

第85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 30 年 9 月 8 日

会場：酪農学園大学 中央館 学生ホール

〒003-0833 江別市 文京台緑町 582番地

総会長：内田 郁夫（酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医細菌学ユニット教授）

協 賛：ミヤリサン製薬株式会社

第 85 回 日本細菌学会北海道支部学術総会

総会長： 内田 郁夫（酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医細菌学ユニット・教授）

開催概要

会期： 平成 30 年 9 月 8 日（土曜）

時間： 8：30～17：30（予定）

会場： 酪農学園大学 中央館 学生ホール

〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地

特別講演

耐性菌時代の新戦略

1. ファージ療法の基礎と応用

丹治 保典（東京工業大学 教授）

2. 獣医療におけるファージ療法の可能性

岩野 英知（酪農学園大学 教授）

事務局： 〒番号 069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地 酪農学園大学 獣医学群
獣医学類 獣医細菌学ユニット 村田 亮

Tel.(011)388-4899

E-mail. hokkaido85bacteria#gmail.com（#→@に書き換えて送信して下さい）

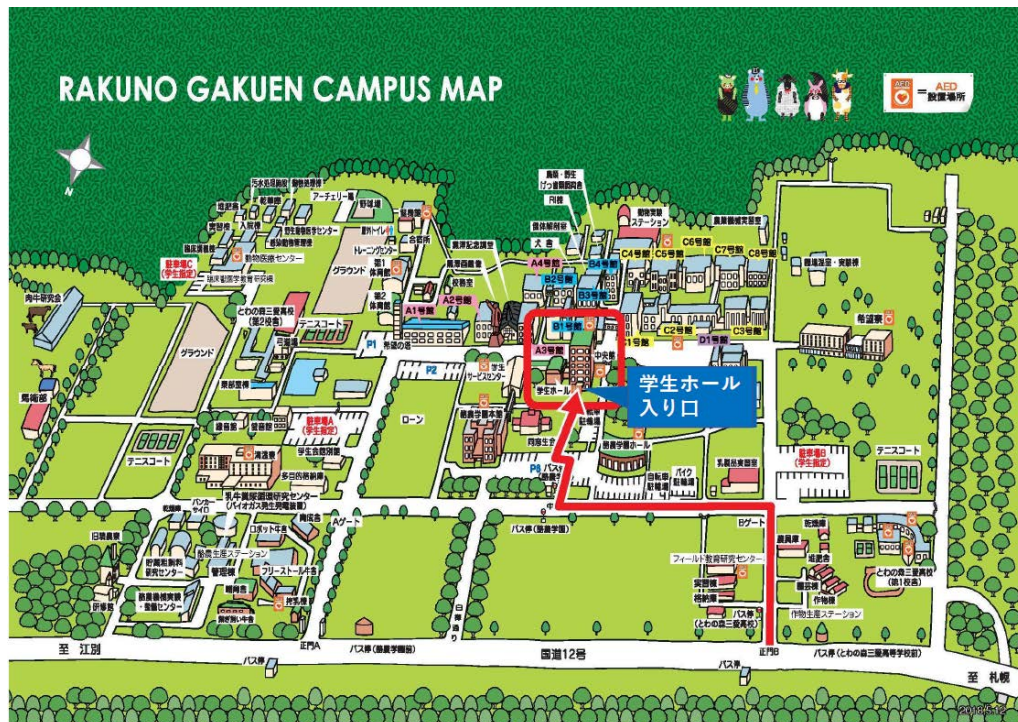
情報交換会：（参加費 4,000 円）。

※ 情報交換会参加者の人数を大まかに把握したいので、情報交換会に出席予定の方はその旨を事務局・（下記参照）まで、あらかじめメールにてお知らせいただくと助かります。
筆頭縁者の方は、演題申込のメールに情報交換会出欠予定をお知らせください（演題申込参照）。

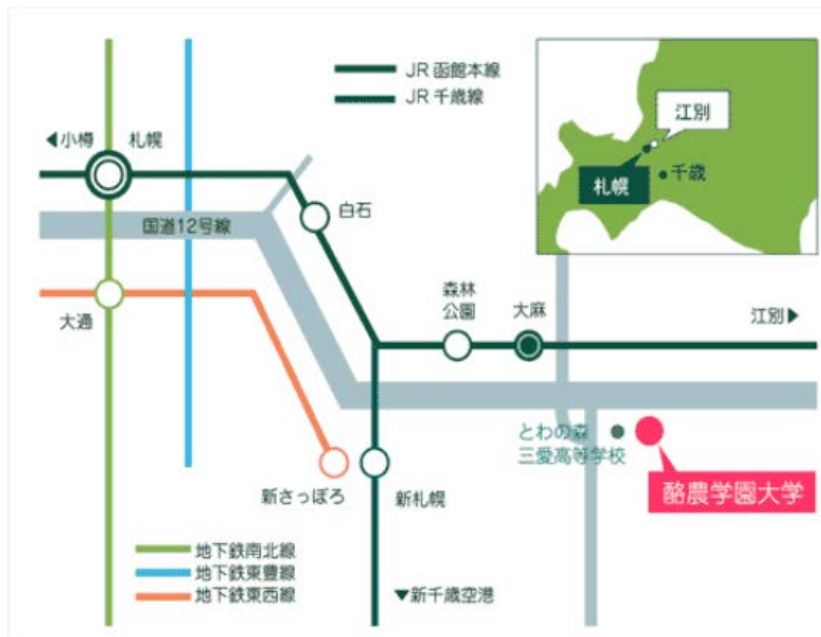
会場案内

酪農学園大学 学生ホール

〒番号 069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地（大麻駅南口から徒歩 15 分）



アクセス



演題申込について

- 一般演題のみの申し込みとなります。
- 講演要旨受付は、平成 30 年 7 月 14 日締め切りとさせていただきます。
- 要旨原稿は、E メール・添付書類にて事務局担当・村田まで送ってください。
- メールタイトルの「支部会抄録原稿」という文言を入れるようにしてください。
- メール受信後 2～3 日以内に、必ず「原稿受領確認のお知らせ」を返信いたします。「原稿受領確認のお知らせ」のメールが届かない場合は、何らかの異常により要旨原稿が届いていない可能性があるため、再度下記連絡先までメールを送るようにしてください。

E メール送付先

E-mail. hokkaido85bacteria#gmail.com

(#→@に書き換えて送信して下さい)

- **発表者が学生、ポスドク、助教の場合は、要旨を送付する際にメール本文に 日本細菌学会北海道支部会賞の選考対象者である と記入してください。**
- 情報交換会出席者の人数を大まかに把握したいので、情報交換会出席についてメール本文に「情報交換会出席予定」「情報交換会欠席予定」などと記載してください。情報交換会の参加費は 4,000 円を予定しております。

要旨原稿について

- 原稿は、Microsoft Word で、A4 版 1 枚に収まるように作成してください。
- 余白については、Microsoft Word で「白紙の文書」を新規作成したときの初期設定のままをお願いします（標準設定で、上は 35.01mm、下と左右はそれぞれ 30mm になっています）。
- タイトル、発表者および共同研究者の氏名、それぞれの所属を上から順に太字で記載し、フォントサイズはタイトルのみ 18 ポイント、それ以外は全て 12 ポイントにしてください。
- 発表者の氏名の前に○印をつけてください。
- 共同研究者の所属が異なる場合は、氏名の右上に番号をつけ、所属機関の左上にその番号を記載して下さい。
- 日本語のフォントは MS 明朝、英語のフォントは Times New Roman にしてください。
- 文書の体裁は、必要に応じて適宜改変させていただく可能性がありますが、ご了承ください。

参加申込について

事前参加登録は必要ありません。当日会場にお越しになり、参加費用等をお支払い下さい。

場所： 酪農学園大学学生ホール入り口

参加費： 無料（予定） *支部会のみ入会されている方などは下記参照

情報交換会費： 4,000 円

※ 情報交換会参加者の人数を把握したいので、情報交換会に出席予定の方はその旨を事務局・村田（下記参照）まで、あらかじめメールにてお知らせいただくと助かります。筆頭縁者の方は、演題申込のメールに情報交換会出欠予定をお知らせください。

E メール送付先 hokkaido85bacteria#gmail.com (#→@に書き換えて送信して下さい)

参加費用について

※ 支部会のみに入会されている方、または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

プログラム（講演要旨集）について

学会当日受付にて配布させていただきます。

発表について

- 発表時間は、発表 8 分、質疑 2 分（演者交代時間を含む）の予定です。
- 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 ピンとなりますので、コネクターが必要な場合はご持参ください。

プログラム概要

時 間	セッション (座長)	演題番号	氏名	所属
8:30	開会の挨拶			
8:40	セッション1 (内田郁夫)	1	原田咲	酪農大 獣医・食品衛生
8:50		2	臼井優	酪農大 獣医・食品衛生
9:00	セッション2 (大久保寅彦先生)	3	片方美智子	酪農大 獣医・獣医衛生
9:10		4	西航司	酪農大 獣医・獣医衛生
9:20		5	権平智	酪農大 獣医・獣医衛生
9:30		6	安田元昭	北大院 歯・口腔分子微生物
9:40		7	佐伯歩	北大院 歯・口腔分子微生物
	休憩 (10分)			
10:00	セッション3 (臼井優先生)	8	長谷川貴生	北大院 保科・病態解析
10:10		9	田中菜那	北大院 保科・病態解析
10:20		10	大久保寅彦	北大院 保科・病態解析
10:30		11	北名純也	酪農大 獣医・生化
10:40		12	高橋宏充	酪農大 獣医・生化
10:50		13	藤木純平	酪農大 獣医・生化
	休憩 (10分)			
11:10	特別講演 (田村豊先生)	14	岩野英知	酪農学園大学
11:30	評議会・監事会 (60分)			
12:30	総会 (60分)			
13:30	特別講演 (田村豊先生)	15	丹治保典	東京工業大学
	休憩 (10分)			
14:20	セッション4 (佐藤豊孝先生)	16	Charitha Mendis	北大 人獣・バイオリソース
14:30		17	Precious Bwalya	北大 人獣・バイオリソース
14:40		18	Nan Aye Thida Oo	北大 人獣・バイオリソース
14:50		19	Lai Lai San	北大 人獣・バイオリソース
15:00		20	Thoko Flav Kapalamula	北大 人獣・バイオリソース
	休憩 (10分)			
15:20	セッション5 (権平智先生)	21	大内勇樹	北大 人獣・バイオリソース
15:30		22	小出健太郎	北大 人獣・バイオリソース
15:40		23	佐藤豊孝	札医大 医・微生物
15:50		24	古田芳一	北大 人獣・感染免疫
16:00		25	本田宏幸	札医大 医・呼吸器アレルギー内科
	休憩 (10分)			
16:20	セッション6 (藤木純平先生)	26	渡辺颯太	北大院 保科・病態解析
16:30		27	安島菜実	酪農大 獣医・細菌
16:40		28	邱永晋	北大 人獣
16:50		29	富澤颯太	酪農大 獣医・環境衛生
17:00		30	鷺見優斗	北大院 保科・病態解析
17:00	表彰式～閉会の挨拶 (30分)			
19:00	情報交換会 (120分) : 札幌駅			

消毒薬の繰り返し曝露が persister レベルに及ぼす影響

○原田 咲¹, 臼井 優¹, 中島 千絵², 鈴木 定彦², 田村 豊¹

¹酪農大 獣医・食品衛生, ²北大 人獣・バイオリソース

【背景と目的】Persister 状態とは、抗菌薬の曝露下で細菌の集団の一部が休眠状態を選択し、複数の抗菌薬に対し寛容性を示すことによる細菌の生存戦略であり、慢性細菌感染症、再感染の原因になることが問題視されている。近年、アミカシン(AMK)を含むアミノグリコシド系抗菌薬の高濃度繰り返し曝露が大腸菌の persister レベルを上昇させることが報告された。消毒薬は抗菌薬以上に医療、畜産現場において繰り返し使用されており、消毒薬の高濃度繰り返し曝露が persister レベルを上昇させ、細菌感染症に対する抗菌薬での治療を困難にしている可能性がある。そこで消毒薬の繰り返し曝露が、細菌の persister レベルを上昇させているかを明らかにするため、大腸菌をモデルとして *in vitro* における繰り返し曝露試験を実施した。

【材料および方法】病原性のある大腸菌 LF82 に対し、7 種類の消毒薬について複数濃度を曝露し、濃度依存性の生菌数を測定した。曝露に対し細菌が寛容性を示した 2 つの消毒薬トリクロサン(TRI)、クロルヘキシジン (CHX) を使用し、MIC の 5 倍～80 倍の濃度で 10 回の繰り返し曝露試験を行い、経時的な persister レベルを測定した。さらに 10 回繰り返し曝露後の菌を用い、性状解析を実施した。

【結果および考察】LF82 に対し第四級アンモニウム塩、塩素系消毒薬、色素系消毒薬は寛容性を示さなかった(persister を形成しなかった)ことから、これらの消毒薬は抗菌薬に比べ、persister 形成をし難いことが明らかとなった。また、コントロールとして使用した AMK に比べ、TRI と CHX は 10 回繰り返し曝露試験による persister レベルの上昇速度が遅かった。10 回繰り返し曝露後の選択株で MIC の上昇はいずれの消毒薬でも認められなかったことから、耐性化はしていないことがわかった。TRI(MIC の 50 倍の濃度)と CHX(MIC の 5 倍の濃度)曝露による選択株に関しては、同じ濃度で再曝露を行うと、繰り返し曝露前の親株と比べて AMK の選択株と同様に経時的な生菌数の上昇がみられた。以上のことから、TRI や CHX は繰り返し曝露を行うことで persister レベルを上昇させることが示唆された。なお、繰り返し曝露後の菌の更なる性状については現在解析中である。

バイオフィーム中における大腸菌persister制御の ためのトスフロキサシンとSOS反応阻害剤の可能性

○臼井優¹、横尾勇人¹、田村豊¹、中島千絵²、鈴木定彦²、

Jean-Marc Ghigo³、Christophe Beloin²

¹酪農大 獣医・食品衛生、²北大 人獣・バイオリソース、

³Institut Pasteur, Genetics of Biofilm Unit

【背景】

慢性感染症や細菌感染症の再発と persister（抗菌薬に対して寛容性を示す状態）の関連が明らかとなっており、persister の制御が課題となっている。特にバイオフィーム中は、persister が高頻度となることから、バイオフィーム中における persister の制御は重要である。これまで、大腸菌 persister に対して有効とされる抗菌薬は報告されてきたが、その評価は浮遊細菌を用いたものであり、バイオフィーム中における persister に対しての有効性は評価されていない。そこで今回、バイオフィーム中における大腸菌 persister に対して有効な抗菌薬を探索した。加えて、SOS 反応がフルオロキノロンに対する persister レベルを上昇させている可能性が示されていることから、SOS 反応阻害剤によるフルオロキノロンに対する persister レベルの減少の可能性について調べた。

【材料と方法】

バイオフィーム中の大腸菌に対して、MIC の 80 倍の濃度の複数の抗菌薬をそれぞれ暴露し、暴露後の生存割合を算出した(survival assay)。次に、SOS 反応欠損株及び SOS 反応阻害剤として酢酸亜鉛を添加した際の、バイオフィーム中におけるフルオロキノロンに対する survival assay を実施した。

【結果と考察】

試験に用いた抗菌薬のうち、ポリミキシン B がバイオフィーム中大腸菌 persister レベルを最も減少させた（有効であった）。フルオロキノロンもバイオフィーム中 persister に対して比較的有効であり、中でもトスフロキサシンは他の抗菌薬に比べて低い persister レベルを示した。SOS 反応欠損株のフルオロキノロンに対する persister レベルは、野生型に比べて低く、フルオロキノロンに対する persister と SOS 反応は関与していた。また、酢酸亜鉛の添加により、バイオフィーム中においてフルオロキノロンに対する persister レベルは減少した。以上のことから、トスフロキサシンと酢酸亜鉛の combination は、バイオフィーム関連感染症の制御に効果的であることが示唆された。

Mycoplasma bovis のウシ滑膜細胞に対する侵入と局在

○片方 美智子¹, 西 航司¹, 根布 貴則¹, 藤木 純平²,

岩野 英知², 岩崎 智仁³, 権平 智¹, 樋口 豪紀¹

¹酪農大 獣医・獣医衛生, ²酪農大 獣医・生化, ³酪農大 応用生化

【背景および目的】*Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) は、牛に乳房炎、肺炎、関節炎など経済的損失の大きな疾病を引き起こす病原体である。マイコプラズマ関節炎は重篤な臨床症状を呈し、難治性の病態に移行することが報告されている。しかしながら、マイコプラズマ関節炎の病態形成のメカニズムについては十分に解明されていない。そこで、本研究ではウシ滑膜細胞に対する *M. bovis* の細胞内における局在を明らかにすることを目的とし、*M. bovis* の細胞内菌数の測定およびその局在の観察を試みた。

【材料および方法】(1) 滑膜細胞は、3 ヶ月齢ホルスタイン種子牛 5 頭の左手根関節から分離した。(2) 滑膜細胞に *M. bovis* を感染多価 (MOI) 0.1 で接種し、ゲンタマイシン処理後、培養上清および滑膜細胞それぞれの *M. bovis* の菌数を測定した。(3) *M. bovis* および細胞骨格タンパクであるビメンチンの特異抗体を用いて蛍光免疫染色を実施後、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下で滑膜細胞内における *M. bovis* の局在を観察した。

【結果】(1) 滑膜細胞と *M. bovis* の共培養において、*M. bovis* 生菌数の増加が認められた一方、滑膜細胞の非存在下では *M. bovis* 生菌数の減少が認められた。

(2) ゲンタマイシン処理直後の細胞培養上清中に *M. bovis* は検出されなかったが、滑膜細胞から *M. bovis* が検出された。(3) 蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡下において、滑膜細胞内における *M. bovis* の局在が認められた。

【考察】滑膜細胞の存在が *M. bovis* の増殖能に影響を及ぼすことが明らかとなり、また、*M. bovis* は滑膜細胞内に局在することが明らかになった。また、それらは時間経過に伴い細胞外 (培養上清中) へ移行することが示唆された。*M. bovis* が滑膜細胞内に侵入することにより宿主の免疫応答を回避し、マイコプラズマ関節炎の病態形成に寄与している可能性が推察された。

ウシ滑膜細胞における骨融解形成因子の同定

およびその調節機構の解明

○西 航司¹、岡本 真理子¹、権平 智¹、根布 貴則¹、
大塚 浩通²、藤木 純平³、岩野 英知³、樋口 豪紀¹

¹酪農大 獣医・獣医衛生, ²酪農大 獣医・生産動物内科, ³酪農大 獣医・生化

【背景・目的】マイコプラズマ関節炎（MA）は *Mycoplasma bovis*（Mb）によって引き起こされ、骨融解などの特徴的な病態を呈し、難治性を示すことから淘汰対象になる症例が多い疾患である。ウシの関節炎における骨融解には、滑膜細胞の炎症反応が重要な役割を果たすことが報告されているが、その詳細については十分に解明されていない。そこで本研究では、MA における骨融解の主たる因子を特定し、その調節機構の解明を試みる。

【材料・方法】(1) 関節液：MA 罹患子牛の病変部位および対照子牛の相当部位より採取、(2) 滑膜細胞：ホルスタイン種子牛の手根関節から分離、(3) 単核球培養上清：分離した単核球に Mb PG45 株を MOI 1000 で処置。24 時間培養後、培養上清を回収、(4) Mb および単核球培養上清添加試験：Mb および単核球培養上清を滑膜細胞に添加し 72 時間培養、(5) 蛋白質解析：Western blotting、ELISA および Flow cytometry を用いて関節液、単核球培養上清および滑膜細胞の IL-1 β と MMP-3 を評価した。

【成績】(1) 関節液の MMP-3 と IL-1 β 濃度は対照子牛と比較して MA 罹患子牛で有意な増加を示した、(2) 滑膜細胞における MMP-3 の産生は対照群と比較して単核球培養上清添加群で有意な増加が認められた、(3) 単核球培養上清に含まれる IL-1 β は対照群と比較して Mb 添加群で有意な増加を示した。

【考察】MA 罹患子牛の関節液および単核球培養上清で刺激した滑膜細胞から MMP-3 が検出されたことから、MMP-3 が骨融解の主たる因子であることが示唆された。ヒトの滑膜細胞における MMP-3 は IL-1 β により誘導される。ウシの関節液および単核球の培養上清から高濃度の IL-1 β が検出されたことから、MMP-3 の誘導因子として IL-1 β の関連が強く示唆された。

エンロフロキサシン耐性

Mycoplasma bovis に対する迅速検出法の検討

○権平 智¹, 西 航司¹, 臼井 優², 田村 豊², 樋口 豪紀¹

¹酪農大 獣医・獣医衛生, ²酪農大 獣医・食品衛生

【背景および目的】*Mycoplasma bovis* は乳房炎、肺炎、関節炎など経済的損失の大きな疾病を引き起こす病原体であり、これらの疾病の治療としてエンロフロキサシンが使用される。近年、*M. bovis* のエンロフロキサシン耐性が問題となっているが、薬剤感受性試験には時間と専門的な技術が必要である。本研究では、*M. bovis* のエンロフロキサシンに対する耐性遺伝子について、PCR 法による迅速検出系の確立を試みた。

【材料および方法】1) 供試牛：マイコプラズマ感染症（肺炎、関節炎および乳房炎）に罹患した 16 頭のホルスタイン種雌牛、2) 供試菌株：液体培地にて増菌後、寒天培地から *M. bovis* の分離株を得た、3) 薬剤耐性遺伝子の検出：分離菌株および基準株（PG45）についてエンロフロキサシン耐性遺伝子特異的な PCR を実施、4) 微量液体希釈法：分離菌株および基準株を使用し微量液体希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）を算出

【結果】1) 分離された *M. bovis* は関節炎由来 6 株、肺炎由来 5 株、乳房炎由来 5 株であった、2) PCR の結果エンロフロキサシン耐性遺伝子が陽性 10 株、陰性 6 株であった、3) 微量液体希釈法の結果エンロフロキサシンに対する MIC が 0.5 µg/ml 以下 6 株、1 µg/ml 以上が 10 株であり、基準株は 0.25 µg/ml であった、4) PCR 結果と微量液体希釈法の結果を比較すると PCR 陽性の 10 株はすべて MIC が 1 µg/ml 以上であった。

【考察】エンロフロキサシンに対する MIC が 1 µg/ml 以上の *M. bovis* 検出に本検出法は有効であることが示された。微量液体希釈法は分離株から判定まで 4 日以上を有するのに対し、PCR 法では数時間で検出が可能であるため、本検出法は薬剤耐性菌の迅速検査に有効な手法であると考えられた。

マイコプラズマゲノムによる 翻訳反応のファインチューニング

○安田 元昭, 長谷 部晃, 佐伯 歩, 柴田 健一郎
北大院 歯・口腔分子微生物

真核細胞は、増殖因子や栄養の欠乏、ウイルス感染、突然の温度上昇などのさまざまな状況の変化に応答してタンパク質合成全体の速度を減少させる。アデノウイルスはこのような宿主反応に対抗するため、自身の構造タンパク質をコードする領域の5' 非翻訳領域に tripartite reader と呼ばれるコンセンサス配列を有しており、宿主細胞のタンパク質合成速度が減少している環境においても自身の構造タンパク質を優先的かつ高効率な状態で発現する（宿主細胞に発現させる）ことができる。しかし、一部のアデノウイルス構造タンパク質では、スプライシングによって生ずる tripartite reader 下流への塩基配列付加によりこのような翻訳反応効率の上昇機構がキャンセルされる。これらの結果から我々は、mRNA の5' 非翻訳領域に mRNA の二次構造を変化させるような配列を導入することにより任意のタンパク質の翻訳効率を調節できる可能性を見出した。

この仮説を検討するため、AT 含有率が七割を超えることが知られているマイコプラズマゲノム DNA を断片化し、ランダムにルシフェラーゼ・リポーターの5' 非翻訳領域にクローニングしたライブラリーを構築し、真核細胞に導入・発現解析することを試みた。現在まで 375 個のクローンの発現解析を終了しているが、発現を2倍以上に活性化できる配列を有するクローンは2%内外であり、全体の80%のクローンはルシフェラーゼの発現を0.5~50%まで抑制するものであった。Real Time PCR の結果からルシフェラーゼ mRNA の転写量に大きな変動は見られず、5' 非翻訳領域の改変によるタンパク質発現量の変化の大部分は翻訳過程における何らかの変化が原因であると考えられる。

以上より、マイコプラズマゲノム DNA 断片を任意のタンパク質の5' 非翻訳領域に挿入することにより、発現量を0.5%から少なくとも300%程度までシームレスに調節できる可能性が示唆された。

Mycoplasma salivarium 由来リポペプチド FSL-1 は

マクロファージの細胞質へ局在し

NLRP3/ASC speck の形成を誘導する

○佐伯 歩¹, 長谷部 晃¹, 鈴木 敏彦², 柴田 健一郎¹

¹北大院 歯・口腔分子微生物, ²東京医科歯科大院 医歯・細菌感染

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 β あるいは IL-18 の産生を制御する細胞内センサーである。IL-1 β 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ことが知られている。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 β を産生すること、さらにこれらのマイコプラズマの有する活性物質の一つは、両マイコプラズマの細胞膜に存在するリポタンパク質・リポペプチドであることを明らかにした。昨年度の本学術総会では、*M. salivarium* 由来リポペプチド FSL-1 がマウスマクロファージの細胞質に局在することで NLRP3 インフラマソームを活性化することを報告した。そこで、FSL-1 が細胞質へ移行するメカニズムならびに NLRP3 インフラマソームを活性化するメカニズムを明らかにする第一段階として、本研究では、FSL-1 が細胞質へ移行するタイムコースならびに NLRP3 インフラマソームと FSL-1 が共局在するかどうかを明らかにすることを目的とした。C57BL/6 マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)を LPS で 4 時間処理した後に、FITC 標識した FSL-1 で各時間刺激した。30 分ならびに 1 時間後に FSL-1 は lysosome marker である Lamp1 とは別の部位のエンドソームに局在していたが、刺激後 2 時間程で、FSL-1 を含むエンドソームとリソソームの融合が観察され、すでに一部の FSL-1 は細胞質に局在していた。FSL-1 は NLRP3/ASC 複合体(speck)の形成を誘導したが、speck と FSL-1 との共局在は見られなかった。

繊毛虫によるヒト病原細菌と水系環境細菌間の双方向的な薬剤耐性プラスミドの接合伝達の促進作用

○長谷川 貴生¹, 松下 瑞江¹, 大久保 寅彦¹,
中村 眞二², 松尾 淳司³, 山口博之¹

¹北大院 保科・病態解析, ²順大院 医・形態解析イメージング,

³北海道医療大

薬剤耐性菌の拡散要因の一つは、細菌間でのプラスミドを介した薬剤耐性遺伝子の水平伝播にある。しかしながら環境中のホットスポットは未だ見つかっていない。一方、私達は、水系環境に広く生息する繊毛虫が大腸菌間のプラスミド伝達を促進させることを明らかにし、繊毛虫が病原細菌と環境細菌の間で薬剤耐性遺伝子の橋渡し役になっている可能性を指摘した(Matsuo ら RM 2010, Oguri ら JAC 2011、Okubo ら IJAA 2017)。そこで本研究では、繊毛虫(*Tetrahymena* sp. および *T. thermophila*)の存在下で大腸菌(TC170328 や J53)と環境細菌(河川水由来のエロモナス)間での双方向的な耐性遺伝子の伝播について検討した。*bla*_{IMP-1} 遺伝子(カルバペネム耐性)を保有する臨床由来のプラスミドを用い、各種条件下で接合伝達試験を実施した。その結果、繊毛虫の存在は、*bla*_{IMP-1} 遺伝子の大腸菌とエロモナス間の伝達頻度を双方向共に非存在下と比べて有意に上昇させた(大腸菌>エロモナス: 100 倍; エロモナス>大腸菌: 10 倍)。また、繊毛虫との共培養時における大腸菌およびエロモナスの生菌数は繊毛虫非存在時と比べて有意な差は認められなかった。トランスウェルを用いて細菌と繊毛虫の直接的な接触を絶つと、接合伝達頻度の促進現象は起こらなかった。このように繊毛虫は、細菌に物理的に接触することで、大腸菌とエロモナスの間の双方向的な接合伝達を促進させることが明らかとなった。これらの結果は、環境中に薬剤耐性大腸菌が排出された場合、繊毛虫が環境細菌への耐性遺伝子伝播を促進し、環境細菌がそれら耐性遺伝子のリザーバーになる可能性を示唆している。現在、この現象が実際の野外環境でも生じるかを検証するために、下水道から分離した薬剤耐性大腸菌、エロモナス、繊毛虫を材料とした検証実験を実施中である。

【非会員共同研究者：早坂かすみ、秋沢宏次、澁谷斉、加畑馨、清水力（北大病院 検査・輸血部）】

ヒト病原細菌を共生細菌依存的に運ぶアメーバ： 運搬機構解明に向けた試み

○田中 菜那¹, 前鼻 咲樹¹, 大久保 寅彦¹,
松尾 淳司², 中村 眞二³, 山口 博之¹

¹北大院 保科・病態解析, ²北海道医療大, ³順天堂大院 医・研究基盤センター

本研究室では以前、土壌から環境クラミジア(*Neochlamydia* S13)が共生するアメーバ(S13 アメーバ)を分離・株化した(Matsuo *et al*, Environ Microbiol Rep, 2010)。この共生細菌の宿主アメーバへの感染率は 100%であるが、他のアメーバに再感染できない。また、*Neochlamydia* S13 の除去は、宿主アメーバの増殖を促進させることから、この共生細菌の存在はアメーバにとって少なからず負担となっている(Okude *et al*, Microbes Environ, 2012)。何故 S13 アメーバは、*Neochlamydia* S13 との共生を許容しているのだろうか。これまでに私達は、S13 アメーバが餌となるヒト病原性細菌(大腸菌、サルモネラ、緑膿菌など)を固形培地上で共生細菌依存的にアメーバ表面に固着させ運搬することを見いだした(Okubo *et al*, Environ Microbiol Rep, 2018)。そこで本研究では、その運搬機構を解明する目的で、実際の環境土壌(62 検体)とともに S13 アメーバを培養し運搬された細菌種を 16SrDNA の BLAST 解析で同定するとともに、EZ-Tn5™ Transposome™ キット (ARB-LS)を用いて大腸菌 Tn 挿入変異株ライブラリー(243 株)を作成し S13 アメーバが運搬できなかった大腸菌変異株よりこのアメーバが大腸菌を運搬する際、認識する細菌側分子の探索を試みた。その結果、環境土壌の運搬実験では、運搬が認められた 9 株の株化に成功した。その内 4 株が 16SrDNA を標的とした BLAST 解析により *Pseudomonas* sp. 2 株、*Pseudomonas fluorescens* 1 株、*Paenibacillus* sp. 1 株と同定された。Tn 変異株運搬実験では、1 株の変異株が運搬されなかった。現在 Tn 挿入部位を手かりに挿入配列の同定作業を進めている。これらの結果は、共生細菌依存的に起こる S13 アメーバのヒト病原細菌運搬現象が、アメーバと細菌表層分子との特異的な相互作用により起こっている可能性を示唆している。

イトトンボが保有する薬剤耐性菌の検出と それら菌株の性状解析

○大久保 寅彦¹, 山口 裕々², 綿路 昌史², 山口 博之¹

¹北大院 保科・病態解析, ²札幌旭丘高校

【背景】薬剤耐性菌の出現と拡散は世界中で問題となっており、抗菌薬による選択圧が存在しないはずの自然環境中にも拡散していることが報告されている。また、ハエや甲虫などの昆虫から薬剤耐性菌を検出した報告もあり、環境中に耐性菌を広める要因として昆虫が寄与している可能性も指摘されている。一方、これまでの研究は薬剤耐性菌への曝露機会が多いと思われる糞食性昆虫が中心であり、そこから先の拡散については不明である。ショウジョウバエなど双翅目に属する小型の昆虫も、耐性菌を運ぶ機械的ベクターになると考えられ、耐性菌を家畜やヒト間で広める要因の一つになりうると考えられる。そこで本研究では、自然環境における耐性菌の拡散状況を明らかにするために、昆虫捕食性である野生のイトトンボが保有する薬剤耐性菌の検出と性状解析を実施した。

【材料および方法】札幌近郊の7地点（東屯田川、安春川、篠路川、篠路新川、トンネウス沼、大野池、五天山公園）においてイトトンボ(n = 405)を捕獲し、手指の細菌が混入しないよう三角紙に包んで2日間飼育している間に自然排便された糞便を回収した。捕獲地点の河川・湖沼の水も採取し、環境指標(pH、リン酸、アンモニア、COD、大腸菌群数等)を測定した。糞便懸濁液および水サンプルはSCD 寒天培地・DHL 寒天培地に接種して細菌数を算出するとともに、抗菌薬添加 DHL 培地に接種して薬剤耐性腸内細菌科細菌の分離を試みた。分離菌株については質量分析と API 20E キットにて菌種を同定した。耐性菌の MIC と採集場所の関連性についてクラスター解析を行った。

【結果・考察】COD やリン酸、アンモニア濃度は篠路新川（東区の水排水が流入）で高く、大腸菌群数は安春川（高度処理された下水を放流）で多かった。水の総菌数は 1.0×10^2 CFU/mL 前後だったのに対し、糞便懸濁液では 1.0×10^8 CFU/mL 前後となった。耐性菌としてはアンピシリン耐性株が全地点で、テトラサイクリン耐性株が6地点で、カナマイシン耐性株が2地点で分離された。アンピシリン耐性株の多くは *Serratia* 属や *Enterobacter* 属など自然抵抗性と思われる種類が中心だった。一方、テトラサイクリン耐性株には *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenotrophomonas maltophilia* などの菌種が含まれていた。クラスター解析の結果、篠路新川は他の採取場所に比べ耐性菌の検出頻度が高かった。このことは、イトトンボが耐性菌の環境汚染の指標となりうる可能性を示している。

Staphylococcus 属菌に対するバクテリオファージ ライブラリー構築に向けたファージ選抜法の検討

○北名 純也¹, 高橋 宏充¹, 藤木 純平¹, 樋口 豪紀²,
臼井 優³, 田村 豊⁴, 岩野 英知¹

¹酪農大 獣医・生化, ²酪農大 獣医・獣医衛生, ³酪農大 獣医・食品衛生,

⁴酪農大 動物薬教育研究センター

【背景・目的】

近年、薬剤耐性菌の顕在化を受けて、薬剤耐性対策が世界的に注目されており、新規抗菌戦略として“バクテリオファージ”を用いた“ファージ療法”に対する期待は格段に高まっている。薬剤耐性菌感染症の発生において、分離された原因菌に対して効果的なバクテリオファージをカクテル化して処方する「パーソナライズ・ファージ療法」が効果的であると考えられ、迅速なファージ・カクテルの調製には「ファージライブラリー」の構築が不可欠である。しかし、本邦におけるファージライブラリーの構築と運用は過去に例がなく、効果的なファージライブラリーの構築に向けたファージ選抜方法の確立は喫緊の課題である。そこで、本研究では溶菌活性を指標としたバクテリオファージの選抜と分類を試みた。

【材料・方法】

本研究室が所有するバクテリオファージ（phiSA012）が、複数種の野外由来 *Staphylococcus* 属菌に示す溶菌活性を、Kinetics 計測型プレートリーダーを用いて吸光値の変化を経時的に測定することにより評価した。また、得られた溶菌活性値を指標としてバクテリオファージの分類を実施した。

【結果・考察】

phiSA012 は複数種の *Staphylococcus* 属菌に対して MOI 依存的な溶菌活性を示すことが示唆された。溶菌活性値は、対象となる被験菌によって異なるパターンを示したことから、本方法を用いることで溶菌活性を指標とした多種類のバクテリオファージの選抜系を構築できる可能性が示された。ファージは単体で用いると、それに対して耐性菌が出現する。そのため、ファージを実際に用いるには異なる溶菌活性（溶菌特異性）のものを混合した、ファージのカクテル化が必須となる。本方法により、適切なファージカクテル化剤を迅速に構築することが可能となると考えている。

Staphylococcus 属菌バクテリオファージ由来溶菌酵素

「エンドライシン」の高性能化の検討

○高橋 宏充¹, 北名 純也¹, 藤木 純平¹, 樋口 豪紀²,

臼井 優³, 田村 豊⁴, 岩野 英知¹

¹酪農大 獣医・生化, ²酪農大 獣医・獣医衛生, ³酪農大 獣医・食品衛生,

⁴酪農大 動物薬教育研究センター

【背景・目的】抗生物質が効かない時代の到来が危惧される今日、バクテリオファージやファージ由来溶菌酵素“エンドライシン”は、新規抗菌戦略として高い注目を集めている。当研究室ではこれまで、「Dual lytic domain 型」に分類されるエンドライシン (Lys-phiSA012) を黄色ブドウ球菌溶菌性ファージから単離・精製し、その溶菌機能を報告した¹⁾。本研究では、溶菌活性がほとんどないと考えられる Amidase ドメインを溶菌活性の高い Amidase ドメインと組換えることで、より高性能で安定なエンドライシンを構築することを目指した。

【材料・方法】NCBI に登録されている約 150 種の *Staphylococcus* 属菌ファージ由来エンドライシンのアミノ酸配列について比較解析を行い、作成された系統樹を基に Lys-phiSA012 の Amidase ドメインと異なるクラスターに分類される Amidase ドメインを選抜し、その中で高い Amidase 活性が報告されている Lys-2638A の Amidase ドメインを Lys-phiSA012 の Amidase ドメインと組換えたエンドライシンを大腸菌発現系により作出した。この新規エンドライシンに対して、野外から分離された様々な *Staphylococcus* 属菌株を用いて、濁度測定法により溶菌活性および溶菌スペクトルを評価した。

【結果・考察】構築されたキメラ型エンドライシンと WT の溶菌活性、および溶菌スペクトルの詳細な比較解析を実施している。本研究で作成した系統樹が複数のクラスターを形成したことから、各クラスターが有する表現型とアミノ酸配列の関連を解明することで、多様なエンドライシンを構築できる可能性がある。今後、エンドライシンの立体構造と機能の関係性を詳細に解明することで、さらに高性能なエンドライシンの構築と治療的応用への手がかりとなると考えている。

【参考文献】

- 1) Jumpei Fujiki , ,Hiromichi Takahashi, Hidetomo Iwano et al. Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage ,Pharmaceuticals (Basel).2018 Feb 24;11(1). pii: E25. doi: 10.3390/ph11010025.

黄色ブドウ球菌に対するバクテリオファージ由来

溶菌酵素（エンドライシン）の機能解析

○藤木 純平¹, 中村 暢宏¹, 高橋 宏充¹, 北名 純也¹, 古澤 貴章¹,

臼井 優², 樋口 豪紀³, 田村 豊^{2,4}, 岩野 英知¹

¹酪農大学 獣医・生化学, ²酪農大 獣医・食品衛生,

³酪農大 獣医・獣医衛生, ⁴酪農大 動物薬教育研究センター

薬剤耐性対策が世界的に推進される今日、バクテリオファージやファージ由来溶菌酵素（エンドライシン）に対する新規抗菌アプローチとしての期待は格段に高まっている。特に、薬剤耐性の獲得によってヒト医療・獣医療において甚大な被害を及ぼす病原菌“*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp: ESKAPE”に対する迅速な対応が望まれる。また、産業動物医療や家畜の飼養における抗生物質の使用が、多剤耐性菌出現の温床となることが指摘され、「農場から食卓」に至る過程における「家畜からヒト」への薬剤耐性菌の拡散が危惧されている。従って、獣医学領域において薬剤耐性菌を制御することは、包括的な“*One World, One Health*”の観点から極めて重要である。本研究では、“ESKAPE”に分類され、ウシ乳房炎の代表的起因菌である黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*: SA）を標的とし、SA に対するバクテリオファージ由来溶菌酵素の有効性と機能を検討することを目的とした。遺伝的に多様なウシ乳房炎由来 SA に対して、広範囲な溶菌スペクトルを示したファージ（ΦSA012）[1, 2]のゲノム DNA から、エンドライシンをコードする領域を単離・精製し、大腸菌を用いたタンパク質発現系を用いて ΦSA012 由来エンドライシン（Lys-ΦSA012）を構築した[3]。濁度測定法を用いて Lys-ΦSA012 の溶菌活性を検討した結果、MRSA を含む複数株の SA に対する急速な溶菌活性が認められた。また、ドメイン欠失変異体を用いた解析の結果、Lys-ΦSA012 が有する 2 つの触媒ドメインのうち、N 末端に位置する触媒ドメインが高い溶菌機能を担うことが示唆された。以上の結果から、Lys-ΦSA012 が新規抗菌アプローチとして効果的である可能性が示唆された。現在、エンドライシンの多様性を基に、それらの機能、立体構造に関する比較解析を実施しており、溶菌活性を増強させるメカニズムについて解析を展開している。本解析を通して、より安定的で高い機能を有するエンドライシンを構築するための分子基盤の解明を目指している。

【参考文献】

- 1) Synnott A.J., Kuang Y., and Tanji Y. (2009) Appl. Environ. Microbiol., 75, 4483-4490.
- 2) Iwano H., Inoue Y., and Tamura Y. (2018) Biology (Basel), 7(1).
- 3) Fujiki J., Nakamura T., and Iwano H. (2018) Pharmaceuticals (Basel), 11(1).

バクテリオファージの耐性菌感染症への応用

岩野 英知

酪農学園大学 獣医学群 獣医生化学ユニット

細菌感染症の治療は、1928年に世界最初の抗生物質であるペニシリンが発見され、その後1945年に臨床応用されて以降、長らく抗生物質に頼ってきた。しかし細菌は、この抗生物質に容易に耐性化し、それに対して人は新たな抗生物質を開発するというやり方で対応してきた。しかし、その‘いたちごっこ’の状態に人が勝利するゴールは見え、現在では、人類は新たな抗生物質を開発することに疲弊してしまっている。

近年、抗生物質に代わり細菌感染症に対抗する手段の有力な候補として、抗菌ペプチド、抗菌抗体、ワクチン、現在使われている抗生物質の補強物質、そして我々が注目するファージセラピーなど、多様な試みが検討されている。バクテリオファージ（ファージ）は、細菌を攻撃するが、人体に無害なウイルスである。自然界には多くの種類のファージが存在し、それぞれの細菌に特異的なファージが存在する。ファージは、宿主細菌膜上のレセプター分子を認識して自身の頭部に格納しているDNAを細菌内に送り込み、細菌の持つシステムを利用して娘ファージを大量に作り出し、細菌膜を壊して娘ファージが出てくることによって細菌は死滅する。このファージは、ペニシリンの発見より14年前の1915年に発見され、それ以降当時のソ連や、東欧諸国では盛んに感染症治療への開発が行われ、現在でも実際にヒトにも応用している。

本講演では、我々が取り組んできた黄色ブドウ球菌ならびに緑膿菌に対するバクテリオファージ、またその溶菌酵素であるエンドライシンを利用したファージセラピーに関するデータを示しながら、その可能性についてディスカッションさせていただきたい。また、近年、アメリカで話題となっているパターンソン症例（多剤耐性アシネトバクターに対するファージセラピーにより瀕死の状態から完治した例）や、ヨーロッパでのPhagoburn（やけど治療に対するファージカクテル化剤）の情報も交え、ファージの応用についての取り組みを紹介し、今後の日本のファージセラピーをどのように推し進めていくかについて議論を深めたい。

[参考文献]

- 1) *Pharmaceuticals* (Basel). 2018 Feb 24;11(1). pii: E25. doi: 10.3390/ph11010025.
- 2) *Biology* (Basel). 2018 Jan 9;7(1). pii: E8. doi: 10.3390/biology7010008.
- 3) *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17):5332-9. (2016).
- 4) *Genome Announcements*. 4(3) pii: e00041-16. (2016).
- 5) *J. Vet. Med. Sci.* 78(6):1035-8 (2016).

耐性菌時代の新戦略－ファージ療法の基礎と応用－

丹治 保典
東京工業大学 生命理工学院

はじめに Frederic Twort は 1915 年、バクテリアを溶かしてしまうウイルス（バクテリオファージ）を偶然発見した。その後多くの科学者がファージを抗菌剤として用いようと試みた。いわゆるファージセラピー（Phagetherapy）の始まりである。しかし Alexander Fleming がペニシリンを発見(1929 年)してから、その座は完全に抗生物質に奪われてしまった。多剤耐性菌の出現に代表される抗生物質の問題点がクローズアップされた昨今、再びファージセラピーが注目されている。講演では大腸菌 O157:H7 と黄色ブドウ球菌を例に、ファージセラピーの可能性と解決すべき問題点を紹介する。

1 下水流入水はファージの宝庫

日本人は一日平均約 300L の水道水を使用する。使用した水道水のほとんどが下水として処理場へ流入する。もちろん下水にはヒト糞便が含まれる。排泄する糞便の量が約 200(g/人・日)なら下水はヒト糞便の希釈液（1/1500）と捉えることができ、ファージを含むウイルス、病原細菌、薬剤耐性菌などの宝庫でもある。

都市下水処理場に流入する生下水を 1 年間に渡り採取し、病原性大腸菌 O157:H7 に関連する遺伝子を Multiplex PCR 法を用い検出しところすべての試料から O157 関連遺伝子が複数検出された。健康なヒト腸内細菌叢における O157 の存在は希ではないことを示唆する。宿主も存在すればファージも存在する。O157 ファージの検出を行ったところ、流入水には透明なプラークを形成するファージが数百 PFU(Plaque Forming Unit) /ml 存在した。O157 ファージに限らず、多くのヒト病原菌に感染性を示すファージを下水流入水から入手できる。ファージハンターにとって下水流入水は格好の狩猟場である。

2 ファージによる大腸菌 O157:H7 の制御

ある健康体の豚糞から約 4 千万 PFU/g もの溶菌性ファージが検出され、そのファージを PP01 と名付けた。PP01 は由来の異なる 5 種類の O157 には感染することができたが、他の表面抗原を持つ大腸菌や他の類縁細菌には感染しなかった。PP01 は O157 の外膜タンパク質 C (Omp-C)を目印(レセプター)に感染する。O157 に PP01 を添加すると濁度の減少を伴う溶菌が観察された。しかし、培養を続けると、宿主がファージに対し耐性化した。耐性菌の出現はファージセラピーを実現するうえで最大の課題である。宿主のファージ耐性化を回避する手

【特別講演②】

段としてファージカクテル（複数種のファージ混合液）の使用がある。レセプターの異なるファージを混合することが「うまいカクテル」を作るコツである。

3 ファージによる黄色ブドウ球菌の制御

動物感染症の治療/予防、および家畜の成長促進を目的とした飼料添加物として年間合計約 1,020 トンもの抗生物質が日本において使用されており(2011 年、IMS 医薬品販売量統計)、その量はヒト用の約 1.8 倍に相当する。家畜感染症の多くは人畜共通であり、家畜で生じた薬剤耐性菌は農業従事者、食肉を介しヒトに感染する可能性がある。牛乳房炎は乳頭から細菌が感染し生じ、酪農家にとってもっとも経済的損失の大きな牛の疾病である。牛乳房炎のファージセラピーを目指し、乳房炎罹患牛の乳汁から分離した黄色ブドウ球菌を用いファージのハンティングを行った。都市下水流入水から分離したファージ ϕ SA012 の宿主域は非常に広く、北海道でスクリーニングされた牛乳房炎起因黄色ブドウ球菌数十種すべてに、またヒト由来 MRSA にも感染性を示した。

おわりに ヒトを含む動物の腸内細菌叢には多くのファージが存在する。もしかすると細菌総数より多いかも知れない。生態系においてファージを含むウイルスは特定の種だけが異常増殖するのを防ぐ役割を担っている。もしファージが欠落しているならそれらを人為的に供給すれば良い。この発想はファージセラピーやファージによるプロバイオティクスに繋がる。ファージセラピーは自然の摂理に従った治療/予防法とも言える。

Mycobacterium tuberculosis lineage distribution in Kandy, Sri Lanka

○Charitha Mendis^{1,2}, Champa Ratnatunga³, Vasanthi Thevanesam³, Athula Kumara³,
Susiji Wickramasinghe⁴, Dushantha Madagedara⁵, Chandika Gamage³, Chie Nakajima¹,
Yasuhiko Suzuki¹

¹Div. of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan, ²Dept. of Medical Laboratory Science, Faculty of Allied Health Sciences, University of Peradeniya, Sri Lanka, ³Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Peradeniya, Sri Lanka, ⁴Dept. of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Peradeniya, Sri Lanka, ⁵Respiratory Disease Treatment Unit, Teaching Hospital, Kandy, Sri Lanka

Mycobacterium tuberculosis (MTB) forms seven phylogeographic lineages associated with particular human populations and varied in their capacity to cause disease and acquire drug resistance. Therefore this study was performed to identify circulating genotypes of MTB and their transmission patterns in a selected cohort in Sri Lanka. DNA extracted from 85 isolates of MTB collected during 2012 and 2013 from new pulmonary tuberculosis patients in Kandy, Sri Lanka was analyzed by Spoligotyping, Large Sequence Polymorphism (LSP) and MIRU-VNTR typing.

Total of 26 distinct spoligotype patterns were identified and 16 of them were matched with the existing spoligo international types. Ten new spoligotype patterns were classified as Indo-Oceanic (4 new types) and Euro-American lineages (6 new types) by LSP. Predominant lineage in this study group was Euro-American lineage (46.1%, n= 39) followed by Indo-Oceanic (29.6%, n=25) and East-Asian lineages (Beijing: 23.6%, n= 20). Only one isolate (1.2%) was detected as East-African-Indian lineage (CAS1-Delhi). The cluster analysis and MST illustrated a possible outbreak of Euro-American lineage in this study group. Six new types of Euro-American lineage represented 20.3% of total isolates. Evolved new types also provide evidence that Euro-American lineage has been circulating in Sri Lanka for a substantially long time.

Though the predominant lineages circulating in South Asian region are Indo-Oceanic and East-African-Indian lineages, a different pattern was detected in this study group. This suggested the possibility of introduction of Euro-American lineage by Europeans during the colonization period.

Genotypic characterisation of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Lusaka, Zambia.

oPrecious BWALYA¹, Tomoyuki YAMAGUCHI², Georgina MULUNDU³,
Chie Nakajima^{1,2}, Grace MBULO⁴, Eddie SOLO⁴, Yukari FUKUSHIMA¹,
Kunda KASAKWA⁴, Yasuhiko SUZUKI^{1,2}

¹Division of Bioresource, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Japan, Hokkaido University, Japan, ²Global Station for Zoonosis Control, Global Institution of Collaborative Research and Education (GI-CoRE), Hokkaido University Japan, ³School of Medicine, The University of Zambia, ⁴Tuberculosis Laboratory, The University Teaching Hospital, Ministry of Health, Zambia

Pyrazinamide is a core part of tuberculosis (TB) chemotherapy in Zambia. Due to challenges associated with pyrazinamide testing however, little information is available to indicate resistance levels to this drug. To determine the frequency of pyrazinamide (PZA) resistance and its correlation with mutation in *pncA* in *Mycobacterium tuberculosis*, BACTEC MGIT M960 was used for phenotypic PZA susceptibility testing while sequencing was used to determine resistance-conferring mutations in the *pncA*.

Of the 122 isolates analyzed, 21 were phenotypically resistant to PZA. Among multidrug-resistant (MDR) *M. tuberculosis* isolates, PZA resistance was 16 (50%). Twenty of 21 PZA resistant isolates had resistance conferring mutations. Using BACTEC MGIT 960 as the reference standard, gene sequencing showed 95.2% sensitivity and 99% specificity. Seven new mutations were identified while the single nucleotide substitutions T104G and C195T were the most frequent mutations. However, they were observed in both susceptible and resistant isolates, indicating that they are non-resistance conferring.

This study demonstrates high PZA resistance in MDR TB patients in Lusaka. It would therefore, be prudent to include PZA for resistance surveillance especially in this class of patients. Mutations in *pncA* gene were the main mechanism of resistance to PZA and thus can be targeted for genotypic PZA susceptibility testing. Identification and filtering out of the non-resistance conferring mutations makes genotyping the best proxy for PZA susceptibility testing in Zambia as opposed to phenotypic testing which proved unreliable.

Characterization of mutations conferring streptomycin resistance to multidrug-resistant

Mycobacterium tuberculosis isolates from Myanmar

Nan Aye Thida Oo^{1,2}, Lai Lai San^{1,2}, Khin Saw Aye², Wah Wah Aung²,
Chie NAKAJIMA^{1,3}, Yasuhiko SUZUKI^{1,3}

¹ Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, ² Department of Medical Research, Ministry of Health and Sports (Myanmar), ³ Global Station for Zoonosis Control, Global Institution for Collaborative Research and Education (GI-CoRE), Hokkaido University

Background: Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* remains as one of the leading causes of morbidity and mortality in the world. Currently, mutation detection of specific genetic loci associated with drug resistance is the most valuable approach for rapid and reliable diagnosis of drug-resistant TB. Numerous studies report that mutations of *rpsL* (encoding the S12 protein), *rrs* (encoding 16S rRNA) and *gidB* (encoding rRNA methyltransferase) are responsible for resistance to streptomycin (STR), which is usually used in both multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) treatments and re-treatments in Myanmar. Therefore, we performed sequence analysis of STR resistance-associated genes (*rpsL*, *rrs* and *gidB*) among 141 STR resistant MDR-TB isolates of Myanmar.

Method: DNA fragments encoding *rpsL*, *rrs*, and *gidB* of MDR-TB isolates were amplified by PCR and the nucleotide sequences were analyzed. Mutations associated with STR resistance were identified by comparing obtained sequences with susceptible strains. The background genotypes of the analyzed isolates were determined by spoligotyping and Large Sequence Polymorphisms.

Results: Most isolates belonged to the Beijing genotype (105, 74.5%). Moreover, mutations in *rpsL* were identified in 69.5% (98/141) of the STR-resistant isolates, where the most prevalent (91.8%, 90/98) and significantly associated mutation with the Beijing genotype ($P < 0.001$) was Lys43Arg. Fifteen different mutations in *gidB* were found in 16.3% (23/141) of the isolates, and most of them were novel mutations. Moreover, based on our results, we suggest A276C nucleotide substitution in *gidB* as a phylogenetic marker for the Beijing family in Myanmar. Sequence analysis of *rpsL*, *rrs* and *gidB* with a sensitivity of 83.7% satisfactorily predicted STR resistance in Myanmar isolates. However, in 16.3% (23/141) of the isolates, none of the examined genes had the mutation. Hence, further studies are strongly recommended to elucidate other possible resistance mechanisms.

Conclusion: The present findings may be useful in developing molecular STR susceptibility assays, which in turn could contribute to developing TB treatments and control strategies in Myanmar.

Differentiation of ancient and modern Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Multiplex PCR assay

○ Lai Lai San^{1,2}, Nan Aye Thida Oo^{1,2}, Khin Saw Aye², Chie NAKAJIMA¹,
Yasuhiko SUZUKI¹

¹ Div. of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan, ² Department of Medical Research, Myanmar

Tuberculosis (TB) is the major leading cause of death by infectious disease worldwide. In addition, multidrug resistant TB (MDR-TB) become a burden to combat the disease. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is a slow growing bacteria and it takes longer time to be diagnosed.

MTB varies with the different lineages according to the phylogeographical condition. Among the lineages, the Beijing genotype, belonging to the East Asian lineage (also called Lineage 2), showed higher transmission rate, pathogenicity, and virulence. Moreover, it showed an association between the drug resistance associated mutations. Particularly modern Beijing genotype strains have been found with the higher ratio among the sublineages of the Beijing genotype especially in Asia including Myanmar and China. The previous study of MDR-TB in Myanmar indicated that majority of Beijing genotype strains were modern sublineage, among total Beijing lineage as well as MDR-MTB Beijing lineage.

A new multiplex PCR method for differentiation of ancient and modern Beijing sublineages of MTB was developed for the rapid diagnosis of the potential virulent strains. The multiplex PCR targeting single nucleotide polymorphism (SNP) at the position of 1477596 on H37Rv genome to determine the ancient and modern Beijing strains was developed. A key mutation, C 1477596 T was detected in the modern Beijing sublineage. Modern and ancient Beijing strains can be differentiated by the size of PCR products. There was no controversial findings between the multiplex PCR and sequencing and the sensitivity and specificity found 100% respectively.

The rapid determination of a highly virulent strain, especially modern Beijing strain is necessary to be developed in order to get a rapid diagnosis for the effective management of TB, especially in high burden countries like Myanmar where modern Beijing genotype MDR-TB is predominant.

Development of a rapid and low-cost differentiation method of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* using Loop Mediated Isothermal Amplification

○Thoko Flav Kapalamula, Jeewan Thapa, Chie Nakajima,

Mwangala Akapelwa, Yasuhiko Suzuki

Division of Bioresources, Research center for zoonosis control, Hokkaido University

Abstract

[Background] Accurate differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) species is crucial to determine appropriate anti tuberculosis (TB) drugs for proper management of TB patient. Unfortunately, current MTC differentiation methods are time consuming, expensive and complicated as such they are not easily used in resource limited areas. We developed a simple, rapid and low-cost method of differentiating *M. bovis* from *M. tuberculosis* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

[Methods] We designed and evaluated more than 50 primer sets for detection of the deleted region of difference 4 (RD 4) in all *M. bovis* strains. LAMP reactions were performed at temperatures between 60°C to 66°C for 120 minutes with varying amounts and concentrations of LAMP reaction reagents to determine optimal conditions. We evaluated the specificity by examining 39 other mycobacterial species and determined limit of detection by 10 fold serial dilution of purified *M. bovis* DNA from 5pg/reaction to 30fg/reaction. Results were detected using a Loopamp real-time turbidimeter (LA-200; Teramecs) and visual color change inspection.

[Results] A primer set with deleted RD4 at 5' region of F1 primer showed high specificity and sensitivity for *M. bovis* DNA and was selected for further analysis. Reaction temperature of 66°C, primer ratio of 8:7:1 (inner primers:loop primers:outer primers respectively) and betaine concentration of 8M gave best results. Positive results were only obtained with *M. bovis* strains, whereas *M. tuberculosis* and all other mycobacterial species tested negative. The assay detected up to 50fg/reaction of *M. bovis* DNA within 40 min.

[Conclusions] Our developed LAMP assay successfully differentiated *M. bovis* from *M. tuberculosis*. LAMP is simple, rapid and low-cost hence suitable for use in resource-limited areas. This assay will be evaluated on clinical human sputum samples.

キノロン耐性化が DNA トポロジーに与える影響

およびその補完機構

○大内 勇樹¹, 向井 徹², 中島 千絵¹, 鈴木 定彦¹

¹北大 人獣共通・バイオリソース,

²国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 感染制御部

細菌において、DNA トポロジーがジャイレースによって一定の超螺旋状態に維持されることで、効率的な遺伝子転写が行われている。キノロンはジャイレースの働きを阻害することで、細菌増殖の抑制に働き、結核など呼吸器感染症にも汎用されている抗菌薬である。しかしながら、キノロン耐性を獲得した結核菌の発生が世界的に報告されており、公衆衛生上非常に深刻な問題となっている。結核菌におけるキノロン耐性は、ジャイレースをコードする遺伝子 *gyrA* 上の 88、90 または 94 番目のコドンにおける変異によって、キノロン結合部位の構造を変化させることで引き起こされることが知られている。酵素活性試験を用いたこれまでの研究から、いくつかのキノロン耐性変異は、ジャイレースにキノロン耐性を与えるだけでなく、酵素活性の低下を引き起こすことが分かっている。しかしながら、キノロン耐性化に基づく増殖能低下のような不利益は、臨床結核菌株では確認されていない。そこで、キノロン耐性変異が結核菌生菌の増殖能および遺伝子転写系にもたらす影響を評価することを目的とし、各変異を持つ結核菌ジャイレース遺伝子を導入した組換え BCG 菌を用いた実験を行った。

キノロン感受性試験の結果、全ての変異型組換え BCG 菌はキノロン耐性を獲得していることが分かった。また、増殖能評価の結果、変異型組換え菌は野生型と同等の増殖速度を示すことがわかった。一方で、ジャイレースの活性低下に依存する DNA トポロジーの変化によって、遺伝子転写系への影響が存在すると考え、定量 RT-PCR により各種遺伝子の発現量を調べた。その結果、ジャイレース遺伝子 (*gyrA/gyrB*) の発現上昇が一部の変異型で確認された。このことから、キノロン耐性変異はジャイレース活性を低下させるが、ジャイレース自体の発現を促すことでジャイレースの機能を補完する制御機構が存在することが示唆された。ジャイレース阻害剤による細菌 DNA の弛緩化が、ジャイレース転写を誘導し DNA トポロジーを一定の超螺旋状態に保とうとする機構が既に知られているが、薬剤非存在下で結核菌のジャイレース発現が制御されているという報告は本研究が初であった。また、SOS 応答遺伝子として、*recA/dnaE2* の発現上昇が確認されたことから、SOS 応答による環境ストレス適応およびゲノム修復もキノロン耐性結核菌の補完機構に関与していると考えられた。

新規アミノ酸置換 Ser83Ile が *Salmonella* Enteritidis の DNA ジャイレースの酵素活性およびキノロン耐性に与える影響の評価

○小出 健太郎¹, Ruttana Puchanon¹, Siriporn Kongsoi^{1,2},

中島 千絵¹, 鈴木 定彦¹

¹北大学 人獣共通・バイオリソース,

²Dept. of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

【背景・目的】食中毒の主要な原因菌である *Salmonella* Enteritidis のキノロン耐性菌の増加は公衆衛生上大きな問題である。キノロンの標的酵素である DNA ジャイレースは DNA の複製に欠かせない酵素であり、キノロンは DNA ジャイレースと結合することで酵素活性を阻害し殺菌的な作用を示す。一方、キノロン耐性は DNA ジャイレースを構成する GyrA 上のアミノ酸置換によってキノロンが結合できなくなるために生じることが知られている。これまで多くのキノロン耐性を引き起こすアミノ酸置換が報告されているが、どれも一塩基置換による変化であった。しかし、我々のグループがタイで行った調査において、新たに二塩基置換によって生じたアミノ酸置換 Ser83Ile (コドン: TCC から ATC) が見つかった。本研究では、Ser83Ile を含む組換え DNA ジャイレースを作出し、野生型ならびに他のアミノ酸置換を含む変異型 DNA ジャイレースと酵素活性およびキノロン耐性を比較することで、Ser83Ile が与える影響を評価した。

【結果・考察】変異型 DNA ジャイレースの酵素活性は野生型よりも有意に低かったが、Ser83Ile を含む DNA ジャイレースの酵素活性は他の一塩基置換による変異型 DNA ジャイレースと比較して大きな差は見られなかった。一方、Ser83Ile を含む DNA ジャイレースのキノロン耐性は野生型および他の変異型よりも有意に高い値を示した。したがって、二塩基置換によるアミノ酸置換 Ser83Ile は DNA ジャイレースの酵素活性を維持したまま、キノロンに対する高度耐性を付与することが明らかになった。酵素活性に差がないことから、キノロン存在下では Ser83Ile から他の一塩基置換や野生型にもどる可能性は低く、Ser83Ile によって高度キノロン耐性化したサルモネラ菌は今後タイ以外の国や地域でも分離されることが予想される。

Klebsiella pneumoniae における DNA ミスマッチ

修飾酵素 MutS 変異による抗菌薬耐性化頻度の上昇

○佐藤 豊孝¹, 品川 雅明², 和田 崇之³, 西嶋 傑⁴, 福島 由華里⁵,
中島 千絵⁵, 鈴木 定彦⁵, 白石 宗¹, 高橋 聡^{2,6}, 横田 伸一¹
札医大 医・微生物¹, 札医大 附属病院検査部², 長崎大 熱帯医研 国際保健³,
産業技術総合研究所⁴, 北大学人獣・バイオリソース⁵,
札医大 医・感染制御部 臨床検査⁶

同一患者由来の臨床検体（喀痰および血液）から *Klebsiella pneumoniae* 3 株（SMKp01, SMKp02, SMKp03）を分離した。全ゲノム解析の結果、3 株は同一クローン由来であると考えられた。SMKp03 には他の 2 株に比較し、多くの遺伝子変異の蓄積が認められ、変異誘導実験から hypermutable であることが示された。また、SMKp03 のみがアミカシンおよびコリスチンに耐性を示した。

SMKp01 はアミノグリコシド・キノロン耐性遺伝子の *aac(6')-Ib-cr* を保有していたが、SMKp03 では本遺伝子に一箇所のアミノ酸置換変異（D179Y）が認められた（*aac(6')-Ib-D179Y*）。*aac(6')-Ib-D179Y* の発現ベクターを作製し *K. pneumoniae* 内で発現させたところ、*aac(6')-Ib-D179Y* は *aac(6')-Ib-cr* に比較しアミカシンの耐性度をより上昇させた。

SMKp03 は、DNA ミスマッチ修復酵素遺伝子である *mutS* にナンセンス変異（stop codon への変異）を有し、MutS の機能が損なわれていた。SMKp01 に SMKp03 同様の *mutS* 変異を導入した株を作製したところ、親株よりもアミカシン耐性変異株の出現が高くなり、その中には、*aac(6')-Ib-D179Y* をもつ変異株も含まれていた。同様にコリスチンの耐性株出現頻度も 10^{-7} から 10^{-5} に上昇し、ヘテロ耐性の表現型を示した。

以上のことから、SMKp03 のアミカシン耐性およびコリスチン耐性の獲得には MutS の機能欠損が関与していることが示唆された。

ゲノム欠失による炭疽菌のバシトラシン耐性の変化

○古田 芳一¹, 播磨 隼人², 伊藤 絵美子¹, 丸山 史人³, 大西 なおみ¹,
大崎 研⁴, 小川 寛人², David SQUARRE⁵, Bernard Mudenda HANG'OMBE⁶,
東 秀明¹

¹北大 人獣・感染免疫, ²北大 人獣・ザンビア拠点, ³京大 医,

⁴トミーデジタルバイオロジー,

⁵Dep. National Parks and Wildlife, Chilanga, Zambia,

⁶Dep. Para-clinical studies, Sch. Vet. Med., University of Zambia, Lusaka, Zambia

炭疽菌はヒトと動物の両方に感染し、人獣共通感染症である炭疽を引き起こすグラム陽性桿菌である。日本国内では長らく炭疽発生の報告はないが、アフリカやアジアの国々では家畜や野生動物で炭疽が発生しており、ヒトへの感染もしばしば起こることから、経済および公衆衛生の大きな課題となっている。本研究では、ザンビアにおける炭疽菌の系統分布を解析するため、ザンビア国内の様々な場所、宿主、年に分離されたゲノムの解読と比較解析を行った。一塩基多型の分布から、ザンビア分離株は大きく3グループに分類されることがわかった。ゲノム中の大きな挿入・欠失について解析をした結果、あるグループにはリボソーム RNA オペロン間の領域の欠失が見られた。この欠失はPCR と、PacBio シークエンサーによる長鎖シークエンシングによって確認された。欠失した領域に存在していた五つの遺伝子は、いずれもバシトラシン耐性に関わる遺伝子であり、欠失株は野生株と比較してバシトラシンに対して感受性であることを確認した。同様の欠失は他国で分離された遠縁の炭疽菌株でも検出されたため、炭疽菌の進化の過程で独立に複数回起こった欠失であることが示唆された。本研究により得られた知見は、遺伝子マーカーの開発や、ザンビアにおける炭疽の治療法への応用が期待できる。

β -lactamase-negative high-level ampicillin-resistant

Haemophilus influenzae の分子疫学的解析

○本田 宏幸^{1,2}, 佐藤 豊孝², 品川 雅明³, 福島 由華里⁴, 中島 千絵⁴,
鈴木 定彦⁴, 白石 宗², 黒沼 幸治¹, 高橋 聡⁵, 高橋 弘毅¹, 横田 伸一²

¹札幌医科大学・呼吸器・アレルギー内科, ²札幌医科大学・微生物, ³札幌医科大学 附属病院検査部, ⁴北海道獣医, ⁵札幌医科大学・感染制御 臨床検査医学

【背景・目的】*Haemophilus influenzae* は肺炎、髄膜炎、中耳炎、副鼻腔炎等の起炎菌であるが、penicillin-binding protein (PBP) 3 に変異を保有する β -lactam 系抗菌薬耐性株 [β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR)] の増加が問題となっている。BLNAR は *ftsI* 遺伝子にコードされる PBP3 のアミノ酸置換部位によって 4 つのグループ (I, II, III, III-like) に分類される。Lys-Thr-Gly (KTG) motif 近傍の Arg517 または Asn526 のアミノ酸置換を有するものがそれぞれ group I、group II であり、低レベルのアンプシリン耐性を示し low-level β -lactam-resistant BLNAR (Low-BLNAR) と定義される。さらに、group I、group II それぞれに Ser-Ser-Asn (SSN) motif 近傍の Ser385 のアミノ酸置換が加わったものが group III-like、group III であり、高レベルのアンプシリン耐性を示し high-level β -lactam-resistant BLNAR (High-BLNAR) と定義される。近年、日本での High-BLNAR の増加が報告されている。本研究では、*H. influenzae* のアンプシリン耐性に関する遺伝子学的特徴を調査した。

【材料・方法】*H. influenzae* 104 株の β -lactam 系抗菌薬感受性調査、*ftsI* 遺伝子の塩基配列解析、Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析を行った。

【結果】104 株のうち BLNAR は 62 株(60%)であった。BLNAR のうち 57 株(92%)が High-BLNAR であり、group III が 47 株を占めていた。Low-BLNAR の 5 株は全て group II に分類された。BLNAR の割合、BLNAR における High-BLNAR の割合は 2013 年の国内の報告と同様であり、諸外国より高かった。また、High-BLNAR は 26 の ST から成り立っており、多クローン性の拡がりであることが明らかとなった。

膣スワブからの性器クラミジアの検出と MLST 解析 そしてその検出率に影響を及ぼす インドール濃度の測定

○渡辺 宜典¹, 瀧 圭介², 松尾 淳司³, 大久保 寅彦¹, 山口 博之¹

¹ 北大院 保科・病態解析, ² 北海道大学病院, ³ 北海道医療大

偏性細胞内寄生性細菌 *Chlamydia trachomatis*(性器クラミジア)は性感染症の原因菌であり、女性の膣頸管部へのクラミジアの感染率は、性的活動が活発な 20 歳代に限ってみると約 10%と高く、多くの場合は無症候性である。しかしながら、膣頸管部でのクラミジアの生存を許容するメカニズムは十分に理解されていない。これまで私達は、膣内性器クラミジアの感染動態にその細菌叢が与える影響について検討し、膣症が見られないケースにおいてそのクラミジア感染と腸内細菌科細菌 OTU 数(生菌レベルでの検出はできなかった)に関連性があることを見いだした(Taki & Watanabe ら 2018)。この研究成果は、肛門経由で膣内に腸管内容物が流れ込んでいることを示唆している。腸管内容物(糞便)には腸内細菌が作り出す大量のインドール(成人ではおおよそ 2.5mM 程度)が含まれているので(Cappell ら 2016)、生体防御因子 IFN- γ の暴露でクラミジアの生育に必須な細胞内トリプトファン濃度が低下しても肛門経由で膣内に流れ込むインドールが存在するとクラミジアの生存性が助長される可能性がある。そこで私達は、札幌東豊病院で採取された 600 検体程の膣スワブから、インドールを検出すべく、その検出系を構築するとともに、実際のインドール濃度を測定し、クラミジア感染との関連性について検討を加えている。また検出されたクラミジアについては、Herrman ら(2015)の方法に従い MLST 解析(標的遺伝子: *enoA*, *fumC*, *hemN*, *hflx*, *gatA*, *gidA*, *oppA*)を行い、データベース(<http://mlstdb.bmc.uu.se>)と照合し、どのような型が札幌市中で流行しているのか、可視化を試みた。膣内インドールの検出は、Darkoh ら(2015)の Kovács 法に従い測定した。検量線は良好な直線性を示した。臨床検体中インドール量については、現在精査を進めている。またクラミジア陽性検体($n=32$)についてクラミジアの 7 遺伝子座を標的とした MLST 解析を行った結果、ST139 型や ST140 型などが検出されており、全陽性検体の型別決定に向け検討を進めている。本研究は北海道大学保健科学研究院の倫理審査委員会にて承認を得た上で実施している(倫理審査承認番号: 15-99-2)。

フィリピンの家畜とラットとレプトスピラの関係

○安島 菜実¹, 村田 亮¹, 蒔田 浩平², 内田 郁夫¹, 小沼 操¹

¹酪農大 獣医・細菌, ²酪農大 獣医・疫学

【背景】

レプトスピラ症は病原性レプトスピラによって引き起こされる人獣共通感染症である。げっ歯類がレゼルボアとなり、レプトスピラを尿中に排泄することで水や土壌が汚染され、感染源となる。レプトスピラは家畜に流産を起こすことから畜産現場の生産性に影響をおよぼす。フィリピンでは、家の裏庭などで水牛を飼育し、畑作などに使役することがあり人々の生活の中に水牛がいる。またラットを食用に供する習慣があるため、ラットと人の距離も近い。そこで、本研究ではフィリピンの家畜とラットの抗体保有率を明らかにすることでレプトスピラの感染環を把握し、レプトスピラ症の制御につなげることを目的とした。

【材料および方法】

フィリピンの牛の血清 150 検体、水牛の血清 150 検体、豚の血清 100 検体、ラットの血清 33 検体に対して 9 つの血清型の病原性レプトスピラ株を用いて顕微鏡下凝集試験 (MAT) を行い、抗体保有率を調べた。また、各家畜の尿及びラットの腎臓を抗生物質添加 EMJH 培地に接種し、30℃で 3 か月間培養し、レプトスピラの分離を試みた。

【結果・考察】

MAT を行った結果、少なくとも 1 種類の血清型に対して陽性だった割合は牛で 98%、水牛で 90%、豚で 53%、ラットで 55%だった。牛では血清型 Tarassovi、Hardjo、Hebdomadis、水牛では血清型 Hardjo、Grippotyphosa、Tarassovi、豚では血清型 Icterohaemorrhagiae、Tarassovi、Australis、ラットでは血清型 Grippotyphosa、Hebdomadis、Pomona の順に抗体陽性個体が多かった。血清型 Grippotyphosa に対する抗体を有していた個体の割合は牛で 23%、水牛で 43%であった。日本の牛では血清型 Hardjo の抗体保有率が多いが、フィリピンにおいては Tarassovi や Hebdomadis などの様々な血清型に対する抗体を保有していることが明らかとなった。

また、ラットの腎臓から *Leptospira interrogans* 血清型 Grippotyphosa が分離された。このことから血清型 Grippotyphosa はラットと牛や水牛の間で循環していることが考えられるため、レプトスピラ症の予防として農場のネズミ対策を徹底する必要がある。さらに、ラットは市場で食用として流通しているため、人への感染源としても重要である。

“*Candidatus Borrelia fainii*”

～旧世界で発見された新世界型回帰熱ボレリア～

○邱 永晋¹, 中尾 亮², Bernard M. Hang'ombe³, 佐藤 梢⁴, 梶原 将大¹,

Sharon Kanchela⁵, 高田 礼人¹, 澤 洋文¹, 杉本 千尋¹, 川端 寛樹⁴

¹北大 人獣, ²北大 獣医・寄生虫, ³ザンビア大 獣医学部,

⁴国立感染症研究所細菌第一部, ⁵ザンビア大学内病院

回帰熱はグラム陰性らせん菌のボレリア属細菌による感染症の一種で、発熱期と無熱期を数回繰り返すことが特徴である。また、適切な治療が行われなかった場合、高い致死率を示すことが知られている。本疾患はシラミまたはダニによって伝播される人獣共通感染症で、中央アジア、サブサハラ周辺アフリカ、南欧、北アメリカで罹患例が報告されている。回帰熱ボレリア属細菌は、地理的・系統学的にアフリカ大陸に分布する旧世界型と北米大陸に分布する新世界型に大別される。近年、新世界型回帰熱ボレリアの遺伝子検出が散発的にアフリカで報告されている。しかし、菌の分離例はなく、旧世界に分布する新世界型回帰熱ボレリアのベクターや自然宿主は判明していない。

本発表では、ザンビアにおける初症例で南部アフリカでは2例目となる回帰熱症例を報告する。ダニ刺咬後に発熱した患者の血液から回帰熱ボレリア属細菌が分離された。分離された菌のドラフトゲノムを MiSeq にて取得し、8つの house keeping 遺伝子を用いた Multilocus sequence typing (MLST)解析を実施した。また、分離された回帰熱ボレリア属細菌のベクター節足動物ならびに自然宿主を特定するため、発熱患者がダニに刺咬された洞窟にて採集されたマダニならびにコウモリのサンプルからボレリア属細菌遺伝子の検出を試みた。さらに、マダニ乳剤ならびにコウモリ血液よりボレリア属細菌の分離を行った。

MLST 解析により、本菌種は新規ボレリア属細菌であること、さらに新世界型ボレリアに分類されることが判明した。また、ベクター節足動物および自然宿主の探索において、本菌種が 40%(20/50 個体)のマダニ(*Ornithodoros fainii*)ならびに 27%(64/237 個体)のコウモリで検出された。また、3 個体のコウモリから本菌種の分離に成功した。

本研究により、世界で初めて新世界型回帰熱ボレリアが旧世界で分離された。また、分離された回帰熱ボレリア属細菌は、新種であり *Candidatus Borrelia fainii* と命名した。*O. faini* とコウモリがそれぞれベクターならびに自然宿主であることがわかった。今後、全ゲノム比較等により本菌種の詳細な解析を行う必要性がある。また、感染リスクを明らかにするため洞窟周辺住民を対象とした血清学的調査を行う予定である。

大気汚染物質による紫外線からの細菌保護の可能性

○富澤 颯太¹, 能田 淳¹, 内田 玲麻², 村松 康和²

1 酪農大 獣医・環境衛生, 2 酪農大 獣医・人獣共通

【背景・目的】近年、国内で結核の患者数は減少する一方で非抗酸菌症の患者数が増加している。これらの原因菌となる抗酸菌は自然環境下で生育可能な菌であり、環境中に存在する菌の暴露による感染が成立すると考えられている。また、大気汚染物質の生体の免疫応答への影響については調査されてきた一方、細菌に対する直接的な影響は明らかではない。そこで、本研究では大気環境中に存在する菌を想定し、大気汚染物質の一つである煤が抗酸菌に対する環境ストレスである紫外線からの保護作用を示すという仮説を基に、生菌数と SOS 遺伝子である *recA* 遺伝子の mRNA の発現量を指標とし紫外線照射による影響を評価した。【材料及び方法】被検菌として *Mycobacterium. smegmatis* (ATCC 19420) を用いた。ネブライザーにて菌液を 17 L のチャンバーに 3 分間噴霧し、これらをバイオエアロゾルとした。メンブレンフィルターを装着した NILU フィルターホルダーを用いて、ロウソクの不完全燃焼によって発生させた煤と共に生成したバイオエアロゾルをサンプルフィルターに 9 L/min の流速でチャンバー内から吸引してバクテリアと煤の混合物試料をフィルター上に作成した。このサンプルフィルターを 2 分割し、一方に UV 照射を 15、30、60 秒の 3 パターン実施した。それぞれをまた 3 分割し 1ml の 7H9 broth を含むマイクロチューブに入れ、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した後、24 時間培養した。培養した溶液を 7H10 寒天培地に播種し 96 時間培養しコロニー数を計測した。また、培養後の残りの菌液から RNA を抽出し、cDNA 化した後、ストレス応答を示す *recA* 領域の発現を real-time PCR を用いて定量した。【結果】UV を 30 秒照射したサンプルと UV 照射なしのサンプルの CFU を比較すると、煤を含むサンプルは CFU の減少率が少ない傾向が示され、UV を 60 秒照射したサンプルにおいては、煤の有無に係わらず CFU を求めることができなかった。【考察】これらの結果から、今回のロウソクの不完全燃焼によって生成された煤は抗酸菌に対して大きなダメージを与えることなく、紫外線から菌を保護するような働きを示すことが示唆された。しかし、実験室環境下と実大気環境下では様々な条件が異なることや、本実験はフィルター上での混合試料であることなどから、実際に大気中での浮遊細菌と煤の相互作用を理解する上での参考情報に限られる。今後は、実際の大気環境と実験室下の環境の違いを考慮し、異なる大気汚染物質を想定した環境ストレスのモデル実験を行う必要があると考える。

インピンジャー法を用いた 空气中浮遊細菌の捕獲とその性状解析

○鷲見 優斗, 吉川 達哉, 大久保 寅彦, 山口 博之
北大院 保科・病態解析

公共空間の菌叢のかなりの部分が、通行人の体表部や呼気から遊離するものだが、何らかの病原細菌が含まれていれば、その環境を利用する他の人を介して容易に拡散し感染症リスクは高まる。私達は、その制御法を探索することを最終目的として札幌地下歩行空間(520mの直線地下通路)にて柴田科学 LV40BW を用いて空気を採材し、その環境の温度、湿度、微粒子数、通行人数、生菌数と菌叢の変化について詳細に検討した(Okubo et al, PLoS ONE, 2017)。その結果、その空間の菌叢(OTU 数)と生菌数は、地下空間の温度、湿度、微粒子数、そして通行人数と密接に連動し、温度・湿度が上昇した際、その空間に浮遊する粒子数(特に 0.1-0.5 μm サイズの粒子)が上昇し、それに伴い通行人数と菌叢変化さらに遊離する生菌数とが関連性を示しことが明らかになった。その一方で、この調査の採材方法はフィルター法であり、本法は回収粒子が乾燥してしまうため、乾燥に弱い細菌(特にグラム陰性菌)を生きたまま回収するには不向きである。そこで今回の研究では、生きたまま空气中を浮遊している細菌を捕獲することを目的として、インピンジャー(BioSampler (SKC, Inc, USA))[捕集液 20mL を入れたガラス製容器(インピンジャー)の床面に噴流を衝突させ粒子を液中に捕捉する方法]を使用し、空气中の生菌を効率良く回収するために最適な捕集液を選びだし、実際の環境にて空気を採材(10.0L/min で 90 分間)し、浮遊細菌の分離培養[SCD 培地(一般細菌用)、R2A 培地(環境細菌用)、7H11 培地(抗酸菌用)]を行なった。*E. coli* と *S. aureus* の捕集液中[滅菌蒸留水(dw)、50%グリセリン添加 dw、滅菌 PBS、Tween 20 添加 dw]での生存性を比較したところ、dw を捕集液として使用した際、最も効率良く生菌が回収された。その捕集液を用いて実際の環境(①北大構内、②札幌地下歩行空間、③牛舎前)で空気を採材し検討したところ、浮遊細菌数は① $3.1 \times 10^3 \text{CFU/m}^3$ 、② $1.9 \times 10^3 \text{CFU/m}^3$ 、③ $1.2 \times 10^2 \text{CFU/m}^3$ 程度であった。16S rDNA の塩基配列に基づいて菌種同定を行なったところ、地下歩行空間では *Staphylococcus hominis* や *Micrococcus* sp. などヒト皮膚常在菌が分離されたのに対し、牛舎前では *Rhodococcus* sp. など環境菌が分離された。また本法で分離された約 50%程度の菌株がグラム陰性菌だったので、乾燥に弱い細菌を含む浮遊細菌を効率良く回収できる可能性がある。