

第 86 回 日本細菌学会北海道支部学術総会

The 86th Annual Conference of
Japanese Society for Bacteriology Hokkaido Branch

2021 年 8 月 28 日（土）

August 28, 2021 (Sat)



オンライン

Online

北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所

Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

一般演題：発表 10 分間、質疑応答 2 分間
Oral Session: Presentation 10 min, Discussion 2 min

特別公演：公演 50 分間、質疑応答 10 分間
Special Lecture: Lecture 50 min, Questions and Answers 10 min

プログラム Program

開会挨拶

9:00-9:10

鈴木 定彦 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所

セッション 1 Session 1

9:10-10:10

座長：佐藤 豊孝 札幌医科大学・医学部

Chair: Toyoyaka Sato, Sapporo Med Univ School of Med

演題 1. 口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者由来の *Candida albicans* の病原性の比較

○大内 千里^{1,2}、長谷部 晃²、北川 善政¹、坂田 健一郎¹

¹北海道大学大学院歯学研究院 口腔診断内科学教室、²北海道大学大学院歯学研究院 口腔分子微生物学教室

演題 2. *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構成タンパク質をコードする遺伝子の多型解析

榮 宏太郎¹、○永野 恵司²、長谷川 義明¹

¹愛知学院大・歯・微生物、²北海道医療大・歯・微生物

演題 3. *Salmonella* 属菌における百日咳毒素様毒素(ArtAB)遺伝子の細胞内発現

○佐藤 凜¹、三浦 祥¹、村田 亮¹、玉村 雪乃²、渡久川 兼誉¹、別府 美保¹、野崎 千遥¹、楠本 正博²、内田 郁夫¹

¹酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット、²農研機構・動物衛生研究部門・人獣共通感染症研究領域

演題 4. 抗菌薬の繰り返し暴露が *Clostridioides difficile* の性状に与える影響の解明

○鈴木 和総¹、福田 昭¹、中島 千絵²、鈴木 定彦²、臼井 優¹

¹酪農学園大学 獣医学類 食品衛生学ユニット、²北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 バイオリソース部門

演題 5. Host-based approach for identifying virulence factors of pathogens

○Atmika Paudel¹, Yoshikazu Furuta¹, Suresh Panthee², Hiroshi Hamamoto³, Kazuhisa Sekimizu², Hideaki Higashi¹

¹Division of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Hokkaido, Japan, ²Drug Discoveries by Silkworm Models, Faculty of Pharma-Science, Teikyo University, ³Teikyo University Institute of Medical Mycology

休憩

10:10-10:25

セッション 2 Session 2

10:25-11:15

座長：タパ ジーワン 北大・人獣国際共同研

Chair: Jeewan Thapa, Hokkaido Univ Intl Inst Zoonosis Contl

演題 6. Genome investigations of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from food products in Thailand

○Wimonrat Tanomsridachchai¹, Yukari Fukushima¹, Pimlapas Leekitcharoenphon², Neunghatai Supha³, Joseph Yamweka Chizimu¹, Jirachaya Toyting¹, Thoko Flav Kapalamula¹, Chie Nakajima^{1,4}, Orasa Suthienkul³, Yasuhiko Suzuki^{1,4}

¹Division of Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control, ²Research Group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, ³Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Thailand, ⁴International Collaboration Unit, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

演題 7. Molecular epidemiological study of *Staphylococcus argenteus* clinical isolates in Hokkaido

○Meiji Soe Aung¹⁾、漆原 範子¹⁾、川口谷 充代¹⁾、伊藤 政彦²⁾、幅寺 敏²⁾、小林 宣道¹⁾

¹⁾ 札幌医科大学医学部衛生学 ²⁾ 札幌臨床検査センター

演題 8. Analysis of genetic diversity of *Bacillus anthracis* strains and spatial distribution of anthrax vaccination in Southern Africa

○Kamboyi H.K¹, Hang'ombe B.M², Munyeme M³, Furuta Y¹ and Higashi H¹

¹Division of Infection and Immunity, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, ²Microbiology Unit, Paraclinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, ³Public Health unit, Disease Control Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia

演題 9. Development of ELISA based on *Bacillus anthracis* capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax

○Tuvshinzaya Zorigt^{1,2}, Yoshikazu Furuta^{1,2}, Manyando Simbotwe¹, Akihiro Ochi³, Mai Tsujinouchi¹, Misheck Shawa^{1,2}, Tomoko Shimizu¹, Norikazu Isoda⁴, Jargalsaikhan Enkhtuya⁵, and Hideaki Higashi^{1,2}

¹Division of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, ²Graduate School of Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, ³Equine Research Institute, Japan Racing Association, ⁴Laboratory of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, ⁵Laboratory of Food Hygiene, Institute of Veterinary Medicine, Ulaanbaatar, Mongolia

休憩

11:15-11:30

セッション 3 Session 3

11:30-12: 20

座長：福田 昭 酪農学園大・獣医学類

Chair: Akira Fukuda, Dept Vte Med, Rakuno Gakuen Univ

演題 10. 下水およびシンクから採取した繊毛虫の *Legionella pneumophila* に対する感受性の検討

○川代 愛梨¹、玄行 理子¹、大久保 寅彦¹、中村 眞二²、Jeewan Thapa³、山口 博之¹

¹北大院 保科・病態解析、²順天堂大院 医・形態解析イメージング、³北大・人獣リサーチセンター

**演題 11. 3D プリンターで作製したエアサンプラーを用いた空気浮遊細菌の分離と
同定**

○森 沙彩¹、宮崎 悟¹、石黒 咲良¹、鷺見 優斗¹、大久保 寅彦¹、
大森 亮介²、山口 博之¹

¹北大院・保科・病態解析、²北大・人獣リサーチセンター

**演題 12. 高頻度接触乾燥面での大腸菌の生存性を規定する因子の同定とその制御法
の探索**

○今野 綾乃¹、藤井 菜央¹、榎枝 秀朗¹、大久保 寅彦¹、Thapa Jeewan²、
佐藤 豊孝³、横田 伸一³、山口 博之¹

¹北大院・保科・病態解析、²北大・人獣リサーチセンター、³札医大・医・
微生物

**演題 13. アメーバによる細菌運搬現象と Na⁺/H⁺ アンチポーターNhaA との関係性
の検証**

○大久保 寅彦¹、田中 菜那¹、Thapa Jeewan²、佐藤 豊孝³、横田 伸一³、
山口 博之¹

¹北大院・保科・病態解析、²北大・人獣リサーチセンター、³札医大・医・
微生物

休憩

12:20-13:20

セッション 4 Session 4

13:20-14:10

座長：パウデル アトミカ 北大・人獣国際共同研

Chair: Atmika Paudel, Hokkaido Univ Intl Inst Zoonosis Contl

**演題 14. Impact of substituents at 1 and 8 of fluoroquinolones on the activity against
mutant DNA gyrase of *Salmonella Typhimurium***

○Pondpan Suwanthada^a, Nami Ajima^a, Lawrence P. Belotindos^a, Jirachaya Toyting^a,
Ruttana Pachanon^a, Kentaro Koide^b, Hyun Kim^b, Chie Nakajima^{a,c}, Siriporn
Kongsoi^d, Yasuhiko Suzuki^{a,c}

^a Division of Bioresources, Hokkaido University International Institute
for Zoonosis Control, ^b Department of Bacteriology II, National Institute of
Infectious Diseases, ^c International Collaboration Unit, Hokkaido University
International Institute for Zoonosis Control, ^d Department of Veterinary Public
Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

**演題 15. WQ-3034 & WQ-3154: The New Fluoroquinolones with High Inhibitory Effect
against Quinolone-Resistant *Salmonella Typhimurium* DNA Gyrase**

○Jirachaya Toyting¹, Nami Ajima¹, Wimonrat Tanomsridachchai¹,
Lawrence P. Belotindos¹, Thoko Flav Kapalamula¹, Hyun Kim², Fuangfa
Utrarachkij³, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,4}, Yasuhiko Suzuki^{1,4*}

¹Division of Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis
Control, ²Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases,
³Department of Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University,
Thailand, ⁴Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido
University

演題 16. Whole Genome Sequencing Reveals Recent Transmission of Multi-drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strains in Lusaka, Zambia

○Joseph Yamweka CHIZIMU^{1,2,3}, Eddie SOLO^{1,3}, Yukari FUKUSHIMA¹, Precious BWALYA¹, Victor MUKONKA^{2,3}, Chie NAKAJIMA¹, Yasuhiko SUZUKI¹

¹Division of Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control, ²Zambia National Public Health Institute. ³Ministry of Health, Zambia

演題 17. Characterization of mutations associated with streptomycin resistance in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Zambia

○Precious Bwalya^{a,b}, Tomoyuki Yamaguchi^a, Eddie Solo^b, Joseph Y. Chizimu^a, Grace Mbulo^b, Chie Nakajima^{a,c,*}, Yasuhiko Suzuki^{a,c,*}

^aDivision of Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control, ^bDepartment of Pathology and Microbiology, University Teaching Hospital, Ministry of Health, Zambia, ^cInternational Collaboration Unit, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

休憩

14:10-14:25

セッション 5 Session 5

14:25-15:25

座長：大久保 寅彦 北大・保健科学研究所

Chair: Torahiko Okubo, Hokkaido Univ Faculty of Health Sci

演題 18. 焼成ホタテ貝殻粉末と石灰窒素による堆肥中の薬剤耐性菌制御の可能性

○江浪 誠俊¹、福田 昭¹、中島 千絵²、鈴木 定彦²、臼井 優¹

¹酪農学園大学 獣医学類 食品衛生学ユニット、²北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 バイオリソース部門

演題 19. 消毒薬曝露が薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度に及ぼす影響の解明

○塩野 由花、福田 昭、臼井 優

酪農学園大学 食品衛生学ユニット

演題 20. コリスチン耐性遺伝子保有プラスミドが与えるコリスチン治療および生体内定着への影響評価

○佐藤 豊孝¹、山本 聡¹、小笠原 徳子¹、臼井 優²、林 航³、長野 則之³、土井 洋平^{4,5}、田村 豊⁶、高橋 聡^{7,8}、横田 伸一¹

¹札幌医科大学・医学部・微生物学、²酪農学園大学・獣医学群・食品衛生学、³信州大学大学院・総合医理工学研究科・医学系専攻、⁴藤田医科大学・微生物学・感染症科、⁵ピッツバーグ大学医学部・感染症内科、⁶酪農学園大学・動物薬教育研究センター、⁷札幌医科大学・医学部・感染制御・臨床検査医学、⁸札幌医科大学附属病院・検査部

演題 21. *Enterobacter cloacae* complex におけるコリスチン耐性機序の解明

○福澤 翔太^{1,2}、佐藤 豊孝¹、青木 弘太郎³、福島 由華里⁴、山本 聡¹、小笠原 徳子¹、中島 千絵⁴、鈴木 定彦⁴、高橋 聡^{5,6}、横田 伸一¹

¹札幌医科大学医学部微生物学講座、²北海道がんセンター臨床検査科、³東邦大学医学部微生物・感染症学講、⁴北海道大学人獣共通感染症リサーチセ

ンター、⁵札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座、⁶札幌医科大学
附属病院検査部

**演題 22. Clonal transmission of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST69 between
poultry and humans in Lusaka, Zambia**

○Misheck Shawa,^a Yoshikazu Furuta,^a Atmika Paudel,^a Bernard Hang'ombe,^b
Hideaki Higashi^{a#}

^aDivision of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control,
Hokkaido University, Sapporo, ^bDepartment of Para-clinical Studies, School of
Veterinary Medicine, University of Zambia, Zambia

休憩

15:25-15:40

特別公演

15:40-16:40

座長：鈴木 定彦 北大・人獣国際共同研

Chair: Yasuhiko Suzuki, Hokkaido Univ Intl Inst Zoonosis Contl

わが国における動物由来薬剤耐性菌研究の過去・現在・未来

田村 豊

酪農学園大学動物薬教育研究センター

支部会賞授賞式

16:40-16:55

閉会式

16:55-17:00

口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者由来の *Candida albicans* の病原性の比較

○大内 千里^{1,2}、長谷部 晃²、北川 善政¹、坂田 健一郎¹

¹北海道大学大学院歯学研究院 口腔診断内科学教室

²北海道大学大学院歯学研究院 口腔分子微生物学教室

口腔カンジダ症は口腔内の常在菌である *Candida* 属菌種による日和見感染であり、*Candida* 菌は宿主の加齢や薬剤による免疫機能の低下、口腔乾燥や義歯の使用によって増殖し、口腔内の疼痛や味覚異常などの様々な症状を引き起こすことが知られている。しかし宿主側だけではなく *Candida* 菌自体の違いもある可能性があるのではないかと考え、口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者由来の *Candida albicans* を用いて病原性を比較・検討することにした。

対象は北海道大学病院歯科診療センターを受診し口腔内の疼痛等の症状を訴えカンジダ検査を実施した患者とした。歯科用ミラーにて舌背を 10 回程度擦過し採取したサンプルを *Candida* 菌と特異性の高いクロモアガー培地に接種し 48 時間インキュベーターにて培養した。その結果、当センター診断基準に基づきコロニーが 10 個以上あったものを口腔カンジダ症、コロニーが検出されても 10 個未満であったものを非口腔カンジダ症と判断した。クロモアガー培地で検出された *C. albicans* をサブロー液体培地で培養後、使用時まで冷凍保存した。これらの冷凍保存株を用いて以下の、①寒天培地を用いた細胞外分泌酵素活性（アスパラギン酸プロテアーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、ヘモリジン）の測定、②PCR による *C. albicans* の遺伝子型の同定、③口腔上皮細胞系細胞の *C. albicans* 刺激で誘導される IL-8 の ELISA 法による測定、ならびに④ *C. albicans* により誘導される口腔上皮細胞系細胞への細胞死の誘導を LDH の測定で調べる方針とし、結果を比較して口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者での病原性の違いを検討した。

Porphyromonas gingivalis の Mfa1 線毛構成タンパク質をコードする遺伝子の多型解析

榮 宏太朗¹、○永野 恵司²、長谷川 義明¹

¹愛知学院大・歯・微生物

²北海道医療大・歯・微生物

Porphyromonas gingivalis (グラム陰性嫌気性細菌) は、歯周病の発症や進行に強く関連する。本菌は、通常、FimA および Mfa1 と呼ばれる 2 種類の線毛を発現する。両線毛は、主要タンパク質である FimA および Mfa1 に加え、それぞれ、4 つのアクセサリタンパク質 (FimB～FimE および Mfa2～Mfa5) から構成される。また、これらのタンパク質をコードする *fimA*～*fimE* 遺伝子および *mfa1*～*mfa5* 遺伝子は、染色体上で、それぞれクラスターを形成している。

fimA には 5 つの遺伝子型が存在し、遺伝子型と病原性との間に関連性が存在することが報告されている。一方、*mfa1* には、53 型 (*mfa1*⁵³) および 70 型 (*mfa1*⁷⁰) の 2 つの遺伝子型が報告されているが、病原性との関連は明確ではない。本研究では、*P. gingivalis* のゲノム未解読の 12 株と、ゲノムが公開されている 62 株 (計 74 株) の、*mfa1*～*mfa5* の遺伝子多型について解析した。また、*fimA*～*fimE*、および *mfa* 遺伝子クラスターの下流に位置し、遺伝子多型が報告されている *ragA* および *ragB* の多型についても解析した。

mfa1 遺伝子型は、これまでの報告通り、*mfa1*⁵³ と *mfa1*⁷⁰ に分類されたが、*mfa1*⁷⁰ は、さらに、2 つのサブタイプ (70A および 70B 型) に分類されることが示された。また、*mfa2*～*mfa4* にも多型が認められ、それらの遺伝子型は、*mfa1* の遺伝子型と一致した。ただし、70 型のサブタイプは観察されなかった。一方、*mfa5* は、他の遺伝子型とは独立し、5 つの遺伝子型 (A～E) がみられた。遺伝子型 A はさらに 2 つのサブタイプ (A1 と A2) に分類された。また、驚いたことに、*mfa5* 遺伝子が、2 つ連続して並んで存在する株が存在した。さらに、その場合、2 番目の *mfa5* は、すべて E 型であった。Mfa5 タンパク質の C 末側は、すべての遺伝子型で高い相同性がみられ、IX 型分泌装置によって認識される C 末端ドメインも高度に保存されていた。一方、A、B および C 型の N 末側には、von Willebrand factor ドメインや免疫グロブリン様ドメインが検出されたが、D および E 型にはみられなかった。*mfa1* 遺伝子型は、*ragA*/*ragB* 遺伝子型と相関する傾向がみられたが、*fimA* 遺伝子型との相関は認められなかった。

本研究から、Mfa1 線毛の遺伝子型と病原性との解析には、*mfa1* 遺伝子型だけではなく、アクセサリタンパク質の遺伝子型、特に、*mfa5* との関連性、さらに、他の遺伝子の多型との関連性について検討する必要があると示唆される。

Salmonella 属菌における百日咳毒素様毒素 (ArtAB) 遺伝子の細胞内発現

○佐藤 凜¹、三浦 祥¹、村田 亮¹、玉村 雪乃²、渡久川 兼誉¹
別府 美保¹、野崎 千遥¹、楠本 正博²、内田 郁夫¹、

¹酪農学園大学・獣医学群・獣医細菌学ユニット

²農研機構・動物衛生研究部門・人獣共通感染症研究領域

【背景】 *Salmonella* Typhimurium フェージ型 DT104 (DT104)、*S. Worthington* (SW) などのサルモネラ属菌が百日咳毒素と類似した毒素 ArtA/ArtB (ArtAB) を産生することが報告されている。これまでの研究により、*artAB* 遺伝子はマイトマイシン C (MTC)、キノロン系抗生物質、H₂O₂などの処理により誘導的に発現することが知られているが、*in vivo* での発現は不明である。そこで本研究では DT104 をマクロファージ様細胞 RAW264.7 に貪食させ、リアルタイム PCR 法および蛍光免疫染色法により細胞内における *artAB* の発現について解析した。

【方法】 DMEM 培地で RAW264.7 細胞を培養後、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; 0.2 μM) を添加し、マクロファージ由来の H₂O₂ 産生を誘導した。そこへ Syncase 培地で一晚振とう培養し、正常マウス血清によりオプソニン化した DT104 を MOI 50:1 となるように加えインキュベートした。その後、ゲンタマイシン処理により細胞外の菌を除去し、3 時間培養後、0.1 % の Triton X-100 で細胞を溶解して得られた細胞内の菌から total RNA を抽出した。この RNA を用いて、リアルタイム PCR 法により各遺伝子の発現量を定量した。

【結果と総括】 RAW264.7 細胞内での DT104 の *artA* 発現量は、*in vitro* での発現量と比較して有意に増加した。また、細胞の H₂O₂ を含む活性酸素種の産生を刺激することが知られている PMA で処理した群では、無処理群と比較し発現量がさらに増加していた。これらのことから *artAB* は RAW264.7 細胞内で誘導的に発現し、その発現誘導はマクロファージ由来の H₂O₂ で増強することが示唆された。また、DT104 では *oxyR* と *cI* の発現量に有意な変化が認められなかったが、SW では細胞内で *oxyR* と *cI* が有意に増加し、*artA* の有意な増加が見られなかった。以上より、マクロファージ内における DT104 の *artAB* は H₂O₂ により誘導的に発現するが、SW のように *oxyR* の発現応答が強い菌では CI によりフェージ誘導が抑制されるために *artAB* の細胞内発現が弱くなることが示唆された。

抗菌薬の繰り返し暴露が *Clostridioides difficile* の性状に与える影響の解明

○鈴木 和総¹、福田 昭¹、中島 千絵²、鈴木 定彦²、臼井 優¹

¹酪農学園大学 獣医学類 食品衛生学ユニット

²北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 バイオリソース部門

【背景・目的】

Clostridioides difficile (CD) は芽胞を形成するグラム陽性偏性嫌気性桿菌で、抗菌薬関連下痢症の主要な原因菌である。CD 感染症は再発率が高いことが問題となっており、要因の一つとして、治療後も芽胞が腸内に残存することが考えられている。CD はヒトと動物の腸内に高率に存在し、ヒトおよび獣医療において、頻繁に抗菌薬に暴露されている。それゆえ、抗菌薬による耐性変異体や芽胞の選択が繰り返されているが、抗菌薬の繰り返し暴露が CD の性状に与える影響の評価は不十分である。そこで、ヒトおよび獣医療において使用頻度が高い抗菌薬を CD に繰り返し暴露し、影響について芽胞形成率に着目して評価した。

【材料と方法】

CD ATCC1382 にセファゾリン、シプロフロキサシン (CPFX)、テトラサイクリンを 5 回暴露した。すなわち、最小発育阻止濃度 (MIC) の 0.25~4 倍 (低濃度)、または MIC の 10 倍 (高濃度) の抗菌薬を含有する液体培地で継代を繰り返した。その後、暴露菌群および単離された進化株の MIC と芽胞形成率を測定した。また、芽胞形成率が上昇した進化株の全ゲノム解析を行った。

【結果と考察】

低濃度暴露では CPFX 暴露群のみ CPFX に対する MIC が上昇した。一方、高濃度暴露では MIC に変化はなく、全ての抗菌薬の暴露で芽胞形成率が上昇した。全ゲノム解析の結果、複数の遺伝子に変異が認められた。以上の結果より、抗菌薬の繰り返し暴露により、芽胞が選択され、集団での芽胞形成率が上昇した。また、芽胞形成率の上昇は、複数の遺伝子の変異による複合的な変化によって起こることが示唆された。以上のことから、CD の芽胞形成率は、抗菌薬の種類に関わらず、抗菌薬暴露により上昇することが明らかとなった。

Host-based approach for identifying virulence factors of pathogens

○Atmika Paudel¹, Yoshikazu Furuta¹, Suresh Panthee², Hiroshi Hamamoto³,
Kazuhisa Sekimizu², Hideaki Higashi¹

¹ Division of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University

² Drug Discoveries by Silkworm Models, Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

³ Teikyo University Institute of Medical Mycology

Pathogens sense host factors after coming in contact with the host and produce virulence factors. Virulence factors production allows pathogens to survive and resist host attack and prepare a favorable environment for the establishment of infection. Therefore, a host-based approach is required for understanding the behavior of the pathogens during infection. I propose the use of silkworm (*Bombyx mori*), an invertebrate animal, as the *in vivo* platform for identifying pathogen virulence factors required for infection. Silkworms possess innate immunity and respond to pathogen invasion by activating humoral and cellular immune responses. Human pathogenic bacteria are also pathogenic to silkworms, and infected worms can be rescued by clinically used antibiotics indicating that they can be used as model animals to study infections caused by human pathogens. Furthermore, silkworms are big enough to inject with the precise number of microbial cells, allowing the quantitative comparison of virulence among the pathogens. Yet, they are small enough and easy to handle to facilitate large-scale screening. Using the silkworm infection model, we screened the gene-disrupted mutant library of a highly pathogenic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. We discovered eight novel virulence factors which were also required for virulence of *S. aureus* in the mice infection model. We characterized one of the virulence factors, YjbH, and found that it regulates the expression of many virulence-related genes and protects the bacteria from oxidative stress *in vivo*. Due to a good correlation of the virulence factors in silkworms and mice, we propose that silkworm is a suitable animal model for determining the virulence of pathogens. In this presentation, I will introduce the utilization of silkworms to identify virulence factors of pathogenic bacteria.

Genome investigations of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from food products in Thailand

○Wimonrat Tanomsridachchai¹, Yukari Fukushima¹, Pimlapas Leekitcharoenphon², Neunghatai Supha³, Joseph Yamweka Chizimu¹, Jirachaya Toyting¹, Thoko Flav Kapalamula¹, Chie Nakajima^{1,4}, Orasa Suthienkul³, Yasuhiko Suzuki^{1,4}

¹Div Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

²Research Group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Denmark

³Dept Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Thailand.

⁴International Collaboration Unit, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

Background: Animal food products might serve as potential vehicles for the transmission of Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) ST398. LA-MRSA ST398 is the most widely disseminated in European countries, while ST9 is more predominant in Asian countries. In recent years, the LA-MRSA ST398 in Thailand was detected in swine and pork. However, the origin and route of transmission of LA-MRSA ST398 in Thailand are unclear and have not been investigated. The objective of this study was to determine the possible origins of LA-MRSA ST398 in Thailand.

Methods: Genomic characterization of seven Thai LA-MRSA ST398 from slaughtered pig (n=1) and pork samples (n=6) were performed by whole-genome sequencing (WGS). Moreover, genomes from the public database were included in this analysis to reconstruct phylogenetic relationship based on Single-nucleotide polymorphisms (SNPs).

Results: The results showed that Thai LA-MRSA ST398 in animal food products were related to Danish lineage. L1 and L3 were the dominant lineage in these isolates. All seven LA-MRSA ST398 strains were of SCCmec type V. Six of all LA-MRSA ST398 strains were *spa* t034 and one was *spa* t1255. All isolates were found to carry exoenzyme genes (*aur*) and toxin genes (*hlgA*, *hlgB*, and *hlgC*). There was one isolate carrying genes encoding staphylococcal enterotoxins (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, and *seu*) that belonged to *spa* t1255.

Conclusions: It is important to continue investigating the origin of LA-MRSA ST398 among animal food production chain. Moreover, implementation of effective measures to prevent the transmission of LA-MRSA among pigs, humans, and animal foods is necessary.

Molecular epidemiological study of *Staphylococcus argenteus* clinical isolates in Hokkaido

○Meiji Soe Aung¹⁾、漆原 範子¹⁾、川口谷 充代¹⁾、伊藤 政彦²⁾、幅寺 敏²⁾、
小林 宣道¹⁾

¹⁾ 札幌医科大学医学部衛生学

²⁾ 札幌臨床検査センター

BACKGROUND: *Staphylococcus argenteus* is a novel staphylococcal species that is genetically close to *S. aureus*. Although it has been increasingly reported worldwide as a causative agent of various infectious diseases, the epidemiological situation in Japan has not yet been well clarified. This study was conducted to determine prevalence of *S. argenteus* clinical isolates in Hokkaido, and analyze their genetic characteristics, including drug resistance determinants and virulence factors.

METHODS: *S. argenteus* were isolated from various clinical specimens that were submitted to the Sapporo Clinical Laboratory Inc., Sapporo, Japan, from medical facilities in Hokkaido for one year from August 2019. Initial screening of *S. argenteus* was performed by MALDI-TOF MS and confirmed genetically by PCR and direct sequencing of NRPS gene. Resistance to various drugs were examined by broth microdilution test, genotypes and the presence of virulence factors/drug resistance genes were analyzed by PCR and sequencing.

RESULTS: A total of 82 strains of *S. argenteus* were isolated in one year, which corresponded to 0.66% of total number of *S. aureus* isolates in the same period. They were classified into three genotypes, ST2250-*coa*-XI_d (37, 45.1%), ST1223-*coa*-XV (25, 30.5%), and ST2198-*coa*-XIV (20, 24.4%). The source of clinical specimens was diverse, mostly from sputum, followed by stool, nasal discharge, and otorrhea. All the ST1223 isolates had *egc*-2 cluster (*seg-sei-sem-sen-seo-seu*) and 60% of isolates harbored *seb* (*seb3* and one novel variant *seb6*). All the ST2250 isolates had *sey*, and 68% of this ST carried *sel26-sel27*. Panton-Valentine leucocidin (PVL) genes were detected in only an ST2250 isolate, and another one ST2250 isolate was resistant to oxacillin and had *mecA* gene located in SCC_{mec}-IV_c. Various drug resistance genes such as *blaZ*, *erm(C)*, *msr(A)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, and *lnuA* were identified mostly in ST2198 isolates that showed resistance to penicillin, macrolide, and aminoglycoside.

CONCLUSION: This study revealed the persistently low prevalence of *S. argenteus* comprising three STs in Hokkaido, Japan. Antimicrobial susceptibility and the prevalence of virulence factors were different depending on ST.

Analysis of genetic diversity of *Bacillus anthracis* strains and spatial distribution of anthrax vaccination in Southern Africa

○Kamboyi H.K¹, Hang'ombe B.M², Munyeme M³, Furuta Y¹ and Higashi H¹

¹Division of Infection and Immunity, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

²Microbiology Unit, Paraclinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, Zambia

³Public Health unit, Disease Control Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, Zambia

Bacillus anthracis, the causative agent of anthrax, is a multi-host zoonotic pathogen affecting populations worldwide, especially in resource limited countries. *B. anthracis* forms spores that are highly resistant to extremes of weather and chemicals, enabling it to survive in soil for several decades.

We conducted anthrax risk mapping and anthropogenic assessment for sporadic outbreaks in Zambia. A total of 80 spatially compounded environmental and biological samples were collected within livestock production and wildlife conservation areas in the upper Zambezi basin. *B. anthracis* was identified via multiplex PCR targeting the chromosomal BA813 and 16S rRNA genes, pXO1 protective antigen (*pag*) gene, and pXO2 capsule (*cap*) gene. From the 80 samples, 15 (10 soil and 5 carcass) pure isolates of *B. anthracis* were obtained, which were spatially clustered across four districts. Questionnaires ($n = 113$) were administered in independent villages distinct in time and space. Multivariate logistic regression revealed 12 biologically plausible variables, including herd size (OR = 10.46; 95% CI = 8.8–16), carcass disposal method (OR = 6.9; 95% CI = 3.4–9.8), poor veterinary services (OR = 10.87; 95% CI = 4.8–15.9), and management system (OR = 2.57; 95% CI = 1.3–7.5). The odds of outbreaks were 10 times more in non-vaccinated herds than those vaccinated in similar endemic areas. Our results suggested that poor veterinary services, particularly the lack of anthrax vaccination, increased the likelihood of outbreak recurrency. Furthermore, the observed environmental contamination with *B. anthracis* spores was likely caused by anthrax carcass dressing and meat distribution, a common practice in the study area.

In southern Africa, anthrax has emerged as a serious transboundary disease, but control strategies vary in each country. Given our previous findings, we intend to expand our analysis to include other countries in the southern African region. We will conduct a whole genome-based analysis of the genetic diversity of *B. anthracis* strains to detect single nucleotide polymorphisms, insertions, and deletions. As a novel approach, we will also map the distribution of anthrax vaccine-induced antibodies detected on enzyme-linked immunosorbent assay versus outbreaks to show the correlation between vaccination levels and outbreaks. We envisage the findings of this study will influence policy direction in southern Africa aimed at harmonizing effective anthrax control strategies.

Development of ELISA based on *Bacillus anthracis* capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax

○Tuvshinzaya Zorigt^{1,2}, Yoshikazu Furuta^{1,2}, Manyando Simbotwe¹, Akihiro Ochi³, Mai Tsujinouchi¹, Misheck Shawa^{1,2}, Tomoko Shimizu¹, Norikazu Isoda⁴, Jargalsaikhan Enkhtuya⁵, and Hideaki Higashi^{1,2}

¹Division of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University

²Graduate School of Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

³Equine Research Institute, Japan Racing Association

⁴Laboratory of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

⁵Laboratory of Food Hygiene, Institute of Veterinary Medicine, Ulaanbaatar, Mongolia

Abstract: Anthrax is a worldwide zoonotic disease caused by *Bacillus anthracis*, which remains hyperendemic in parts of Africa and Asia. Detecting naturally acquired antibodies against anthrax in animals is critical for anthrax surveillance and effective control measures. Serological assays based on protective antigen (PA) of *B. anthracis* are primarily used for anthrax surveillance and vaccine evaluation. Even though the assay is reliable, it is challenging to distinguish the naturally acquired antibodies from vaccine-induced immunity in animals because PA is cross-reactive to both antibodies. Although additional data on the vaccination record of animals could bypass this problem, such data are not readily accessible in many cases.

Here we developed a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific to antibodies against capsule biosynthesis protein CapA antigen of *B. anthracis*, which is non-cross-reactive to vaccine-induced antibodies in horses. Using *in silico* analyses, we screened coding sequences encoded on pXO2 plasmid, which is absent in the veterinary vaccine strain Sterne 34F2 but present in virulent strains of *B. anthracis*. Capsule biosynthesis protein CapA (GBAA_RS28240) and peptide ABC transporter substrate-binding protein (GBAA_RS28340) were detected by antibodies in infected horse sera among the 8 selected candidates. Of these, CapA has not yet been identified as immunoreactive in other studies to the best of our knowledge. In view of the solubility and specificity of whole length CapA, we prepared the C-terminus region of the protein, named CapA322, and developed CapA322-ELISA based on a horse model. Comparative analysis of the CapA322-ELISA and PAD1-ELISA (ELISA using domain 1 of PA) showed that CapA322-ELISA could detect anti-CapA antibodies in sera from infected horses but was non-reactive to sera from vaccinated horses.

The CapA322-ELISA could contribute to anthrax surveillance in endemic areas, and two immunoreactive proteins identified in this study could be additives to the improvement of current or future vaccine development.

下水およびシンクから採取した繊毛虫の *Legionella pneumophila* に対する感受性の検討

○川代 愛梨¹、玄行 理子¹、大久保 寅彦¹、中村 眞二²、Jeewan Thapa³、山口 博之¹

¹ 北大院 保科・病態解析

² 順天堂大院 医・形態解析イメージング

³ 北大・人獣リサーチセンター

【背景・目的】河川や土壤に存在するレジオネラ属菌は、エアロゾルを発生させる人工環境(循環式浴槽、冷却塔等)を介して人に感染するとレジオネラ肺炎などを引き起こす。これら人工環境には、様々な原生生物が生息し、その中でもアメーバは、レジオネラが増殖する場を提供する。一方、アメーバ同様にそれらの環境に生息する繊毛虫のレジオネラの生態における役割は不明な点が多い。アメーバと同様に身の回りの生活用水中に存在する繊毛虫とレジオネラの相互作用について明らかにするために、本研究では下水のシンクトラップから採取した繊毛虫 2 種および実験室株の繊毛虫とレジオネラをそれぞれ共培養し、繊毛虫のレジオネラに対する感受性を検討した。【材料・方法】IV型分泌装置の遺伝的背景が異なる 2 種の *Legionella pneumophila* (Lp) JR32 および JR32 $\Delta dot/icm$ (静岡県立大 三宅博士より分与)と、マンホール下水から採取された *Anteglaucoma* sp. CS11A、シンクトラップから採取された *Colpoda* sp. E6、実験室株の *Tetrahymena thermophila* IB の 3 種の繊毛虫を用いた。レジオネラと繊毛虫を MOI 10,000 で混和し室温で共培養した。経時的に蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて繊毛虫の形態と捕食された Lp の様子を観察し、レジオネラ数と繊毛虫数を算定した。また、Lp JR32 トランスポゾン(Tn)挿入変異株ライブラリーを作成し、一部の繊毛虫への感受性が変化した株の選別も行った。【結果・考察】*Tetrahymena* IB とは対照的に *Anteglaucoma* CS11A は *dot/icm* 依存的に Lp JR32 との共培養で全滅した。*Colpoda* E6 は Lp JR32 の取込み量が少なく、Lp の存在に関わらずシスト化した。このように *Anteglaucoma* CS11A は Lp IV型分泌装置依存的に Lp に殺滅され、*Colpoda* E6 はシスト形成を介して Lp の感染から回避すると考えられた。現在 *Anteglaucoma* CS11A の死滅に関与するエフェクター分子を探索するために、Lp Tn 挿入変異株を用いた *Anteglaucoma* CS11A との共培養実験を進行中である。

3D プリンターで作製したエアサンプラーを用いた空気 浮遊細菌の分離と同定

○森 沙彩¹、宮崎 悟¹、石黒 咲良¹、鷺見 優斗¹、大久保 寅彦¹、大森 亮介²、
山口 博之¹

¹ 北大院・保科・病態解析

² 北大・人獣リサーチセンター

浮遊細菌のありのままの生態をより正確に理解するためにもバイアスが生じる遺伝子増幅に頼らない生菌レベルでの捕獲法が必要である。その一方、浮遊細菌の検出にはエアサンプラーが用いられるが、収量の多いフィルター法は乾燥しやすいために生菌数の算出が難しく、生きた細菌の回収に適したインピンジャー法は収量が少ないという欠点がある。本研究では浮遊細菌を生きたまま効率的に回収できるデバイスの構築を目的に、サンプラーを 3D プリンターで自作し、その有効性を検証した。エアサンプラーは 3D モデリングソフトウェアで設計し 3D プリンターで作成（素材:PLA、吸気量 2,000L/min）した。予備実験としてサンプラー回収菌数と自由落下細菌数を比較(n=11)した結果、サンプラー回収菌数(687.818±494.045CFU)は落下細菌数(249.091±224.853CFU)よりも有意に多かった(p=0.018)。次に、実際の採材(n=37)としてビル 3 階の窓を開放してサンプラーを 2 時間稼働させ、内部の R2A 寒天培地に空気を吹き付けた後、30℃で培養して生菌数を数えた。得られた生菌数は平均 625.811 CFU で、最大 4,320 CFU から最小 19 CFU まで幅があった。また、浮遊細菌数と気象条件（気温・湿度・風速・日射量・降水量、気象庁データを使用）の関係を調べるためにスピアマンの順位相関係数を求めたところ、生菌数と正の相関があった気象条件は風速(rs=0.416, p=0.012)・日射量(rs=0.464, p=0.005)と、負の相関があった気象条件は湿度(rs=-0.521, p=0.002)・24 時間雨量(rs=-0.436, p=0.045)だった。これは、乾燥した風の強い日に生菌数が増加したことを示しており、塵埃の影響と考えられた。さらに、総菌数と生菌数の相関性を確認するため、サンプラーで精製水に空気を吹き付けて得られた回収液から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子量を測定した結果、遺伝子量と生菌数には正の相関(rs=0.344, p=0.041)がみられた。分離株のうち、指標菌(*S.aureus*, *E.coli*)に対して抗菌活性を有する菌株を阻止円形成の有無で調べた結果、ランダムに選んだ 952 株のうち 67 株(7.04%)がいずれかの指標菌に対し阻止円を形成した。このうち 50 株は *Bacillus* sp.で、その中でも *Bacillus velezensis* は高い抗菌活性を示していた。以上より、3D プリンターを用いた今回のエアサンプラーは、空气中浮遊細菌の生け捕りに有効であり、浮遊細菌と環境因子の関係の推定や分離株の性状解析など多目的に用いることができた。

高頻度接触乾燥面での大腸菌の生存性を規定する因子の同定とその制御法の探索

○今野 綾乃¹、藤井 菜央¹、榎枝 秀朗¹、大久保 寅彦¹、Thapa Jeewan²、
佐藤 豊孝³、横田 伸一³、山口 博之¹

¹北大院・保科・病態解析

²北大・人獣リサーチセンター

³札医大・医・微生物

手すりやドアノブ等の高頻度接触面は、病原細菌を含め多くの病原体が付着するホットスポットであり、接触感染の主要な原因である。これらの接触面は、乾燥環境であり、病原細菌は乾燥抵抗性因子を駆使してその過酷な環境に適応していると考えられている。しかしながら、乾燥面での病原細菌の制御法や乾燥面での生存性を規定する細菌因子は良く分かっていない。一方、私達は、乾燥面での大腸菌の生存性が、37°C程度に温めることで顕著に低下することを発見し(Shimoda ら PLoS ONE, 2019)、大腸菌 Tn 挿入変異株ライブラリーから乾燥面での抵抗性を規定する責任遺伝子の候補として Na⁺/H⁺ アンチポーターをコードする *nhaA* を同定した(未発表)。そこで本研究では、温度変化と連動して変化する湿度が、乾燥面での大腸菌の生存性を温度で制御する際に与える影響を検討すると共に、大腸菌 *NhaA* 欠損株を作成し、*NhaA* の乾燥面での役割について明らかにした。恒温恒湿度環境は、平衡調温調湿方式の培養装置(制御範囲: -20~+150°C, 30~95% rh)にて構築した。LB 液体培地に懸濁した大腸菌 DH5α 菌液をプラスチックシャーレ上に滴下 (10⁵ CFU/spot) して自然乾燥させ、様々な恒温恒湿度環境(22~37°C, 45~75% rh)にて放置した。最大4日静置後にスポットを洗浄回収して生菌数を算出した。その結果、37°Cで湿度の上昇に伴い大腸菌の生存性は著しく低下した。また *E.coli* DH5α を元株に、*nhaA* 欠損株 (Red/ET recombination で作製) と再導入株を作出して実験に供試した。その結果、元株および再導入株では4日目まで菌の生存が認められたが、欠損株は速かに死滅した。また *NhaA* 特異的阻害剤 2-Aminoperimidine hydrobromide 暴露は、大腸菌の乾燥面での生存性を有意に低下させた。現在、様々な恒温恒湿環境での大腸菌の *nhaA* の発現変化について検討を進めている。以上の結果より、大腸菌の乾燥面での生存性は、温度のみならず湿度を制御することでより一層抑制できることが明らかになった。また *NhaA* が大腸菌の乾燥抵抗性を規定する責任分子であることが明らかになった。乾燥時に菌体から細胞外へ Na⁺を排出することで、水分減少に伴う塩分濃縮に抵抗している可能性がある。

アメーバによる細菌運搬現象と Na^+/H^+ アンチポーターNhaA との関係性の検証

○大久保 寅彦¹、田中 菜那¹、Thapa Jeewan²、佐藤 豊孝³、横田 伸一³、山口 博之¹

¹ 北大院・保科・病態解析

² 北大・人獣リサーチセンター

³ 札医大・医・微生物

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(Matsuo *et al*, Environ Microbiol Rep, 2010)、このアメーバがヒト病原性細菌(大腸菌、サルモネラ、緑膿菌など)を共生細菌依存的にアメーバ表面に固着させ寒天培地上で生きたまま運搬する現象を見いだした(Okubo *et al*, Environ Microbiol Rep, 2018)。また、大腸菌トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを用いた実験から、この現象に関わる細菌側因子として細胞内から細胞外への Na^+ の輸送を担う Na^+/H^+ アンチポーターNhaA がその候補であることを特定した(田中ら、日本細菌学会北海道支部会 2019)。本研究では *nhaA* が運搬現象に関わる因子であることの検証を進めるとともに、その機序についての検討を行なった。*E.coli* DH5 α を元株に、*nhaA* 欠損株 (Red/ET recombination で作製) と再導入株を作出し、S13 アメーバと寒天培地上で共培養した結果、欠損株では細菌運搬現象が完全に消失したのに対し、再導入株では現象が復帰した。また、NhaA 特異的阻害剤である 2-Aminoperimidine hydrobromide (以下 2-AP) 10/50/100 μM 添加下で共培養した結果、2-AP の濃度依存的に細菌運搬現象が減弱した。これらの結果から、S13 アメーバによる細菌運搬現象には細菌の NhaA が必要であることが示された。一方、NhaA を欠損または阻害した *E.coli* の形態を SEM やグラム染色にて観察すると、本来の菌体形状と比べてフィラメント状の細長い形態になることが確認された。そこで菌体形状のフィラメント化によって運搬現象が阻止されたと仮定し、mitomycin C 0.01 / 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 添加下でフィラメント状になった *E.coli* DH5 α と S13 アメーバを共培養を行ったところ、NhaA 阻害時と同様に運搬現象が減弱した。以上の結果は、S13 アメーバによる細菌運搬現象に関わる細菌側因子として菌体形状が重要であることを示唆している。

Impact of substituents at 1 and 8 of fluoroquinolones on the activity against mutant DNA gyrases of *Salmonella* Typhimurium

○Pondpan Suwanthada^a, Nami Ajima^a, Lawrence P. Belotindos^a, Jirachaya Toyting^a, Ruttana Pachanon^a, Kentaro Koide^b, Hyun Kim^b, Chie Nakajima^{a,c}, Siriporn Kongsoi^d and Yasuhiko Suzuki^{a,c}

^a Div Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

^b Dept Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Japan

^c International Collaboration Unit, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

^d Dept Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

Aims:

To elucidate the inhibitory activities of WQ-3810, WQ-3334, and WQ-4065, which had the substituents at 1 and 8 of fluoroquinolones against supercoiling activity of recombinant *S. Typhimurium* mutant DNA gyrases

Materials and methods:

In vitro assays to evaluate inhibitory effects of WQ-3810, WQ-3334, and WQ-4065 against supercoiling activity of recombinant *S. Typhimurium* DNA gyrase with GyrA-Wild Type (WT), GyrA-Ser83Ile, GyrA-Ser83Phe, GyrA-Asp87Gly, GyrA-Asp87Asn, GyrA-Asp87Tyr, and GyrA-Ser83Phe-Asp87Asn were performed. And the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) for *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* of these drugs were assessed by the micro-broth dilution method.

Results:

Half-maximum Inhibitory Concentrations (IC₅₀s) of WQ-3810 and WQ-3334 against WT and mutant *S. Typhimurium* were lower than IC₅₀s of WQ-4065. In addition, the MIC against *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* of WQ-3810 and WQ-3334 were lower than WQ-4065.

Conclusion:

This study highlighted the impact of a substituent at 1 and 8 of fluoroquinolones on WQ-3810 and WQ-3334, which can be candidate drugs for the treatment of fluoroquinolone-resistant Salmonellosis.

WQ-3034 & WQ-3154: The New Fluoroquinolones with High Inhibitory Effect against Quinolone-Resistant *Salmonella* Typhimurium DNA Gyrase

Jirachaya Toyting¹, Nami Ajima¹, Wimonrat Tanomsridachchai¹,
Lawrence P. Belotindos¹, Thoko Flav Kapalamula¹, Hyun Kim², Fuangfa Utrarachkij³,
Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima^{1,4}, Yasuhiko Suzuki^{1,4*}

¹Div Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

²Dept Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

³Dept Microbiology, Faculty of Public Health, Mahidol University, Thailand

⁴Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University

Abstract:

Introduction: Nontyphoidal *Salmonella* is one of the prominent pathogens causing acute gastroenteritis globally. In 2017, the World Health Organization (WHO) specifically ranked fluoroquinolone-resistant *Salmonella* as a high-priority pathogen for the research and development of new antibiotics. WQ-3034 and WQ-3154 are relatively new synthetic fluoroquinolones with modification on their R₁, R₇, and R₈ positions.

Objectives: To evaluate the inhibitory effect of WQ-3034 and WQ-3154 against wild-type and mutant *Salmonella* Typhimurium DNA gyrases.

Materials & Methods: The inhibitory effect of WQ-3034 and WQ-3154 were examined along with ciprofloxacin by measuring the drug concentration that inhibit half of the enzyme activity (IC₅₀) in fluoroquinolone-inhibited DNA gyrase supercoiling assay.

Results: WQ-3034 demonstrated an inhibitory effect at the lowest concentration in both wild-type and mutant *Salmonella* Typhimurium DNA gyrases with amino acid substitution at codon 83 and/or 87, followed by WQ-3154 and ciprofloxacin, respectively. Remarkably, WQ-3034 and WQ-3154 exhibited a significantly higher inhibitory effect than ciprofloxacin in the double mutation of *Salmonella* Typhimurium DNA gyrase (Ser83Phe-Asp87Asn).

Conclusion: This study revealed that WQ-3034 and WQ-3154 could potentially be the effective therapeutic agents against quinolone-resistant nontyphoidal *Salmonella*.

Whole Genome Sequencing Reveals Recent Transmission of Multi-drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strains in Lusaka, Zambia

○Joseph Yamweka CHIZIMU^{1,2,3}, Eddie SOLO^{1,3}, Yukari FUKUSHIMA¹, Precious BWALYA¹, Victor MUKONKA^{2,3}, Chie NAKAJIMA¹, Yasuhiko SUZUKI¹

¹Div Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

²Zambia National Public Health Institute

³Ministry of Health, Zambia

Lineage 3 is one of the seven human-adapted *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) lineages predominant in eastern Africa, Middle East and northern India. Despite its low proportions when compared to the predominant lineage 4 in Zambia, lineage 3 strains (CAS1_Kili) were associated with multi-drug resistance in the previous study in Lusaka (Solo et al, 2020). Thus, this study aims to evaluate recent transmission among patients with MDR-MTB CAS1_Kili strains in Lusaka, Zambia, by whole genome sequencing (WGS).

Selected 15 CAS1_kili strains, clustered by MIRU-VNTR and spoligotyping from the previous study, were analyzed with WGS. All evaluated CAS1_Kili strains belonged to a cluster as they differed by 12 or fewer single nucleotide polymorphisms (SNPs) in their core genomes. While 9 strains were involved in a recent transmission event as they differed by ≤ 5 SNPs. Several strains shared the same combination of drug-resistance associated mutations to rifampicin, isoniazid and other anti-TB drugs suggesting transmission events of MDR-MTB. All the strains had ethambutol resistance associated mutations though only 23% were detected to be resistant by phenotypic methods.

WGS revealed that these CAS1_Kili isolates were closely related, suggesting a recent transmission event as they exhibited comparatively low variabilities in SNPs.

Characterization of mutations associated with streptomycin resistance in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Zambia

○Precious Bwalya^{a,b}, Tomoyuki Yamaguchi^a, Eddie Solo^b, Joseph Y. Chizimu^a, Grace Mbulo^b, Chie Nakajima^{a,c,*}, Yasuhiko Suzuki^{a,c,*}

^aDiv Bioresources, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control

^bDepartment of Pathology and Microbiology, University Teaching Hospital, Ministry of Health, Zambia.

^cInternational Collaboration Unit, Hokkaido University International Institute for Zoonosis Control, Sapporo, Japan

Abstract

Objective: Streptomycin (STR) is recommended for the management of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). STR resistance conferring mutation types and frequency are influenced by genotypes of circulating strains in a population. This study aimed to characterize mutations in MDR-TB isolates and examine their relationship with the genotypes in Zambia.

Methods: A total of 138 MDR-TB isolates stored at UTH-TB reference laboratory in Zambia were analyzed using spoligotyping, and sequencing of STR resistance associated genes.

Results: Streptomycin resistance was observed in 65.9% (91/138) of MDR-TB isolates. Mutations in *rpsL*, *rrs* and *gidB* accounted for 33%, 12.1% and 49.5%, respectively. Amino acid substitution K43R in *rpsL* was strongly associated with CAS1_Kili ($p<0.0001$). The combination of three genes could predict 91.2% of STR resistance. Clustering of isolates based on resistance conferring mutations and spoligotyping was observed.

Conclusion: Results showed a high prevalence of STR resistance and that sequencing of *rpsL*, *rrs* and *gidB* can adequately predict STR resistance. Clustering of isolates suggest that the increase of STR resistant MDR-TB in Zambia is fueled by spreading of resistant strains and inadequate treatment. Therefore, rapid detection of STR resistance is recommended before use in MDR-TB treatment in Zambia.

焼成ホタテ貝殻粉末と石灰窒素による 堆肥中の薬剤耐性菌制御の可能性

○江浪 誠俊¹、福田 昭¹、中島 千絵²、鈴木 定彦²、臼井 優¹

¹酪農学園大学 獣医学類 食品衛生学ユニット

²北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 バイオリソース部門

【背景】家畜糞尿由来堆肥に含まれる耐性菌/耐性遺伝子（ARG）の除去には堆肥化温度の上昇が有効であるが、不十分な温度上昇などにより耐性菌/ARGが残留することが問題となっている。この問題に対して、廃棄物由来の焼成ホタテ貝殻粉末（HSSP）や、肥料等に用いられる石灰窒素が、殺菌効果のある副資材として、耐性菌/ARGの減少に利用できる可能性がある。そこで今回、HSSP及び石灰窒素を利用した堆肥化が耐性菌/ARGの減少に有効かを明らかにするために、家畜糞尿存在下におけるHSSP及び石灰窒素の殺菌効果と、堆肥への添加によるpH、大腸菌数/ARG量、細菌叢の変化を調べた。【材料と方法】牛糞尿上清に、大腸菌、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸球菌、*Clostridioides difficile*（CD；芽胞形成菌）を添加した。そこへ、HSSPまたは石灰窒素（0.5～4%）を添加し、24時間後の添加細菌の生菌数を調べた。次に、牛糞尿、麦稈及び2%量のHSSPまたは石灰窒素を堆肥原料とし、不十分な温度上昇条件でのシミュレーション試験を実施した。この間、経時的にサンプルを回収し、pH、大腸菌数、ARG量、細菌叢解析を行った。【結果と考察】HSSP/石灰窒素を2%添加することでCD以外の細菌が、4%の添加によりCDも検出できなくなった。堆肥化試験では、HSSP/石灰窒素添加直後にpHは10以上を示したが、堆肥化終了時には対照群と同様にpHは8程度になった。HSSP/石灰窒素添加により、堆肥化終了時に大腸菌数は86%以上/100%減少した。ARG量について、HSSP添加では明確な変化は認められなかったが、石灰窒素添加では試験した全てのARGが減少した。細菌叢に与える影響は、石灰窒素添加の方がHSSP添加に比べて大きかった。以上より、HSSPと石灰窒素の堆肥への添加は、堆肥pHを上昇させることで芽胞形成菌を含む細菌を減少させることが可能であり、HSSPや石灰窒素を利用した堆肥化は耐性菌対策として有効である可能性を示した。ARG量や細菌叢の変化への影響も考慮し、最適な添加量や条件を解明する試験を実施中である。

消毒薬曝露が 薬剤耐性遺伝子の接合伝達頻度に及ぼす影響の解明

○塩野 由花、福田 昭、臼井 優

酪農学園大学 食品衛生学ユニット

【背景と目的】 薬剤耐性菌(ARB)、耐性遺伝子(ARG)の拡散は公衆衛生上重要な課題である。ARB 及び ARG が拡散する主要な経路として接合伝達が挙げられる。接合伝達は、主に ARG をコードするプラスミドが ARB から感受性菌へ伝達し、感受性菌が耐性を獲得する現象である。これまでに、抗菌薬や消毒薬の曝露により接合伝達頻度が上昇し、ARB 及び ARG の拡散を加速する可能性が示されているが、その機序(特に消毒薬曝露時)については、未だ解明されていないことが多い。そこで、本研究では接合伝達頻度を上昇させる消毒薬の種類とその機序の解明を目的として実験を行った。

【材料と方法】 プラスミド性のセファゾリン耐性 *bla* 遺伝子を持つ牛糞便由来の大腸菌 4 株をドナー株、リファンピシン耐性大腸菌（実験室株）をレシピエント株とし、6 種類の消毒薬曝露後の接合伝達頻度を算出した。また、消毒薬を曝露した際の ROS 生成、SOS 応答を測定した。更に、ROS 生成を促進した消毒薬について、ROS 阻害剤存在下での接合伝達頻度を算出した。

【結果と考察】 ドナー株に TC7-1 を用いた場合、薬剤非曝露時と比較し、トリクロサン(TRI)曝露では約 6 倍、塩化ベンザルコニウム(BZK)曝露では約 5 倍の接合伝達頻度の上昇が確認された。その他のドナー株を用いた場合、接合伝達頻度の上昇は確認されなかった。TRI および BZK 曝露は ROS 生成を促進し、これは TC7-1 において最も顕著であった。一方、試験に用いた 6 種類全ての消毒薬は SOS 応答を促進しなかった。TRI、BZK による接合伝達頻度の上昇は、ROS 阻害剤存在下では阻害された。以上の結果より、TRI、BZK の曝露は ROS の生成を起こすことで、接合伝達を促進していることが示唆された。接合伝達を制御するためには、抗菌薬と同様に消毒薬を適正に使用し、消毒薬の使用による ARG の拡散を防ぐ必要がある。

コリスチン耐性遺伝子保有プラスミドが与える コリスチン治療および生体内定着への影響評価

○佐藤 豊孝¹, 山本 聡¹, 小笠原 徳子¹, 臼井 優², 林 航³, 長野 則之³,
土井 洋平^{4,5}, 田村 豊⁶, 高橋 聡^{7,8}, 横田 伸一¹

¹札幌医科大学・医学部・微生物学; 2,

²酪農学園大学・獣医学群・食品衛生学

³信州大学大学院・総合医理工学研究科・医学系専攻

⁴藤田医科大学・微生物学・感染症科

⁵ピッツバーグ大学医学部・感染症内科

⁶酪農学園大学・動物薬教育研究センター

⁷札幌医科大学・医学部・感染制御・臨床検査医学

⁸札幌医科大学附属病院・検査部

コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌感染症への最終選択薬と位置づけられている。近年、特に生産動物由来腸内細菌科細菌でのプラスミド性耐性遺伝子(*mcr*)の拡散が危惧されている。一方で、*mcr* 保有プラスミドなどのコリスチン耐性因子がヒト医療で問題となる病原性細菌に伝播された際の治療効果や病原性に関わる評価は乏しい。本研究では、ヒトの医療現場で問題となっている international high-risk clone のキノロン耐性大腸菌 ST131 に染色体性(*pmrAB* の変異)およびプラスミド性(*mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-5* 保有プラスミド)のコリスチン耐性因子を付与させ、マウス感染モデルにてマウス生体内での毒力・定着性およびコリスチンの治療効果を評価した。

一部の *mcr* 保有プラスミド(*IncI2_mcr-1*, *IncX4_mcr-1*, *IncP1_mcr-3*)の導入はマウスでの毒力および定着性の低下をもたらした。一方で、染色体性コリスチン耐性の獲得(*pmrB* 変異)では、感染宿主における毒力・定着性が維持され、コリスチン治療効果は減弱していた。*IncI2_mcr-1* プラスミドの導入によるマウスに対する毒力および定着性の低下は *mcr-1* 欠損プラスミド導入においても同様であり、この毒力および定着性の低下には *IncI2_mcr-1* プラスミド上に存在する *mcr-1* 以外の因子の関与が示唆された。RNA-Seq 解析の結果、*IncI2_mcr-1* プラスミドの付与は ST131 の遺伝子発現を大きく変化させていることが明らかになり、この変化にはプラスミド上に存在する 2 種類の hypothetical proteins をコードする遺伝子(*hypo-1* および *hypo-3*)が関与することが示唆された。

以上から、大腸菌でのコリスチン耐性の付与によるヒトへの健康危害を考えた場合、染色体性遺伝子(*pmrB*)の変異の方が、*mcr* 保有プラスミドの獲得よりも、毒力の保持およびコリスチンの治療効果の減弱が想定され、リスクがより高いであろうと考えられた。また、*IncI2_mcr-1* プラスミドの付与による毒力・定着性の低下への *mcr-1* の関与は小さく、その近傍に存在する *hypo-1* および *hypo-3* の関与が示唆された。

***Enterobacter cloacae* complex における コリスチン耐性機序の解明**

○福澤 翔太^{1,2}、佐藤 豊孝¹、青木 弘太郎³、福島 由華里⁴、山本 聡¹、
小笠原 徳子¹、中島 千絵⁴、鈴木 定彦⁴、高橋 聡^{5,6}、横田 伸一¹

¹札幌医科大学医学部微生物学講座

²北海道がんセンター臨床検査科

³東邦大学医学部微生物・感染症学講

⁴北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

⁵札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座

⁶札幌医科大学附属病院検査部

【背景】 *Enterobacter cloacae* complex (ECC) は、腸内細菌科細菌に属するグラム陰性桿菌である。ECC は *Enterobacter* 属感染症の主な原因菌で多剤耐性化が問題となっている。多剤耐性化した ECC にはコリスチン (CST) が使用される可能性が有るが、ECC が CST 耐性を獲得する詳細な遺伝子的メカニズムは不明である。

【目的】 本研究は ECC の分子疫学的解析及び CST 耐性機序の解明を目的とした。

【対象】 札幌医科大学附属病院にて、外来・入院患者 (2017年5月から2018年5月) の臨床検体から分離された ECC167株 (札幌医科大学附属病院 IRB 承認番号 272-70) を供試した。

【方法】 1. *hsp60* 部分塩基配列解析によるクラスター分類を行い、各クラスターの CST 耐性株の割合を算出した。2. Average Nucleotide Identity (ANI) 解析による菌種同定を行い、各種の CST 耐性株の割合を算出した。3. Population Analysis Profiling test (PAP test) を行い、対象株の CST heteroresistance の有無を評価した。4. CST 耐性に関与することが知られている *phoPQ*、*eptA*、*arnT* 欠損株を作製し、CST の MIC を測定した。5. CST 耐性株と感性株の *arnT* 転写量を RT-qPCR にて測定し比較した。

【結果】 *hsp60* の部分塩基配列解析により CST 耐性株は特定のクラスター (II, IV) に集積し、ANI 解析によって CST 耐性株の多くは *E. kobei* 及び *E. roggenkampii* であることが分かった。PAP test の結果、CST 耐性株全てが heteroresistance の表現型を有していた。*phoPQ* 及び *arnT* 欠損株で CST 耐性株の CST 耐性が失われたが、*eptA* 欠損株では CST 耐性に変化は認められなかった。*arnT* 転写量を測定した結果、CST 耐性株は感性株に比較し、有意な転写量の増加が認められた。

【考察】 本研究の結果から、ECC の CST 耐性は特定の遺伝的背景を有する菌種に集積していることがわかった。また、これらは CST heteroresistance の表現型を有し、本表現型の獲得には、*phoPQ* および *arnT* の関与が示唆された。

Clonal transmission of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST69 between poultry and humans in Lusaka, Zambia

○ Misheck Shawa,^a Yoshikazu Furuta,^a Atmika Paudel,^a Bernard Hang'ombe,^b Hideaki Higashi^{a#}

^aDivision of Infection and Immunity, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University

^bDepartment of Para-clinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, Zambia

Abstract

Risk factors for transmitting multidrug-resistant (MDR) *Escherichia coli* to humans include various food animals, especially poultry. In Zambia, reports on MDR *E. coli* strains among apparently healthy chickens have become frequent, but no comparative analyses have been conducted to evaluate their clonality with human isolates. Considering that poultry is the most consumed protein source in the country, it is necessary to investigate the potential spread of MDR *E. coli* between poultry and humans.

Twenty cefotaxime-resistant *E. coli* strains collected from poultry in Lusaka, Zambia, were screened for MDR and subjected to whole-genome sequencing using MiSeq and MinION platforms. After *de novo* reconstruction of nearly complete genomes, we compared the poultry strains to 36 previously sequenced cefotaxime-resistant *E. coli* isolates obtained from inpatients at the University Teaching Hospital, Lusaka.

All (20/20, 100%) the poultry strains displayed resistance to ampicillin, chloramphenicol, and doxycycline, with 18/20 (90%) also resistant to the quinolones; ciprofloxacin and nalidixic acid. Twenty-seven antimicrobial resistance (AMR) genes belonging to 11 classes were detected, with aminoglycoside resistance genes dominating (7/27, 25.9%), followed by genes encoding resistance to β -lactams (3/27, 11.1%), quinolones (3/27, 11.1%), and trimethoprim (3/27, 11.1%). Phylogenetic analysis and hierarchical clustering using AMR profiles, AMR genes, and plasmid replicons suggested the clonal spread of *E. coli* O17:H18-ST69 between poultry and humans. The *E. coli* O17:H18-ST69 clone accounted for 4/20 (20%) poultry- and 9/36 (25%) human-associated strains that shared two plasmids (IncFI and IncI-complex) harboring 14 AMR genes. Furthermore, our analysis showed that the strains also had other AMR plasmids distinct for each niche; all the poultry strains carried an IncFII (pCoo) plasmid containing the *bla*_{CTX-M-55} gene, while human isolates possessed the *bla*_{CTX-M-14} gene on an IncHI plasmid.

Our results suggested clonal transmission of MDR *E. coli* O17:H18-ST69 between poultry and humans, with the potential acquisition of distinct, niche-specific AMR plasmids. These results demand strategic and concerted efforts from human and animal health sectors to prevent and control foodborne MDR.

特別公演

わが国における動物由来薬剤耐性菌研究の 過去・現在・未来

田村 豊

酪農学園大学動物薬教育研究センター

当初、薬剤耐性菌は動物の感染症治療の阻害要因としてのみ捉えられ、その研究も原因菌の表現型である薬剤感受性を中心とするものであった。ところが1959年に日本の複数の医師が奇しくも別々の地域で多剤耐性赤痢菌から大腸菌へ薬剤耐性が伝達される現象を発見し状況が一変した。後に群馬大学の三橋進教授のグループによってR因子（現在のRプラスミド）と名付けられ、今なお色褪せない薬剤耐性菌研究における金字塔を打ち立てた。動物分野で最初にR因子に着目したのは、動物医薬品検査所（動薬検）に勤務していた寺門誠致先生であった。1973年に豚萎縮性鼻炎の起因菌である *Bordetella bronchiseptica* のR因子を報告し、以後の動物分野における薬剤耐性菌研究に多大な影響を与えた。

1969年に家畜の成長促進目的に使用される抗菌薬は、薬剤耐性菌を増加させ、家畜やヒトの健康を損なう恐れがあるとの報告書（スワンレポート）が英国議会に提出された。この報告により動物由来薬剤耐性菌は食物連鎖を介してヒトに伝播し、感染症治療に悪影響を与えるとの考えが広く認識されるようになった。1976年にわが国も曖昧であった飼料添加の抗菌薬を治療用の動物用医薬品と成長促進用の飼料添加物に厳密に区別して規制を強化した。規制強化の効果を検証するため、1976年と1992年に農林省により初めて全国的な薬剤耐性菌調査が実施された。全国の家畜保健衛生所での調査手法の平準化を行うために、動薬検においてR因子の検出を含めた技術研修会が開催された。これを契機に薬剤耐性菌に関する最新の技術と知識が日本各地の家畜保健衛生所に広まり、動物分野における薬剤耐性菌研究の裾野を広げることに大いに貢献した。

1997年頃から効果的な対策を策定するために、薬剤耐性菌を監視することの重要性が各種の国際会議で指摘されるようになった。そこで1999年に動薬検を中心に全国の家畜保健衛生所とネットワークを構築した家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制（JVARM）が確立された。JVARMにより動物由来薬剤耐性菌に関する全国を俯瞰した網羅的な科学的データが毎年蓄積され、世界に発信するようになった。

2016年にわが国の抗菌薬耐性対策アクションプランが制定され、One Healthでの各種薬剤耐性菌対策が進められている。この中で、薬剤耐性菌や耐性遺伝子がヒトや動物や環境などの生態系で循環していることから、One Healthでの対策の重要性が認識された。

以上のように、講演ではわが国の動物由来薬剤耐性菌研究とその対策の歴史を振り返るとともに、今後の期待についても述べたい。