、大久保寅彦<sup>1</sup>、中村眞二<sup>3</sup>、永井宏樹<sup>4</sup>、山口博之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院・保科・病態解析、<sup>2</sup> 日本学術振興会特別研究員 DC1、

<sup>3</sup> 順大院・医・研究基盤センター、<sup>4</sup> 阪大微研

【目的】原始クラミジア *Neochlamydia* S13 はアカントアメーバ(以下アメーバ)に共生する偏性細胞内寄生性細菌である。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。一方、私達は、*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)が増殖できないことを見つけた(Ishida *et al.*, PLoS ONE, 2014)。除菌アメーバでは増殖可能であることから、*Neochlamydia* S13 が共生するアメーバ細胞質に打ち込む何らかのエフェクター分子が、直接あるいは間接的に Lp の感染を阻止していると考えられた。*Neochlamydia* エフェクターの標的分子は不明だが、アメーバ内での Lp の増殖に必須である Lp IV 型分泌エフェクター分子をその標的候補と予想している。そこで本研究では、GFP を発現する Lp を用いて、アメーバへの Lp 感染の可否を正確に可視化した上で、Lp 野生株と IV 型分泌装置欠損株をそれぞれ *Neochlamydia* S13 共生アメーバに感染させ、野生株感染時にのみ発現上昇する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により探索した。

【方法】菌株とアメーバ: GFP発現Lp666 株(野生株)とLp667 株(IV型分泌装置欠損株)を用いた。アメーバには、*Neochlamydia* S13 共生アメーバ(S13WT)、*Neochlamydia* S13 除菌アメーバ(S13RFP)、Lp感受性のC3 アメーバを用いた。感染: 感染は各アメーバにそれぞれにLp666 とLp667 を 4 時間感染させた後、ゲンタマイシン処理を 30 分間行い、30°Cで培養した。感染の有無は、蛍光顕微鏡下で直接判定し、一部の検体は、共焦点レーザー顕微鏡にてさらに精査した。感染 20 時間目のLp666 とLp667 感染S13WTアメーバからはRNAを抽出した。DNAマイクロアレイ: *Neochlamydia* S13 ドラフトゲノム(BASK01000001-01001342)から予測されたORF情報を元にプローブをデザインした。プローブデザイン、ハイブリダイゼーション、解析は、北海道システムサイエンスに委託した。

【結果・考察】Lp666 が S13WT アメーバを除く他のアメーバに感染し、Lp667 はすべてのアメーバに感染しないことを蛍光顕微鏡観察により確認した。DNA マイクロアレイ解析の結果、Lp666 感染 S13WT アメーバで特異的に発現が上昇する複数の遺伝子を見つけた。トップヒットした候補遺伝子は、アクチン重合の促進に関与するドメインをコードしていた。予備的な所見ではあるが、*Neochlamydia* S13 を除菌すると、アメーバのアクチン重合が抑制されることを示唆するような 2D-DIGE と質量分析結果が得られている。

非会員共同研究者：松下瑞江<sup>1</sup>

## 21 北海道内で臨床より分離された *Aspergillus fumigatus*

### の抗真菌薬感受性評価

○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

近年の欧州を中心としたアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* の出現は大きな懸念をもたれている。これらアゾール耐性 *A. fumigatus* 出現には大きく分けて二つのメカニズムが考えられている。一つは長期の治療による選択で生じる耐性株である。もう一つ提唱されている耐性株出現のメカニズムとして、環境中で農薬として用いられるアゾール系抗真菌薬使用による選択で生じる耐性株である。耐性株出現と農薬の関連性は十分に明らかとなっていないが、日本においてもこのような耐性 *A. fumigatus* が出現する可能性があることから、注意深くまた継続的に環境由来や臨床分離の *A. fumigatus* の感受性をモニタリングしていかなければならない。

本研究では北海道内の医療機関で分離された *A. fumigatus* 延べ 20 株について、アゾール系抗真菌薬を含めて、抗真菌薬感受性について検討を行った。

その結果、48 時間後判定においてポリコナゾールの最小発育阻止濃度が 2 µg/mL の株が 1 株認められた。この 1 株についてアゾール耐性に重要な *cyp51A* 遺伝子およびその上流と下流の塩基配列を決定したが、欧州で分離された耐性菌ですでに知られている塩基置換やタンデムリピートの挿入は認められなかった。

これらの結果から、いまだ欧州で懸念されているような耐性株は見られていないが、今後も継続的なモニタリングが必要と考えられる。

## 22 \* Detection of *pncA* gene mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar

○Nan Aye Thida Oo, Lai Lai San, Chie NAKAJIMA, Yasuhiko SUZUKI

Lab. Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control,  
Hokkaido University

ayethidaoo@czc.hokudai.ac.jp

**Background:** Pyrazinamide (PZA) is a first line anti-tuberculosis drug and included in both short course and multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) treatment regimens. It is a pro-drug and needed to be converted to active form by the mycobacterial enzyme pyrazinamidase which is encoded by *pncA* gene. Numerous studies reported that mutations in the *pncA* gene was responsible for PZA resistance by reducing or losing PZase activity in *M. tuberculosis*. The aim of present study was to detect the frequencies and patterns of *pncA* mutation among MDR-TB strains isolated in Myanmar.

**Method:** Clinical MDR-TB isolates were collected and PCR amplification and DNA sequencing of *pncA* genes were carried out to detect mutations.

**Results:** Of 369 isolates, *pncA* gene was amplified by PCR with 244 samples were amplifiable for and 233 samples (63.1%) were processed for DNA sequencing. Mutations in *pncA* gene were identified in 101 (43.3%) isolates, while 132 (56.7%) samples had wild type sequences. A total of 71 different types of mutation were dispersed on the *pncA* gene and forty-four of which were found to be novel mutations. Fifty-six types of point mutation (n= 84, 78.8 %) were due to amino acid substitutions and constituted for major mutation. Twelve frame shift mutations (n=12, 17.0%) and three putative regulatory region mutations (n=5, 4.2 %) were also identified.

**Conclusion:** This study showed that there were new and diverse mutations on *pncA* gene in MDR-TB isolates from Myanmar. Further studies of correlation between mutations in *pncA* gene and alteration of pyrazinamidase activity are needed. Mutation patterns of *pncA* gene can be applied for the future development of rapid genotypic PZA susceptibility assays which can lead to great achievement in tuberculosis treatment and control strategies.

## **23 \* MIRU-VNTR Typing of Beijing MDR-TB strains**

### **from Myanmar**

○Lai Lai San, Nan Aye Thida Oo, Chie NAKAJIMA,

Yasuhiko SUZUKI

Div. Bioresources, Research Center for Zoonosis Control,  
Hokkaido University.

#### **Introduction**

Myanmar is one of the countries with the highest burden of tuberculosis (TB) as well as multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in the world. According to the previous studies on genotyping in Myanmar pointed out that the Beijing strain has significant association with MDR-TB. The active transmission of MDR-TB strains is the emerging problem and it is necessary to find out some characteristics that can explain why MDR-TB Beijing strain keep spreading widely.

#### **Method and Results**

A total of 73 Beijing MDR-TB isolates collected from Myanmar in 2005 was done for variable number of tandem repeat(s) of mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU-VNTR) typing. These isolates were identified as Beijing type by spoligotyping and genotypic analysis of drug resistant was done previously. In this study 15 loci of MIRU-VNTR ( QUB26, Mtub21, MIRU31, MIRU10, QUB11b, MIRU26, MIRU4, MIRU39, MIRU40, Mtub4, QUB4156, Mtub30, MIRU39, ETR A, MIRU16) were used to discriminate the Beijing spoligotype. High diversity of Beijing spoligotype MDR-TB was observed by bionumeric software analysis. HGDI analysis of 15 MIRU loci showed that QUB26, MIRU21 and Mtub31 loci were highly discriminative. There was association of clustering and drug resistant mutation pattern. The significant one was that 4 isolates (Myan-8, 10, 16, 45) were in same cluster having same drug resistant mutation characteristics.

#### **Conclusions**

This study provides the MDR-TB population structure in Myanmar. VNTR set used in this study is predicted to be useful for the discrimination of MDR-TB Beijing genotype and effective for the determination of transmission pattern of MDR-TB in Myanmar.

## **24 \* Investigation of *Leptospira* infection and its circulation in one intensive-type water buffalo farm in the Philippines: its economic and zoonotic implications**

○Marvin A. Villanueva<sup>1</sup>, Claro N. Mingala<sup>2</sup>, Nina G. Gloriani<sup>3</sup>, Nobuo Koizumi<sup>4</sup>, Yasutake Yanagihara<sup>5</sup>, Chie Nakajima<sup>1</sup>, Yasuhiko Suzuki<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Animal Health Unit, Philippine Carabao Center, Muñoz, Nueva Ecija, Philippines

<sup>3</sup>Department of Medical Microbiology, College of Public Health, University of the Philippines–Manila, Manila, Philippines

<sup>4</sup>Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

### Objectives

Water buffalo is an indispensable livestock in the Philippines as a source of income to the rural farming communities and its suitability in hot and humid climate. Leptospirosis is a serious zoonosis in the country which can be fatal to humans and cause reproductive problems on livestock. *Leptospira* infection on buffaloes has been already reported, with the importance of intensive farming on its contribution in clinical disease prevalence. However, limited studies on leptospirosis in buffaloes exist in the Philippines. In this study, we collected sera and urine from buffaloes (n=170) at different age groups and locations and rats (n=21) in one major intensive-type buffalo farm in the country. The serum samples were subjected to antibody detection by the microscopic agglutination test (MAT) while the urine samples were subjected to nested PCR followed by nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. MAT revealed 48% of the buffalo sera agglutinated multiple *Leptospira* strains, where serogroups Hebdomadis, Mini, Sejroe, Pyrogenes and Tarassovi were predominantly agglutinated. Rat samples showed 30% seropositive with predominantly reactive serogroups Javanica, Mini and Icterohaemorrhagiae. Both animals contained antibodies against serogroups Javanica, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Mini. Nested PCR targeting *lipL32* and *flaB* genes found positive in 29.4% and 28.8% in buffalo and 38% and 9.5% in rat urine samples. Nucleotide sequencing revealed similar sequences to pathogenic *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri* in both animals. Moreover, clustering of sequences from both animals was found, indicating infection with closely related leptospire. Age groups and movement of animals were associated with *Leptospira* transmission. Furthermore, different *Leptospira* sequences were found in single animals, suggesting multiple mixed infections. This study highlighted the importance of water buffalo on its possible role in the persistence of leptospirosis in the Philippines, at least in the level of intensive farm setting. Unless further studies and appropriate control strategies are initiated, economic loss on buffalo industry and a threat to public health by this zoonosis will remain.