第84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29年8月26日

会場: 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター

WHO コラボレーティングセンター会議室

〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目

総会長:東 秀明(北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 教授)

事務局: 〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 感染・免疫部門

プログラム概要

09:15-10:20	セッション1 (座長:鈴木定彦)
10:20 - 10:30	休憩
10:30 – 11:35	セッション2(座長:山口博之)
11:35 - 12:30	昼休み/評議員・幹事会
12:30 – 13:00	総会
13:00 - 14:05	セッション3(座長:横田伸一)
14:05-14:15	休憩
14:15 - 15:20	セッション4(座長:古田芳一)
15:20 - 15:30	休憩
15:30 - 16:35	セッション5 (座長:長谷部晃)
16:35 - 16:45	休憩
16:45 - 17:30	特別講演 (座長:東秀明)
17:30 - 17:40	表彰式
17:40 -	懇親会

参加者へのご案内

1. 参加受付

受付時間: 8月26日8:30~

受付場所: 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター

WHOコラボレーティングセンター会議室前

参加費: 無料

(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。)

懇親会費: 3,000円(参加希望者のみ)

2. 一般演題について

発表時間は、発表 10 分、質疑 3 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。会場の液晶プロジェクターとの接続は D-sub15 ピン、HDMI のいずれも対応できます。コネクターが必要な場合はご持参ください。

3. 日本細菌学会北海道支部会賞選考について

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

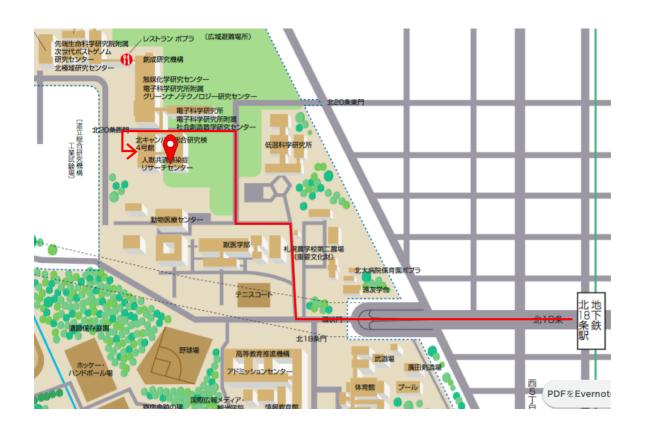
選出は参加者全員の投票によって行われます。当日配布された投票用紙に必要 事項を記入し、一般演題終了後、投票用紙を会場の投票箱に投函ください。

会場案内

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター

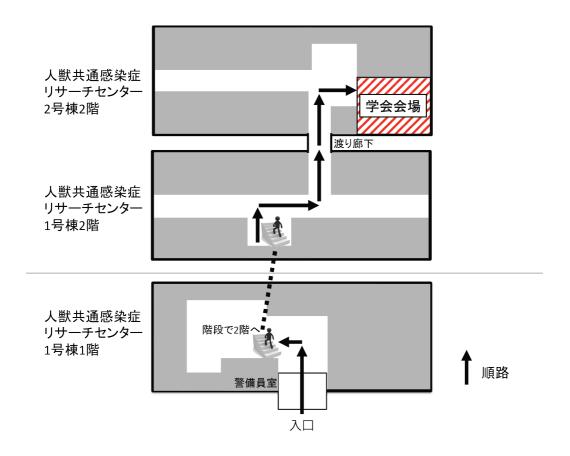
〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目 (地下鉄南北線 北 18 条駅から徒歩 15 分)

入館については、入り口に係の者を配置する予定ですが、不在の場合は警備員に お聞きいただき、所定の手続きを行ってお入りください。



WHO コラボレーティングセンター会議室

センターの正面玄関からお入りいただいてすぐの階段で2階に上がってください。 右に曲がってすぐ左手の渡り廊下を通り、右手の会議室です。



懇親会会場案内

塩野屋

札幌市北区北十八条西 4-2-20 北十八条ハイツ B1F 総会会場より徒歩 15 分、地下鉄南北線 北 18 条より徒歩 3 分

総会終了後、参加者全員で移動予定です。ビルの地下にありますので、個別に移動される場合はご注意ください。



第84回日本細菌学会北海道支部学術総会プログラム

09:15-10:20 セッション1 (座長:鈴木定彦、北大人獣センター) 09:15-09:28

01. 市販食品の *Clostridium difficile* 汚染実態の解明 ○臼井優¹, 川端楓実¹, 丸子愛加¹, 田村豊¹

1酪農大・獣医・食品衛生

09:28 - 09:41

02. 札幌市内動物病院スタッフにおけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)保菌リスクと MRSA 対策マニュアルの有効性

○佐藤友美 1, 臼井優 1, 前谷茂樹 2, 田村豊 1

1酪農大・獣医・食品衛生,2まえたに動物病院

09:41 - 09:54

03. 北海道におけるアライグマのレプトスピラ浸潤状況の変遷

○荒川祐衣 ¹, 村田亮 ¹, 佐鹿万里子 ², 松田一哉 ³, 小泉信夫 ⁴, 浅川 満彦 ⁵, 内田郁夫 ¹, 菊池直哉 6

¹酪農大・獣医・獣医細菌, ²北海道大・獣医・野生動物, ³酪農大・獣医・獣医病理, ⁴感染研・細菌第一, ⁵酪農大・獣医・獣医寄生虫病, ⁶天使大・看護栄養

09:54 - 10:07

04. 牛舎周辺の土壌中におけるレプトスピラの生残性の検討

○富永真耶¹,神田珠希¹,村田亮¹,内田郁夫¹,菊池直哉²¹ ¹酪農大・獣医・獣医細菌,²天使大・看護栄養

10:07 - 10:20

05. Development of a recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen domain 1 bovine ELISA for the serological surveillance of anthrax in Zambia

○Manyando Simbotwe¹, Daisuke Fujikura¹, Yoshikazu Furuta¹, Mudenda Bernard Hang'ombe² and Hideaki Higashi¹,³

¹Division of Infection and Immunity, Research Center for Zoonosis Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, ²Microbiology Unit, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, ³Hokudai Research Center for Zoonosis Control in Zambia.

10:20 - 10:30 休憩

10:30 - 11:35 セッション 2 (座長:山口博之、北大保健科学研究院) 10:30 - 10:43

- 06. Oral Veillonella Profiles in Saliva of the Children with Different Oral Hygiene Statuses and Their Phylogenetic Diversity
 - O Citra Fragrantia THEODOREA¹, Izumi MASHIMA¹,²,³, Futoshi NAKAZAWA¹

¹Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, ²Postdoctoral Fellow of Japan Society for the Promotion of Science, ³Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, The State University NY Buffalo

10.43 - 10.56

- 07. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kandy, Sri Lanka: Insight into Beijing and EAI genotypes
 - O 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

10.56 - 11.09

08. Insight into the Beijing genotype *Mycobacterium* tuberculosis in Myanmar

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

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

11:09 - 11:22

09. 動物由来細菌からの 16S-RMTase の検出

○梶野朱里¹, 臼井優¹, 川西路子², 原田和記³, 田村豊¹¹酢農大・獣医・食品衛生,²農水省・動物医薬品検査所,³鳥取大・共同獣医・臨床獣医

11:22 - 11:35

10. *Prototheca zopfii* の MALDI-Biotyper による遺伝子型鑑別 ○三浦祥 ¹, 村田亮 ¹, 加納塁 ², 内田郁夫 ¹, 菊池直哉 ³

1酪農大・獣医・獣医細菌,2日大・獣医,3天使大・看護栄養

- 11:35-12:30 昼休み/評議員・幹事会
- 12:30 13:00 総会
- 13:00-14:05 セッション3 (座長:横田伸一、札幌医科大医学部) 13:00-13:13
 - 11. ハエが運ぶカルバペネム耐性菌の性状

○福田 昭、臼井 優、若尾 英之、増井 ちな美、田村 豊 酪農大・獣医・食品衛生

13:13 - 13:26

12. 乳房炎原因菌に対するアカエゾマツの抗菌活性

〇醍醐由香里 ¹, 友善良兼 ², 土居拓務 ³, 酒巻美子 ⁴, 萩原寬暢 ⁵, 村田亮 ¹, 内田郁夫 ¹, 横田博 ², 菊池直哉 6

¹ 酪農大・獣医・獣医細菌, ² 酪農大・獣医・獣医生化, ³ 林野庁・宗 谷森林管理, ⁴ マザーフォレスト, ⁵ てしかが自然学校, ⁶ 天使大・看護 栄養

13:26 - 13:39

13. フルオロキノロン耐性変異が結核菌 DNA ジャイレース活性 にもたらす影響の評価

○大内勇樹 1, 中島千絵 1, 鈴木定彦 1

1 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオリソース部 門

13:39 - 13:52

14. Inhibitory activity of WQ-3810 against DNA gyrases of quinolone-resistant *Mycobacterium leprae*

Jong-Hoon Park¹, Tomoyuki Yamaguchi¹, Chie Nakajima¹, Suzuki Yasuhiko¹ ¹Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan

13.52 - 14.05

15. DC-159a shows inhibitory activity against DNA gyrase of Salmonella Typhimurium

OKentaro Koide¹, Siriporn Kongsoi^{1,2}, Yuki Ouchi¹, Tomoyuki Yamaguchi¹, Chie Nakajima^{1,3}, Yasuhiko Suzuki^{1,3}

¹Div. of Bioresources, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Japan, ²Dept. of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thai.

³Global Station for Zoonosis Control, Global Institution for Collaborative Research and Education (GI-CoRE), Hokkaido University, Japan

- 14:05 14:15 休憩
- 14:15 15:20 セッション4 (座長:古田芳一、北大人獣センター) 14:15 – 14:28
 - 16. 腟頸管スワブからの性器クラミジアの検出率と菌叢解析: 腸 内細菌科細菌が与えるインパクト
 - ○渡辺宜典¹, 瀧圭介¹², 松尾淳司¹, 大久保寅彦¹, 酒井昂平¹, 松下瑞江¹, 山口博之¹
 - 1北海道大学大学院保健科学研究院,2北海道大学病院

14:28 - 14:41

- 17. 札幌地下歩行空間での空気中浮遊細菌の菌叢解析
 - ○大久保寅彦¹, 松尾淳司¹, 大崎敬子², 神谷茂², 山口博之¹¹北大院・保科・病態解析,²杏林大・医

14:41 - 14:54

- 18. マイコプラズマ由来リポタンパク質によるマウスマクロファージに対する IL-1 β 産生誘導活性
 - ○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,2医科歯科大・院医歯・細菌感染

14:54 - 15:07

- Chlamydia 感染による DEVD 配列挿入環状ルシフェラーゼ
 発現細胞のカスパーゼ 3 活性化測定
 - ○松尾淳司¹、大久保寅彦¹、中村眞二²、山口博之¹ ¹北大院・保健科学・病態解析、²順大院・医・形態解析イメージン グ

15:07 - 15:20

20. 巨大ウイルス Mimiviridae 科が環境クラミジアの進化に与えた影響について

○山口博之¹、松尾淳司¹、大久保寅彦¹、中村眞二² ¹北大・保科・病態、²順天堂大・医・研究基盤センター

15:20 - 15:30 休憩

15:30 – 16:35 セッション 5 (座長:長谷部晃、北大歯学研究科) 15:30 – 15:43

21. Lactobacillus gasseri リポテイコ酸の菌種特異的な化学構造

○久富亮佑¹、白石宗¹、佐藤耶舞羽²、森田直樹³、吹谷智²、佐藤 豊孝¹、横田篤²、横田伸一¹

¹札幌医科大学・医学部・微生物学講座、²北海道大学大学院・農学研究院・基盤研究部門・微生物生理学研究室、³産業技術総合研究所・生命工学領域・生物プロセス研究部門

15:43 - 15:56

22. 低酸素条件培養下で *Chlamydia trachomatis* の感染動態を 修飾する要因について

○酒井昂平¹, 松尾淳司¹, 渡辺宜典¹, 大久保寅彦¹, 中村眞二², 山口博之¹

1 北大院・保健科学・病態解析, 2 順大院・医・形態解析イメージング

15.56 - 16.09

23. Proteus mirabilis の溶菌バクテリオファージの探索

○今村尚睦¹,村田亮¹,岩野英知²,菊池直哉³,内田郁夫¹ ¹酪農大・獣医・獣医細菌,²酪農大・獣医・獣医生化,³天使大・看 護栄養

16:09 - 16:22

24. 炭疽菌の病原因子調節に関与する転写因子AtxAとDNAの相 互作用解析

○豊間根 耕地、藤倉 大輔、古田 芳一、東 秀明 北大・人獣センター

16:22 - 16:35

25. 共生細菌依存的なアメーバによるヒト病原細菌の運搬現象について

○松下瑞江¹, 大久保寅彦¹, 松尾淳司¹, 中村眞二², 山口博之¹¹北大院・保科・病態解析,²順大院・医・研究基盤センター

16:35 - 16:45 休憩

16:45 – 17:30 特別講演(座長:東秀明、北大人獣センター)Aspergillus fumigatus のアゾール系抗真菌薬耐性~耐性菌はどうやって産まれ、どのように広まったのか?~

17:30-17:40 表彰式

豊留 孝仁(帯畜大・獣医)

17:40 - 懇親会

講演要旨

特別講演

Aspergillus fumigatus のアゾール系抗真菌薬耐性 ~耐性菌はどうやって産まれ、どのように広まったのか?~

豊留 孝仁 帯畜大・獣医

細菌の薬剤耐性化とその問題の重大さは広く認識されている。一方で、真菌においても薬剤耐性化は大きな問題となりつつある。特に環境中 Aspergillus fumigatus におけるアゾール系抗真菌薬への耐性化が世界的に大きな問題となってきている。

Aspergillus fumigatus は環境中、特に土壌中に存在する。また、人獣共通感染症の一つ、アスペルギルス症の主な原因真菌として知られている。主な治療薬としてアゾール系抗真菌薬が用いられるが、近年は治療を受けていない患者からアゾール系抗真菌薬への抵抗性を持った菌株が分離されるようになってきた。患者のみならず、野外環境中からも耐性株が分離されてきており、患者体内ではなく、野外でアゾール系抗カビ剤の選択を受けた結果として耐性株が産まれたと考えられている。これらの耐性株ではアゾール系抗真菌薬の標的である Cyp51A タンパク質の特定のアミノ酸変異に加えて、そのプロモーター領域で特定配列の重複が起こっている。

初期にはヨーロッパ諸国からの耐性株の報告が相次いだが、最近では中東から中国や台湾といったアジア諸国、また南北アメリカ大陸からも報告がなされている。日本においても患者からの耐性株の分離報告がなされており、さらには環境中からも耐性株が分離されている。日本での分離株は日本国内での選択を受けて生じた耐性株ではなく、海外から持ち込まれた株であることが解析から示唆されている。

今回はアゾール耐性 A. fumigatus に関するバックグラウンドを交えながら、最近の我々の研究成果を報告したい。

1. 市販食品の Clostridium difficile 汚染実態の解明

○臼井優¹,川端楓実¹,丸子愛加¹,田村豊¹ 1 酪農大・獣医・食品衛生

【目的】 Clostridium difficile (CD) はヒトに偽膜性大腸炎、抗菌薬関連下痢症を始めとする CD 感染症(CDI)を引き起こす。従来、抗菌薬投与に伴う腸内細菌叢の攪乱により発症する院内感染事例が問題とされてきたが、近年は市中感染事例の増加が報告されている。海外では、ヒトに対して高病原性を示す CD(特にリボタイプ 078)が、食肉から分離されており市中感染事例増加との関連性が示唆されている。しかし、日本における市販食品の CD 汚染実態は不明である。そこで今回、市販食品(肉及び野菜)における CD の汚染状況を明らかとするため、市販食品から CD の分離を行い、その性状を解析した。

【材料及び方法】北海道内の小売店等で購入した鶏挽肉 (89 検体)、豚挽肉 (91 検体)、鶏レバー (28 検体)、豚レバー (24 検体)、牛肉 (34 検体)及び野菜 (242 検体)から、増菌選択培養により CD を分離・同定した。分離株について PCR リボタイピング、毒素遺伝子の検出、及び薬剤感受性試験を実施した。

【結果及び考察】鶏挽肉 6/89 検体 (7%)、鶏レバー1/28 検体 (4%)、野菜 8/242 検体 (3%) から計 30 株の CD が分離された。その他の食品からは、CD は分離されなかった。分離された株のリボタイプは、リボタイプ 001 や非定型を示し、高い病原性を示すことがよく知られているリボタイプではなかった。しかし、4株 (13%) は、ヒトへの病原性に関与するトキシン (A 及び B) を保有していた。また、全分離株はヒトが CDI になった際に治療に用いられるバンコマイシン及びメトロニダゾールに対しては感受性を示した。今回、市販食品から低率ではあるもののトキシン陽性株が分離されたことから、市販食品はヒトの市中感染の原因となり得ることが示唆された。CD は芽胞を形成することから、食品からヒトへの伝播を防ぐためには、十分な加熱や洗浄が重要である。

セッション1 (支部会賞候補演題)

2. 札幌市内動物病院スタッフにおけるメチシリン耐性 黄色ブドウ球菌(MRSA)保菌リスクと

> MRSA 対策マニュアルの有効性 ○佐藤友美¹, 臼井優¹, 前谷茂樹², 田村豊¹ 1 酪農大・獣医・食品衛生,2 まえたに動物病院

【背景】MRSA は院内感染の原因菌としてヒト医療だけでなく獣医療においても重要視される。2008年の札幌市内の調査において小動物臨床獣医師(23%)と動物看護師(10%)は高率に MRSA を保菌することが明らかとなり、さっぽろ獣医師会は対策のため「動物病院における MRSA 院内感染対策マニュアル」を策定した。今回、マニュアルの有効性を検討するため、動物病院における MRSA 保菌調査を再度実施した。

【材料方法】札幌市内 45 病院の獣医師 91 名、動物看護師 113 名、その他スタッフ 24 名の鼻腔スワブ、環境ふき取りサンプル 123 検体から MRSA を分離し、分子疫学解析および薬剤感受性試験を実施した。リスク因子を特定するためアンケート調査を行い、Fisher's exact tests と student's t-test により単変量解析を実施し、 $p \le 0.2$ の因子を対象にステップワイズ法による多変量解析を実施し独立因子を決定した。 $p \le 0.05$ を統計学的に有意な因子とした。

【結果と考察】獣医師の 15%(14/91)、動物看護師の 6%(7/113)、その他スタッフの 8%(2/24)、環境材料の 5%(6/123)から MRSA が分離され、過去の調査に比べ MRSA 保菌割合が減少傾向を示した。分離された MRSA は、全てヒト医療で優位な CC5/SCCmecII に型別され、ヒト医療から獣医療へ持ち込まれた可能性を示した。 PFGE 解析の結果、同一病院内のヒトと環境から同一パターンを示す MRSA が検出され、ヒト・環境を含めた MRSA の伝播経路の存在を示唆した。単変量解析の結果、職種(獣医師; p=0.03)、年齢(陽性者平均 39 歳 vs 陰性者 45 歳; p=0.04)、性別(男性; p=0.03)、MRSA 保菌動物との接触(p=0.008)、ハンドクリームによる手荒れのケア(p=0.01)、診療後の手洗い(p=0.01)が有意に MRSA 保菌と関連した。多変量解析の結果、リスク因子として MRSA 保菌動物との接触(p=0.007)、防除因子としてハンドクリームによる手荒れのケア(p=0.004)、診療後の手洗い(p=0.01)が独立因子であった。さらに、獣医師において MRSA マニュアルを読むことは MRSA 保菌を有意に減少させた(p=0.01)ことから、マニュアルに準拠した手指衛生の徹底が MRSA 防除に有効であると考えられる。

3. 北海道におけるアライグマのレプトスピラ浸潤状況の変遷

○荒川祐衣¹,村田亮¹,佐鹿万里子²,松田一哉³,小泉信夫⁴,浅川満彦⁵, 内田郁夫¹,菊池直哉⁶

1 酪農大・獣医・獣医細菌,2 北海道大・獣医・野生動物,3 酪農大・獣医・獣医病理,4 感染研・細菌第一,5 酪農大・獣医・獣医寄生虫病,6 天使大・看護栄養

【目的と背景】レプトスピラ症は病原性レプトスピラの感染によって起こる人 獣共通感染症であり、ほぼ全ての哺乳類に感染する。アライグマは 2005 年に施 行された「外来生物法」により「特定外来生物」に指定され、防除の対象となっ ているが、道内各地で確認されており、その生息域は拡大傾向にある。我々は、 2004年に北海道のアライグマから初めてレプトスピラを分離し、本菌が広く浸潤 していることを明らかにした。今回、再び道内のアライグマにおけるレプトスピ ラの浸潤状況を評価したので報告する。【材料と方法】2012年から2017年にかけ て道内で捕獲されたアライグマを対象に、レプトスピラ感染の有無について調べ た。培養:主に腎臓および尿を用いて、EMJH 培地による菌分離を試みた。遺伝 子検出:病原性レプトスピラが保有する鞭毛関連遺伝子 flaB を標的として、Nested PCR を実施した。血清診断:顕微鏡下凝集試験(MAT)によって、各血清型に対 する抗体保有率を明らかにした。分離されたレプトスピラ様細菌については、抗 血清を用いた MAT による血清型別に加え、RFLP(制限酵素断片長多型)、16S rRNA および flaB のシークエンス解析、PFGE(パルスフィールドゲル電気泳動法) 等の遺伝学的解析を実施した。【結果と考察】2004年調査の MAT の結果と比較し て、Leptospira interrogans 血清型 Autumnalis および L. borgpetersenii 血清型 Javanica に対する抗体保有率が増加していた。また、2016年に江別市で捕獲された1頭の 腎臓からレプトスピラが分離され、L. interrogans 血清型 Autumnalis と同定された。 PFGE の結果から、今回新たに分離されたレプトスピラ株は、以前分離された株 の派生株と考えられ、長期間にわたって同血清型株がアライグマの中で維持され てきたことが明らかとなった。外来野生動物における病原性レプトスピラの定着 が確認されたことから、今後人獣共通感染症の保菌動物としても注意が必要であ ると考えられる。

4. 牛舎周辺の土壌中におけるレプトスピラの 生残性の検討

○富永真耶¹,神田珠希¹,村田亮¹,内田郁夫¹,菊池直哉² 1 酪農大・獣医・獣医細菌,2 天使大・看護栄養

【背景と目的】レプトスピラ症は世界的な人獣共通感染症である。感染動物の 腎臓に保菌され尿中に排菌されることで環境を汚染し、水中や湿潤な土壌中で長 期生存が可能であると考えられている。しかし、実際には家畜の飼育環境におけ る詳細な情報は多くないというのが現状である。乳牛の乳量低下と繁殖障害を引 き起こす原因のひとつであるため、その感染源となる牛舎周辺の土壌中における レプトスピラの生残性を検討することを目的とする。【材料と方法】牛舎周辺の 土壌をサンプルとして採取し、いくつかの条件下でレプトスピラを一定期間曝露 させた。その後、希釈と培養を経てレプトスピラの発育を確認できた希釈倍率を 生残性として評価した。条件としては、採材時の土壌環境を反映した条件(温度 20 $^{\circ}$ C,水分含有量 40%)に加え、温度(4 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C)あるいは土壌サンプルの 水分含有量(20%,40%)を変化させた条件を設定した。使用菌株は病原性株とし て Leptospira interrogans 血清型 Hardjo と L. alstonii、非病原性株として L. biflexa 血清型 Patoc を使用した。また、血清型 Hardjo については滅菌および非滅菌土壌 サンプルを使用し実験を行った。【結果】病原性株では、L. alstonii が土壌サンプ ル中で最長 6 ヶ月間、血清型 Hardjo では最長 20 日間、非病原性株の血清型 Patoc では最長9ヶ月間に渡り生残した。また、どの菌株においても温度20℃または水 分含有量60%の土壌サンプル中でより生残性が高くなる傾向があることが明らか となった。【考察】土壌中のレプトスピラの生残において温度と水分含有量が重 要な要素であることが分かった。特に、土壌の水分含有量と曝露期間に有意な交 互作用が認められ、曝露期間がより長い群で水分含有量60%群は20%群と比較し て生残性が有意に高かった。つまり、病原性レプトスピラは長期に渡り牛舎周辺 の土壌中で生残し、条件が整えばその生残はさらに延長する傾向にあることが示 唆された。汚染土壌への接触による家畜やヒトのレプトスピラ感染の機会は長期 間であり、見逃されがちであるこの感染症の危険性を改めて周知する必要がある。

5. Development of a recombinant Bacillus anthracis protective antigen domain 1 bovine ELISA for the serological surveillance of anthrax in Zambia

oManyando Simbotwe¹, Daisuke Fujikura¹, Yoshikazu Furuta¹, Mudenda Bernard Hang'ombe ² and Hideaki Higashi^{1,3}

1 Division of Infection and Immunity, Research Center for Zoonosis Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, 2 Microbiology Unit, School of Veterinary Medicine, University of Zambia, 3 Hokudai Research Center for Zoonosis Control in Zambia.

Anthrax is a fatal zoonotic disease caused by *Bacillus anthracis* (B. anthracis). The disease primarily affects herbivores such as cattle, sheep, horses and goats after they graze in areas contaminated with spores of the bacteria. Humans acquire the infection through contact with infected or contaminated animal products. Anthrax poses as a serious public health problem and causes significant economic losses in the livestock industry of several developing countries, particularly those with poor public health systems and vaccination practices. In Zambia, anthrax outbreaks in cattle, wildlife as well as humans occur frequently. Serological data to inform anthrax management and control is currently lacking. In addition, there are no assays for the serological epidemiological investigations of anthrax in livestock in Zambia. Currently, ELISA is considered the most reliable method for seroepidemiological investigations of anthrax. However, available assays are unsuitable for use in endemic areas and resource limited settings with poor maintenance of cold chain facilities. Therefore, it is necessary to develop an efficacious serodiagnostic assay for the surveillance of anthrax in Zambia. In this study, we developed a qualitative indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) based on recombinant B. anthracis protective antigen domain 1 (rPA-D1) for the detection of anti-PA titers in bovine serum. To prepare rPA-D1, we cloned PA-D1 gene from the B. anthracis CZC5 strain and constructed a plasmid for the expression of rPA-D1 as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein in Escherichia coli. The Western blotting analysis revealed that, rPA-D1 was expressed as soluble. By affinity purification and ion exchange chromatography, we successfully purified the expressed recombinant protein with high purity (greater than 90%). The purified protein was subjected to lyophilization and then stored at room temperature. We found that the protein was stable after several weeks of storage. To set up the optimal ELISA conditions, we performed checkerboard titrations. Cut-off values were determined as mean \pm 3 standard deviation of negative control group. The rPA-D1 ELISA was able detect seroconversion one month post anthrax vaccination in cattle. The overall accuracy of the ELISA was validated by a single receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. Intra and inter assay % coefficient of variation were less than 10% and 20%, respectively. The performance of rPA-D1 ELISA was comparable to that of a commercially available assay. One advantage of rPA-D1 ELISA over commercial assay is that use of lyophilized antigen eliminates need for cold chain facilities for storage of ELISA plates and antigen. Therefore, the rPA-D1 ELISA is a simple and convenient assay for the surveillance of anthrax in Zambia.

6. Oral Veillonella Profiles in Saliva of the Children with Different Oral Hygiene Statuses and Their Phylogenetic Diversity

oCitra Fragrantia THEODOREA¹, Izumi MASHIMA^{1,2,3}, Futoshi NAKAZAWA¹

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

Introduction: Among 13 species of genus *Veillonella*, only *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae* and *V. tobetsuensis* have been isolated frequently from human oral cavities as oral *Veillonella*. Oral *Veillonella* is known to have a central role in the oral biofilms formation at early stage. However the concrete roles of oral *Veillonella* in biofilm formation at species level have not been clarified yet. In addition, many studies reported that the unclassified isolates displaying the characteristic of the genus *Veillonella* were found in oral cavity. These isolates may contribute to oral biofilm formation. Meanwhile, there are no reliable reports on the phylogenetics of the unclassified *Veillonella* isolates at different intra-oral sites. Therefore, the aims of this study were to evaluate the oral *Veillonella* profiles in the saliva of the children with different oral hygiene statuses. Also, the phylogenetic diversity of the unclassified *Veillonella* isolates were revealed in this study, and novel oral *Veillonella* species will be proposed.

Materials and Methods: Saliva samples from 107 Thai children divided into three groups based on their oral hygiene status (good [n = 27], moderate [n = 35], and poor [n = 45]) were collected. Oral *Veillonella* isolates were identified using one-step PCR with species-specific primer sets based on the sequence of rpoB. In the phylogenetic studies, 23 unclassified *Veillonella* isolates were chosen in this study. The PCR-based amplification and sequence analysis of 16S rRNA were performed by using the previously described primers. The sequences were determined with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. BLAST search, pairwise similarity values and construction of phylogenetic tree were evaluated by using LASERGENE program (DNASTAR).

Results and Discussion: The present study demonstrated that oral *Veillonella* isolates detected in subjects with poor oral hygiene were more than twice as likely to those with good or moderate oral hygiene. *V. rogosae* was detected as predominant species through all groups. The detection rates of *V. parvula* were increased from good to poor oral hygiene. This results indicated that the relative ratio of oral *Veillonella* species such as *V. rogosae* and *V. parvula* in the saliva could be used as an index of oral hygiene status of children. In addition, the unclassified *Veillonella* isolates formed a distinct cluster from the established *Veillonella* species based on 16S rRNA tree. The most closely related species was *V. dispar* and *V. tobetsuensis*. Pairwise similarity values obtained by phylogenetic analysis supported the results of 16S rRNA tree.

Conclusion: Based on the results, this study demonstrated that some oral *Veillonella* species could be a useful as bio-indicator of oral hygiene status in the children. Also, this study strongly indicated the possibility of novel species in the genus *Veillonella*.

³Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, The State University NY Buffalo

7. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kandy, Sri Lanka: Insight into Beijing and EAI genotypes

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

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

This study was performed to identify circulating genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and their transmission patterns within Sri Lanka. DNA was extracted from 85 isolates of MTB collected during 2012 to 2013 from new pulmonary tuberculosis (TB) patients seen at the Regional Chest Clinic in Kandy, Sri Lanka. Spoligotyping and analysis of Large Sequence Polymorphism (LSP) were performed and results were compared with Spol DB 4 database to identify the circulating genotypes. MIRU-VNTR typing for 24 loci was done for Beijing and EAI genotypes to identify the genetic diversity within each genotype. Minimum Spanning Tree (MST) was constructed and cluster analysis was done using BioNumeric 6.6 to detect the transmission patterns of TB.

Total of 26 distinct spoligotype patterns were identified and 16 of them were matched with the existing spoligo international type (SIT) patterns. Ten new spoligotype patterns were classified under lineage 1 and 4 by LSP. Predominant lineage in this study group was lineage 4 (48.4%, n= 39) followed by lineage 1 (28%, n=25) and lineage 2 (22.5%, n= 20). Only one isolate (1.1%) was detected in lineage 3. Highest number of isolates belonging to a single SIT was represented by Beijing/SIT 1 genotype (22.3%, n= 19), followed by EAI3-IND genotype (n=16, 18.8%). Cluster analysis and MST illustrated a high diversity within those two genotypes though they made 2 larger clusters based on spoligotyping results. In this study great diversity among circulating genotypes of MTB in Kandy, Sri Lanka was detected and a larger outbreak was not observed.

8. Insight into the Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* in Myanmar

o <u>Lai Lai San</u>^{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 regarded as a leading killer infectious disease worldwide. Myanmar is included in the 30 countries with a high burden of TB and is also one of the 30 high MDR-TB burden countries in the world. The estimates of MDR-TB burden in Myanmar by WHO in 2015 is 5.1% of new cases and 27% of retreated cases. The Beijing strain has a significant association with MDR-TB in a previous study in Myanmar. We aim to determine the transmission pattern of the Beijing genotype MTB strains by genotyping methods

To determine the genotype and to identify the transmission pattern, a total of 103 MTB isolates collected from Mawlamyaing, Myanmar in 2016 was used for the drug resistant conferring gene analysis and identification of the Beijing genotype. Among these isolates, 35 Beijing genotype strains were analyzed by variable number of tandem repeat(s) of mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU-VNTR) typing. Fifteen loci of MIRU-VNTR (QUB26, Mtub21, MIRU31, MIRU10, QUB11b, MIRU26, MIRU4, MIRU39, MIRU40, Mtub4, QUB4156, Mtub30, MIRU39, ETR A, and MIRU16) were used and the results were analyzed by Bionumeric software.

There were 6 clusters and 23 unique patterns in phylogenetic analysis. Each cluster consisted of 2 isolates. The finding suggested that the Beijing genotype MDR-MTB strains in Myanmar were diverse. MIRU-VNTR pattern of most of the isolates from Myanmar was different from that of the neighboring country. The strains from Myanmar showed no significant clonal expansion and less clustering. When comparing with the strains from the previous study and a neighboring country, Thailand, the genotype pattern of the outbreak strain was observed.

VNTR set used in this study was applicable for the discrimination of Beijing genotype MDR-MTB. The finding of the highly diverse Beijing genotype MDR-MTB can be inferred that the outbreak is less likely to occur. However, the same genotype pattern with the Thailand strains indicated that there were some outbreaks between Myanmar and Thailand region. This study contributes in making effective measures for the better treatment and prevention of TB in Myanmar.

9. 動物由来細菌からの 16S-RMTase の検出

○梶野朱里¹, 臼井優¹, 川西路子², 原田和記³, 田村豊¹ 1 酪農大・獣医・食品衛生, 2 農水省・動物医薬品検査所, 3 鳥取大・共同獣医・臨床獣医

【背景】

当研究室において 2005 年度の大直腸便由来大腸菌から低率 (0.9%) ではあるが 16S リボソーマル RNA メチラーゼ (16S-RMTase) が検出された。16S-RMTase は、 複数のアミノグリコシド(AG)系抗菌薬に対して高度に耐性を示す酵素であり、世界中でヒト、動物ともに報告がある。また、16S-RMTase をコードするプラスミドは他の耐性遺伝子が共存しやすいという報告も多くあり、保有した株の多剤耐性化が懸念される。そこで今回、動物由来細菌における 16S-RMTase の分布状況を調査し、16S-RMTase 遺伝子保有株の性状解析を行った。

【材料及び方法】

2015 年に分離した犬直腸便由来大腸菌 182 株及び 2004 年~2015 年に分離された 犬、猫に由来する腸内細菌科細菌 99 株、2003~2004 年と 2012~2013 年に JVARM で収集された、家畜(牛、豚、鶏)由来大腸菌 2467 株のうちゲンタマイシンに耐性を示した 27 株について 16S-RMTase の検出を行った。16S-RMTase が検出された 株に対して、サザンブロットを含むプラスミド解析、MLST 解析を行った。

【結果・考察】

2015 年度に分離された犬由来 Klebsiella pneumoniae 1 株から 16S-RMTase の一つである armA が検出されたが、家畜由来大腸菌からは検出されなかった。このことから、伴侶動物において 16S-RMTase は低率ながら存在しているが拡散や増加はしておらず、家畜においては分布していないか極めて低いことが示唆された。また、armA が検出された株は複数のプラスミドを保有(約 280,110,40kbp)し、armAをコードする約 280kbp のプラスミド上には、 β ラクタマーセ産生(bla_{TEM})遺伝子、AG 修飾酵素(aphAI)産生遺伝子など他の薬剤耐性遺伝子も存在していた。MLST解析の結果、この株は世界中のヒト医療現場で問題となっているクローンの一つである、ST37 に分類された。以上の結果より、イヌとヒトの間で ST37 の伝播が起こっている可能性が示唆された。

10. Prototheca zopfii の MALDI-Biotyper による 遺伝子型鑑別

○三浦祥¹,村田亮¹,加納塁²,内田郁夫¹,菊池直哉³ 1 酪農大・獣医・獣医細菌,2 日大・獣医,3 天使大・看護栄養

【背景・目的】*Prototheca zopfii(P. zopfii*)は乳牛に難治性乳房炎を起こす藻類 であり、遺伝子型1と2が存在している。環境性の遺伝子型1は病原性が低いが、 遺伝子型2は乳房炎の原因となり、摘発次第早急な隔離、淘汰が求められる。こ のため、乳房炎罹患牛および飼育環境中から P. zopfii が分離された場合には迅速 な遺伝子型鑑別法が必要となる。そこで本研究ではマトリックス支援レーザー脱 離イオン化法 (MALDI-Biotyper) によって 2 つの遺伝子型を鑑別する方法につい て検討した。【材料・方法】P. zopfii 遺伝子型1を20株と遺伝子型2を40株使用 した(日本大学・加納准教授から分与)。平板培地で培養後、MALDI-Biotyper に よって遺伝子型に基づいたクラスター分類が可能かを検証した。主要マススペク トル (MSP) の検出には最も一般的に用いられるエタノール・ギ酸抽出法のほか、 細胞壁溶解酵素: Zymolyase® (ナカライテスク株式会社) を用いた手法、ビーズ シェイカーを用いた手法など数種類の手法で処理し、解析を行った。得られた MSP をもとに系統樹を作成し、遺伝子型との関連性を検証した。【結果】エタノ ール・ギ酸抽出法では MSP を得ることができなかった。Zymolyase®を使用する と MSP の検出効率は高いが遺伝子型によるクラスター分類ができなかった。ビ ーズシェイカー法を試みたところ、MSP 検出効率が最もよく、作成した系統樹は 遺伝子型を反映したものであった。【考察】P. zopfii は強固な細胞壁を持ち、物 理的・化学的刺激に対して耐性があるため、これが解析の障害となっていたと考 えられる。Zymolyase®による処理により MSP の取得効率が改善したということ から酵素による処理は有効であると考えられるが、遺伝子型の鑑別に必要な蛋白 質まで破壊している可能性が示唆された。一方、ビーズシェイカー法は細胞壁を 有効に除去することができ、解析効率の向上につながったものと考えられる。本 研究で作成した系統樹を臨床分離株の鑑別に応用することで酪農場の乳房炎対 策に貢献できるものと期待される。

11. ハエが運ぶカルバペネム耐性菌の性状 ○福田 昭、臼井 優、若尾 英之、増井 ちな美、田村 豊

酪農大・獣医・食品衛生

【緒論】

カルバペネム系抗菌薬は多剤耐性グラム陰性細菌感染症の治療に用いられる「最後の頼みの綱」であり、カルバペネム耐性菌の存在は臨床上、重要である。一方で、環境中にはカルバペネム系抗菌薬に対して自然耐性を示す細菌が存在する。ハエは、様々な由来の細菌を運んでおり、薬剤耐性菌のベクター/リザーバーとなり、ヒトへ薬剤耐性菌を伝播する可能性がある。そこで、環境中に存在するカルバペネム耐性菌の分布、拡散とハエの役割を明らかにするため、ハエからカルバペネム耐性菌を分離し、その性状を調べた。

【材料・方法】

2014-2015年にタイの15ヶ所において捕獲したハエ99検体からCHROMagar KPC を用いて、カルバペネム耐性菌を分離した。分離された菌株は MALDI-TOF MS を用い、菌種の同定を行い、薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)を行った。

【結果・考察】

ハエから分離されたカルバペネム耐性菌の内、 $Stenotrophomonas\ maltophilia\ が最も高率(39 検体(39%), 14 ヶ所)に分離された。<math>S.\ maltophilia$ 株の薬剤耐性割合は、trimetoprim-sulfamethoxazole (30.2%), ceftazidime (44.2%), levofloxacin (2.3%), chloramphenicol (37.2%) であった。また、自然耐性であることが示唆されている imipenem, cefotaxime, gentamicin, tetracycline, colistin に対しては低感受性を示した。 PFGE 解析を行ったところ、多様性を示した。以上の結果から、ハエが多剤耐性の日和見感染症原因菌である $S.\ maltophilia\$ を高率で保有しており、環境中に存在 するカルバペネム耐性菌のベクター/リザーバーとなっていることが示唆された。 また、日本のハエからも $S.\ maltophilia\$ が分離されており、異なる地域においても 広く存在していることが予想され、注視していく必要がある。

12. 乳房炎原因菌に対するアカエゾマツの抗菌活性

○醍醐由香里¹, 友善良兼², 土居拓務³, 酒卷美子⁴, 萩原寬暢⁵, 村田亮¹, 内田郁夫¹, 横田博², 菊池直哉 ⁶

1 酪農大・獣医・獣医細菌,2 酪農大・獣医・獣医生化,3 林野庁・宗谷森林管理,4 マザーフォレスト,5 てしかが自然学校,6 天使大・看護栄養

【目的・背景】乳房炎は乳質低下と乳量減少を引き起こし、大きな経済的損失 につながる疾病である。環境性の原因菌は牛舎からの排除が困難であり、特に敷 料中の細菌数が乳房炎の発生に関わっているとされている。治療には抗菌剤が用 いられるが、耐性菌の出現を誘導する可能性があるため、代替法が模索されてき た。精油は古くから医学的に利用されており、近年では抗菌作用や抗ウイルス作 用が報告され、注目を集めている。本研究では北海道の主要樹種であるアカエゾ マツ(Picea glehnii)に着目し、乳房炎原因菌に対する抗菌活性を評価した。【材料・ 方法】被験菌として主要な乳房炎原因菌である Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Str.uberis, Str.dysgalactiae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae を用いた。アカエゾマツは北海道標茶町と酪農学園大学構内で採取し たものを使用した。精油の抽出は水蒸気蒸留法によって行い、樹皮を粉砕してバ ークを作成した。精油に対する被験菌の感受性の有無をディスク拡散法によって 評価した。その後、微量液体希釈法で最小発育阻止濃度(MIC)、最小殺菌濃度 (MBC)を測定した。また、アカエゾマツのバークと各菌液または糞便を混和して 一定期間培養し、細菌数の推移を記録した。【結果・考察】アカエゾマツの精油 はディスク法において全ての被験菌に阻止円を形成した。微量液体希釈法ではグ ラム陽性菌よりもグラム陰性菌で高い MIC・MBC を示した。アカエゾマツのバ ークも全ての菌株および糞便中の細菌増殖を抑制した。グラム陽性菌は培養2~4 日目までに細菌数が検出限界以下まで減少したが、グラム陰性菌では観察期間終 了まで一定の細菌数を維持した。 糞便中の細菌数は培養1日目までは市販のおが 屑よりも低い値を示した。感受性試験の結果から、アカエゾマツの精油が乳房炎 原因菌に抗菌作用を持つこと、グラム陰性菌は精油への感受性が低い傾向にある ことが明らかになった。さらに、精油だけでなくバークも細菌増殖を抑制する作 用を持つことが示された。以上より、アカエゾマツの精油とバークは乳房炎の予 防・治療への利用に期待できると考えられる。

13. フルオロキノロン耐性変異が結核菌 DNA ジャイレー ス活性にもたらす影響の評価

○大内勇樹¹, 中島千絵¹, 鈴木定彦¹ 1 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオリソース部門

結核は世界中で年間約 1000 万人の新規罹患者を出し、約 150 万人を 死に至らしめる重大な感染症である。一次選択薬としてリファンピシンやイソニ アジド、二次選択薬としてフルオロキノロンやカナマイシンなどが用いられるが、 それぞれの薬剤に耐性を持つ結核菌の発生により、化学療法が困難となっている。 結核菌の薬剤耐性獲得機構は、薬剤標的分子をコードする遺伝子上の変異による 薬剤結合部位の構造変化に主に依存している。通常、薬剤の標的分子は菌の生育 に必須であるため、薬剤結合部位の構造変化は分子の活性領域にも影響を与えて、 分子活性の低下と、それに伴う菌の増殖能低下を引き起こすことが示唆されてい る。このような耐性化の代償による不利益は、リファンピシン、イソニアジド、 カナマイシンに耐性の結核菌において、すでに分子レベルならびに細菌レベルで 報告されている。一方、同様に抗結核薬として処方されているフルオロキノロン に対する耐性株では、標的となる DNA ジャイレースをコードする遺伝子上の 88、 90 または 94 番目のコドンにおける変異が耐性獲得に関わっていることは知られ ているが、どのコドンにおける変異が DNA ジャイレース活性に影響を与えるか についての報告は極めて少ない。結核菌の薬剤耐性獲得機構を解明するために、 フルオロキノロン耐性変異が DNA ジャイレース活性にもたらす影響を評価する ことを目的として実験を行った。

【結果および考察】 変異の酵素活性への影響を評価するに当たって、フルオロキノロン耐性をもたらすとされる変異を導入した結核菌 DNA ジャイレースを大腸菌に発現させて、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。変異が導入された DNA ジャイレースの活性は、DNA 超螺旋化試験によって野生型と比較された。その結果、88 または 94 番目のコドンに変異を含む酵素は野生型よりも低い活性を示した。このことより、これらのコドンにおける変異が、結核菌にフルオロキノロン耐性をもたらすのみではなく、酵素活性にも影響することが示唆された。フルオロキノロン耐性変異による酵素活性の変化が細菌の表現型にどのように寄与するかを調べるために、各変異を導入した BCG 菌を結核菌モデルとして作出する実験を現在進行している。

14. Inhibitory activity of WQ-3810 against DNA gyrases of quinolone-resistant *Mycobacterium lepra*e

o Jong-Hoon Park¹, Tomoyuki Yamaguchi¹, Chie Nakajima¹, Suzuki Yasuhiko¹ ¹Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Japan

Leprosy caused by *Mycobacterium leprae* is one of the world health problems. The number of leprosy patients has been dramatically decreased by the multidrug therapy (MDT) recommended by World Health Organization (WHO). However, new cases and relapse cases still remain. More than 200,000 new cases are reported in the world every year. Resistance against drugs used in MDT is emerging a problem for leprosy treatment.

Ofloxacin is a quinolone used in MDT. The main target of quinolones is DNA gyrase, a bacterial enzyme that plays an essential role in DNA replication and transcription. Unfortunately, ofloxacin-resistant *M. leprae* has already been reported. Moxifloxacin was reported to be a promising new anti-leprosy drug by the WHO technical report in 2012. According to the report, moxifloxacin is five times more powerful than ofloxacin in mouse foot pad infection model. WQ-3810 is a newly developed quinolone that was reported to possess high bactericidal effect against many kinds of bacteria but not tested against *M. leprae*.

To compare with that of ofloxacin and moxifloxacin, we tested the inhibitory activity of WQ-3810 against *M. leprae* by in vitro assays using recombinant DNA gyrases of wild and mutant types with ofloxacin resistance-associated amino acid substitutions of valine for alanine at position 91, cysteine for glycine at position 89 and glycine for aspartic acid at position 95.

WQ-3810 had higher inhibitory activity than ofloxacin against wild type DNA gyrase and all of mutant type DNA gyrases. Interestingly, although inhibitory activity of WQ-3810 was slightly lower than moxifloxacin, the same or higher inhibitory activity was observed against mutant DNA gyrases. Our result suggested that the characteristic structure of WQ-3810 has a relationship with better inhibitory activity against DNA gyrase of ofloxacin-resistant *M. leprae*.

15. DC-159a shows inhibitory activity against DNA gyrase of Salmonella Typhimurium

∘Kentaro Koide¹, Siriporn Kongsoi¹,², Yuki Ouchi¹, Tomoyuki Yamaguchi¹, Chie Nakajima¹,³, Yasuhiko Suzuki¹,³

¹Div. of Bioresources, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Japan, ²Dept. of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thai. ³Global Station for Zoonosis Control, Global Institution for Collaborative Research and Education (GI-CoRE), Hokkaido University, Japan

Quinolones show excellent antibacterial activity against Salmonella isolates, however, quinolone resistant bacteria have been increasing in recent years. The aim of this study was to examine the *in vitro* activity of DC-159a against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in comparison with nalidixic acid and ciprofloxacin.

Recombinant wild type (WT) and five mutant DNA gyrases were expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. The inhibitory effect of quinolones was assessed by the drug concentration needed to inhibit the supercoiling activity by 50% (IC $_{50}$). Dilution methods were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of quinolones against two different strains, *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis.

While the IC₅₀s of DC-159a against WT and mutant DNA gyrases ranged from 0.32 to 8.8 μ g/ml, those of nalidixic acid and ciprofloxacin were 28-600 μ g/ml and 0.25-480 μ g/ml, respectively. Moreover, the IC₅₀s of all quinolones were highest for DNA gyrase with double mutation; however, the IC₅₀ of DC-159a was less than 1/50 that of nalidixic acid and ciprofloxacin. Finally, MICs of DC-159a were higher than those of ciprofloxacin, but lower than those of nalidixic acid.

In contrast to nalidixic acid and ciprofloxacin, DC-159a exhibited potent activity at low concentrations against WT, single and double mutant DNA gyrases. Based on the relationship between IC₅₀ and MIC, the estimated MICs of DC-159a against *Salmonella* strains with mutant DNA gyrase were much lower than those of ciprofloxacin and nalidixic acid. DC-159a is suggested as a candidate drug for the treatment of salmonellosis caused by quinolone resistance *S*. Typhimurium

16. 腟頸管スワブからの性器クラミジアの検出率と菌叢解析: 腸内細菌科細菌が与えるインパクト

偏性細胞内寄生性細菌 Chlamydia trachomatis は性感染症の原因であり、健康女性 の子宮頚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%と高い。多くの場合は無症候性であり、無治療のまま放置すると卵管へと上向性に 感染は拡大し、骨盤内炎症性疾患(PID)を発症し、さらに繊維化に伴って卵管は閉塞し 不妊となる場合もある。しかしながら、上向性に感染を拡大させる要因ともなる腟頸管 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。その一方で、 腟症の程度や腟内菌叢がクラミジアの感染動態に影響を与えている可能性は否定できな い。そこで、札幌市東豊病院に 2016 年 6-10 月に来院した患者と妊婦検診健常者腟頚管 部から擦過されたスワブ 273 検体を用いてクラミジア感染に伴い腟内の細菌叢と腟炎症 度がどのように変化するのか検討を行った(倫理審査承認番号: 15-99-2)。各スワブ検体の 一部から塗抹標本を作製しグラム染色像によって腟粘膜表面の炎症度を数値化する Nugent Score を算出し、同時に検体中のクラミジア、ラクトバチルスを PCR にて検出を 行った。ラクトバチルスについてはリアルタイム PCR で菌数を測定し、Nugent Score に よる腟炎症度との関係を調査した。全273検体よりクラミジア陽性検体(21検体:D型10%、 E型 25%、F型 25%、H型 5%)を含んだ 48 検体をピックアップし、菌叢解析(北海道シ ステム・サイエンスに委託)を行った。その結果、提供された臨床検体におけるクラミ ジア陽性数は22検体(8.46%)であり、腟症の増悪化に伴ってラクトバチルス菌数の減 少が認められた(χ^2 test、p=0.008)。腟症の程度とクラミジアの感染頻度との間には、な んら関連性は見いだせなかった(χ^2 test、p=0.1365)。菌叢解析の結果、腟症が見られない 群において、クラミジア非感染者に比べ感染者では、腸内細菌科細菌の OUT 数が有意に 高かった。その一方で、いずれの検体でもマッコンキー培地上での集落形成はほとんど 確認できなかった。このように、腟症が認められない健常者において、腟内腸内細菌科 細菌 OUT の増加は、性器クラミジアの感染率にインパクトを与える。

17. 札幌地下歩行空間での空気中浮遊細菌の菌叢解析

○大久保寅彦¹, 松尾淳司¹, 大崎敬子², 神谷茂², 山口博之¹¹北大院・保科・病態解析,²杏林大・医

ヒトの生活環境から見いだされる菌叢は、ヒトの動きや密集度などによって変動しながら、健康や感染症の発生に影響を与えていると予想される。本研究室では昨年、札幌地下歩行空間にて空気を経月的に採取し、そこに含まれる生菌数が気温の上昇と連動して増加したことを当学会で報告した。今年度は空気中に含まれる細菌の構成を明らかにするために、同じサンプルを用いた次世代シーケンサーによる菌叢解析を実施した。

作業は2016年5月2日、6月1日、7月5日の計3日で、各日午前8時から午後8時の間に、ローボリウムエアサンプラーLV-40(柴田科学)に $0.3\,\mu$ m ガラス繊維フィルターを装着して40L/min で吸気し、2時間ごとにフィルターを交換してエアサンプルを得た。吸気部は地上1.5m に設置し、空気中の粒子数はハンドヘルドパーティクルカウンターP311(エアリーテクノロジー)を用いて $0.3\sim0.5\,\mu$ m、 $0.5\sim1.0\,\mu$ m、 $1.0\sim5.0\,\mu$ m の3分画を測定した。回収したエアサンプルは0.05% TritonX 添加 PBS で洗浄し、洗浄液から DNA を抽出後、16S rDNA に基づく菌叢解析を実施した。

陰性対照で検出された菌(門レベル)を除外した結果、OTU 数は5月が6,662 リード、6月が8,353 リード、7月が38,467 リードとなり、生菌数と同じく気温が上昇するにつれて検出リード数が増加した。一方、全体としてのリード数は土壌などの環境サンプルを用いた既報と比べて非常に少なく、エアサンプル中のDNA濃度が非常に薄いことを反映しているものと考えられた。門レベルでの同定結果では、Firmicutes 門(グラム陽性菌)がいずれのサンプル中でも最も高い割合で検出されており、乾燥に強い細菌が空気中を浮遊しているものと考えられた。リード数やその菌叢構成に明確な日内変動は認められなかった。これらの結果により、ヒトが活動している時間帯の空気中浮遊細菌の挙動を明らかにすることができたため、今後はヒトの活動が無い時間帯における細菌の状態を調査予定である。

18. マイコプラズマ由来リポタンパク質によるマウスマ

クロファージに対する IL-1β産生誘導活性

○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, ²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-1β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-1β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-1βを産生することを明らかにした。本 研究では、これらのマイコプラズマの活性物質の一つがリポタンパク質(LP)・ リポペプチドであることを明らかにしたので報告する。Ms ならびに Mp 菌体は C57BL/6 (B6) マウスの骨髄細胞由来マクロファージ (BMM) に IL-1βならびに IL-18 の産生を誘導したが、本活性は TLR2^{-/-} BMM で有意に減弱した。そこで、 活性物質が LP ではないかと考え、Ms ならびに Mp から TritonX-114 二相分離法 でLP (MsLP と MpLP) を調製した。MsLP、MpLP あるいは Ms 由来リポペプチ ド FSL-1 は B6BMM に IL-1 β の産生を誘導し、活性部位は N 末端のリポペプチド 部分にあることが示唆された。これらの活性は caspase-1^{-/-}、ASC^{-/-}あるいは NLRP3--BMM でほぼ完全に消失するだけでなく、TLR2--BMM でも有意に減弱し た。以上より、LP は NLRP3 インフラマソームを活性化し、また、TLR2 シグナ ルのみで NLRP3 インフラマソームを活性化する経路の存在が示唆された。マク ロファージに取り込まれた FSL-1 はファゴリソゾームだけでなく、細胞質に局在 していた。BMM の細胞質に LP を人為的に導入したところ、B6 では活性は約8 倍上昇したが、TLR2⁻BMMでは弱い活性がみられたのみであった。以上より、 マウス BMM に対する Ms ならびに Mp の NLRP3 インフラマソームを活性化する 物質の一つはLPであり、その活性発現にはN末端のリポペプチド部分が重要な 役割を果たし、また、これらの LP は貪食された後に、その一部 (リポペプチド?) が細胞質に局在することが重要であることが示唆された。

19. Chlamydia 感染による DEVD 配列挿入環状ルシフェラーゼ発現細胞のカスパーゼ 3 活性化測定

○松尾淳司¹、大久保寅彦¹、中村眞二²、山口博之¹

¹北大院・保健科学・病態解析 ²順大院・医・形態解析イメージング

【目的】偏性細胞内寄生性細菌 Chlamydia trachomatis は、感染能を有するが増殖できない基本小体と感染能はないが増殖可能な網様体からなる二相性の増殖環を巧みに使い分けて宿主細胞内で増殖する。そのため C. trachomatis は、増殖ステージに応じて宿主環境を最適な状態に操作し、特に宿主細胞の感染防御機構であるカスパーゼ依存的に活性化するアポトーシス経路は、C. trachomatis の主要な標的である。これまでの研究で増殖環の前期にはアポトーシスは抑制され、後期では反対に促進されることが明らかになっている。しかしながら、感染時のこれらアポトーシス活性制御の切り替えに関わる分子機構は十分には理解されていない。そこで我々は、以前に Kanno ら (Angew Chem Int Ed Engl, 46:7595-9, 2007) によって開発されたカスパーゼ 3 基質配列 (DEVD) を挿入した環状ルシフェラーゼ (cFluc-DEVD)が、C. trachomatis による宿主アポトーシス誘導の解析に有用である可能性を考え、C. trachomatis を感染させた cFluc-DEVD 発現細胞においてカスパーゼ 3 の活性化測定を試みた。

【方法】C. trachomatis L2型 434/Bu 株 (ATCC VR-902B) を HeLa 細胞で 2 日間培養し、凍結融解後に精製したものを用いた。cFluc-DEVD を安定発現するヒト上皮細胞株 HEp-2 細胞に C. trachomatis を遠心吸着法にて感染させ 2 日間培養し、経時的にルシフェラーゼ活性をモニタリングした。陽性コントロールとして、アポトーシスを誘導するスタウロスポリン (STS) を用いた。

【結果と考察】HEp-2 細胞への cFluc-DEVD 遺伝子の挿入は PCR にて確認した。次に STS を用いて、カスパーゼ 3 の活性をモニタリングしたところ、4~6 時間で最大となり、STS 濃度依存的に上昇した。このように cFluc-DEVD 発現 HEp-2 細胞を用いて、カスパーゼ 3 活性が正確に測定できることが明らかとなったので、次に C. trachomatis 感染細胞におけるカスパーゼ 3 活性を測定した。その結果、カスパーゼ 3 活性は感染後 12 時間で低下し、36~48 時間において上昇した。このように cFluc-DEVD 発現細胞は C. trachomatis 感染細胞のカスパーゼ 3 活性を解析するうえで有用なツールとなる可能性が示唆された。〔非会員:芳賀早苗、尾崎倫孝(北大院・保健科学・生体応答);小澤岳昌(東大院・理・化学)〕

20. 巨大ウイルス Mimiviridae 科が環境クラミジアの 進化に与えた影響について

○山口博之¹、松尾淳司¹、大久保寅彦¹、中村眞二² ¹北大・保科・病態、²順天堂大・医・研究基盤センター

偏性細胞内寄生性細菌クラミジアの祖先は、今から 7-14 億年前に二つの系統に分 岐し、一つは脊椎動物へ(病原性クラミジア)、もう一つの系統は土壌や水系環境 に普遍的に生息しているアメーバ等の単細胞性の生物へと適応進化の道を選び (環境クラミジア)、現在に至ったと考えられている。しかしながら、その分岐が 起こった理由は不明である。一方、最近の研究で、アメーバを宿主とする、原生 動物関連巨大ウイルス(光学顕微鏡で容易に確認することができる二本鎖 DNA ウ イルス)が発見された。そこで、これら巨大ウイルスの存在が、クラミジアの進化 に与えた影響を、比較ゲノム解析から探った。ゲノム情報 (環境クラミジア n=14, 病原性クラミジア n=12、原生動物関連巨大ウイルス n=15、原生動物非関連巨大 ウルルス n=11) は、NCBI データベースから取得した。アノテーション、BLAST 解析そして比較ゲノム解析は RAST サーバー(http://rast.nmpdr.org/)を用いて行っ た。その結果、病原性クラミジアとは対照的に、環境クラミジアゲノム中には、 原生動物関連巨大ウイルス遺伝子(特に Mimiviridae 科ウイルス)と相同性を持つ遺 伝子が、1-8%の頻度で見つかった。またどちらのクラミジアゲノム中においても、 原生動物非関連巨大ウイルスの遺伝子頻度は僅かであった。環境クラミジアゲノ ム中に高頻度に見出された原生動物関連巨大ウイルス遺伝子の多くが、アンキリ ンリピート(蛋白間相互作用を行う上でプラットホームになるドメイン)をコード していた。さらに環境クラミジアゲノム中に見つかった原生動物関連巨大ウイル ス遺伝子は、アメーバ(Acanthamoeba castellanii Neff)ゲノム中にも良く保存されて いた。これらの結果から、原生動物関連巨大ウイルスの中でも特に Mimiviridae 科ウイルスは、クラミジアの進化に影響を与えた可能性が示唆された。

21. Lactobacillus gasseri リポテイコ酸の 菌種特異的な化学構造

○久富亮佑 ¹、白石宗 ¹、佐藤耶舞羽 ²、森田直樹 ³、 吹谷智 ²、佐藤豊孝 ¹、横田篤 ²、横田伸一 ¹ ¹札幌医科大学 医学部 微生物学講座

²北海道大学大学院 農学研究院 基盤研究部門 微生物生理学研究室 ³産業技術総合研究所 生命工学領域 生物プロセス研究部門

【背景・目的】リポテイコ酸(LTA)は、グラム陽性細菌の細胞表層に存在し、糖リン酸ポリマーの主鎖がアンカー糖脂質に結合した構造を有する。その構造は菌種、菌株間で異なり、宿主免疫の惹起能にも差のあることが報告されている。現在、LTA の構造が判明している半数以上の菌株において、アンカー糖脂質は、2糖のヘキソースと2分子の脂肪酸残基からなる。一方、Lactobacillus 属細菌のLTAは、ほとんどが3糖のヘキソースと3もしくは2分子の脂肪酸残基をもつ特徴的なアンカー糖脂質を有している。我々はLactobacillus gasseri JCM 1131^T のLTA がグラム陽性菌の中でも初めてである4糖のヘキソースからなるアンカー糖脂質構造を有することを報告した。本研究では、この特徴的な4糖構造が L. gasseri 種の共通構造か、本菌株特有のものかを明らかにするため、L. gasseri 7株について、構造解析を行った。

【材料・方法】様々な分離源由来の L. gasseri 7 株(JCM 1131^T を含む JCM 分譲株 3 株、臨床分離株 4 株)の菌体からブタノール抽出、Octyl-Sepharose を用いた疎水性クロマトグラフィーを行い、LTA を精製した。糖リン酸ポリマー構造は 1 H-NMR によって解析した。LTA を酢酸分解して得たアンカー糖脂質画分と、さらにアンモニア処理によって脱アシル化した糖画分について MALDI-TOF MS で解析した。

【結果】全ての菌株において、LTA の糖リン酸ポリマーは D-アラニンを置換基に持つ グリセロールリン酸からなり、アンカー糖脂質は4糖のヘキソースと3もしくは2分子の脂 肪酸残基からなっていた。

【考察】 グリセロールリン酸主鎖は多くの菌種で見られる一般的な構造であった。アンカー糖脂質の脂肪酸残基数は、他の Lactobacillus 属と同様に 3 分子と 2 分子が混在していた。糖鎖部分は 4 糖構造が全 7 株に共通して確認された。よって、4 糖構造は L. gasseri 種に特異的であることが示唆された。

22. 低酸素条件培養下で *Chlamydia trachomatis* の 感染動態を修飾する要因について

○酒井昂平¹, 松尾淳司¹, 渡辺宜典¹, 大久保寅彦¹, 中村眞二², 山口博之¹ ¹北大院・保健科学・病態解析, ²順大院・医・形態解析イメージング

偏性細胞内寄生性細菌 Chlamydia trachomatis は、世界中で感染者が認められる主要な性感染症起因菌である。C. trachomatis 感染の多くは、無症候性に進行するため、無治療のまま放置されることも多い。その結果、C. trachomatis は上向性に卵管へと移行し、骨盤内炎症性疾患を発症させると共に、卵管は線維化に伴い閉塞し不妊の原因となる。C. trachomatis 感染に伴う卵管の線維化に関与する因子は明らかではないが、線維化の促進には低酸素状態が密接に関与すると考えられている。一方、低酸素条件下における C. trachomatis が、通常酸素条件下と遜色なく増殖することが報告されている。そこで我々は、C. trachomatis 感染が線維化形成に与える影響を明らかにするために、2%低酸素状態[低酸素培養チャンバーMIC-101(Billups-Rothenburg)]における C. trachomatis 感染動態を検討した。

まず C. trachomatis [D型 UW3/ C_X 株(ATCC VR885)]をヒト子宮頚癌細胞株 HeLa 細胞(5×10^4 cells/well)に感染させ、低酸素と通常酸素条件下で 10% FCS 添加した DMEM と RPMI 培地を用いて培養し、C. trachomatis の増殖の様子を比較した。 RPMI においては過去の報告と同様の結果が得られたが、DMEM では通常酸素分圧に比べ低酸素条件下で、C. trachomatis の感染粒子数が、1/10-1/1000 程度に低下した。DMEM にグルコース、グルタミン、必須アミノ酸、ビタミンなど(D-biotin、p-Amino Benzoic Acid、Vitamin B-12、Glutathione) を添加した条件でも検討したが、通常酸素分圧と低酸素における C. trachomatis の感染粒子数の差は開いたままだった。その一方で、プレートに播種する HeLa 細胞数を 1- 2×10^4 cells/well に下げ観察すると、C. trachomatis が通常酸素条件下と遜色なく増殖することが分かった。このように低酸素環境における C. trachomatis の発育は、通常酸素分圧に比べ感染細胞が栄養を十分に補給できる条件(特に細胞数)に強く依存し修飾される可能性が示唆された。

23. Proteus mirabilis の溶菌バクテリオファージの探索

○今村尚睦¹,村田亮¹,岩野英知²,菊池直哉³,内田郁夫¹ 1 酪農大・獣医・獣医細菌,2 酪農大・獣医・獣医生化,3 天使大・看護栄養

【目的と背景】Proteus mirabilis は平板倍地上で強い遊走能を示すグラム陰性桿菌である。この遊走によって、培地表面を P.mirabilis が覆ってしまい、目的とする他の病原細菌の単離に支障をきたすことがある。本研究ではファージの宿主特異性を活用し、P.mirabilis の増殖だけを抑える培地の作成を目的とし、環境中からバクテリオファージの単離を試みた。

【材料と方法】動物の糞便、環境中から P.mirabilis と思われる菌株を分離し、SIM 培地にて培養した。菌性状(硫化水素産生[+]、インドール産生[-]、運動性[+]、IPA 反応[+])を示し、さらに PCR で標的となるウレアーゼ遺伝子領域を増幅できたものを P.mirabilis とし、47 株を収集した。ファージは、豚舎(山形県、長野県、栃木県より)や、江別市下水処理施設の下水サンプルを遠心濃縮処理し、単離を試みた。このファージ液とウシ2株、イヌ1株、ブタ1株、豚舎下水由来2株それぞれ6株の P.mirabilis を混合して、プラークアッセイ(溶菌反応試験)を行った。遊走抑制試験として「ファージを培地表面に撒く方法」、「ファージ濃縮液を培地に滴下する方法」、「あらかじめファージと菌液を混和する方法」を試みた。

【結果】栃木県豚舎下水より同条件下由来のP. mirabilis に溶菌反応を示すファージを単離することができた。しかし、他のP. mirabilis 分離株に溶菌反応を起こすことはなかった。このファージは、P. mirabilis の遊走を完全に抑制することはできないものの、「あらかじめファージと菌液を混ぜ合わせる方法」が最も有効であることが示唆された。また、ファージと菌液との混和時間によってP. mirabilis の遊走距離に変化が見られた。

【考察】高濃度のファージを菌液と混和しても溶菌しきれない P. mirabilis が観察される。これはファージ耐性を持つ P. mirabilis が出現したためと考えられる。さらにファージ収集をすすめ、ファージカクテルを作ることでファージ耐性菌の出現を阻止するための検討が必要である。

24. 炭疽菌の病原因子調節に関与する転写因子 AtxA と

DNAの相互作用解析

○豊間根 耕地、藤倉 大輔、古田 芳一、東 秀明 北大・人獣センター

炭疽はグラム陽性の芽胞形成菌である炭疽菌によって引き起こされる致死性 の感染症である。炭疽菌の病原遺伝子として炭疽菌毒素遺伝子と莢膜代謝酵素遺 伝子群が知られており、これらの遺伝子は2つのプラスミドによってコードされ ている。AtxA は炭疽菌の転写因子で、病原遺伝子の転写を調節する。これまでに AtxA を欠損した炭疽菌の病原性は低下することが示されており、AtxA は炭疽の 病原性に重要な役割を果たす分子であると考えられている。しかしながら AtxA による病原因子発現調節の機構の詳細は明らかにされていない。そこで、本研究 では AtxA 依存的な病原因子発現機構の解析を行い、炭疽菌の病態発現に関する 分子機構の解明を進めた。我々は AtxA とその標的配列が形成する相互作用に着 目し、Bacterial One-Hybirid (B1H) 法による in vivo での解析を試みた。この手法に より、炭疽菌毒素の1成分である防御抗原遺伝子 pag の転写制御領域と AtxA の 相互作用が明らかとなった。また、B1H 法に加え、ゲルシフトアッセイ法を応用 した in vitro での相互作用解析を行い、AtxA と DNA の結合による複合体の形成 を観察した。これまでの解析結果により (i) pag の転写制御領域が下流遺伝子の転 写を抑制し、(ii) DNA 結合性タンパク質である AtxA はその転写抑制を解除する ことが明らかになった。

25. 共生細菌依存的なアメーバによるヒト病原細菌の運搬現象について

○松下瑞江¹,大久保寅彦¹,松尾淳司¹,中村眞二²,山口博之¹ ¹北大院・保科・病態解析,²順大院・医・研究基盤センター

クラミジアには、哺乳細胞に適応進化し性感染症や呼吸器疾患を引き起こす病原 性クラミジアと、自然環境に生息するアカントアメーバに共生する環境クラミジ アの2系統が存在する。本研究室では以前、土壌から環境クラミジアが共生する アメーバ(S13 アメーバ)を分離・株化した。共生する環境クラミジア(Neochlamydia S13)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 の持続感染は、宿主アメーバの増殖能や運動能を低 下させることから、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 っているようだが、それにも関わらず、S13 アメーバは、Neochlamydia S13 の持 続感染を許容している。そこで私たちは、S13 アメーバがこの細菌との共生から 受ける利点を明らかにしようと試みている。その一環として、S13 アメーバとそ の餌となるヒト病原性細菌(大腸菌やサルモネラ)との相互作用について"細菌を 運ぶ"といった視点から探索を行った。実験は極めてシンプルであり、S13アメー バ (2×10^3) 細胞)とヒト病原細菌(GFP) を発現する大腸菌やサルモネラ、各 $2 \times$ 10⁵CFU)を混合し、その混合液を LB 培地(直径 60 mm)の中央に 20 μ L スポット し、培地上の集落形成とアメーバの足跡を経日的に観察した。また走査型電子顕 微鏡で形態観察も行った。その結果、培養日数に依存して、S13 アメーバと共に 添加した細菌の集落が、シャーレの周囲へと時計回りに移動しながら、まるで花 弁のように形成されることを発見した。また集落は、アメーバが這った軌跡に沿 って形成された。一方で、共生細菌をリファンピシン処理で除菌したアメーバや ATCC から購入した C3 アメーバでは、このような現象が起こらなかった。また、 走査型電子顕微鏡による観察の結果、除菌アメーバに比べ S13 アメーバ表面に沢 山の細菌が付着している様子が観察された。これらの結果から、S13 アメーバは 共生細菌依存的に、生きた細菌を体表面に付着させて運搬していると考えられた。 このように、この細菌の運搬現象は、栄養分の少ない環境でアメーバが生き残る 上で、有利に働く可能性がある。