

RNA ウイルスの RNA ポリメラーゼの研究には、ミニゲノム転写・複製系が広く用いられてきた。本系は、ゲノム両末端配列の間にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を有するミニゲノム RNA、ならびに RNA ポリメラーゼを含むヌクレオカプシド構成蛋白質を発現する各種プラスミドを細胞に導入することで、感染細胞で行われるウイルス RNA の転写・複製を人工的に再現するものである。本系を用いれば、レポーター遺伝子の発現量を指標として転写・複製効率を簡便に評価することが可能である。その一方で、ミニゲノム転写・複製系は、すべてのウイルス因子の供給をプラスミドからの一過性発現に依存しているため、アーティファクトの影響により必ずしも感染細胞における転写・複製を反映しない可能性も考えられる。それに対し、本研究で樹立した L 遺伝子欠損ウイルスを用いた実験系は、L 蛋白質の発現のみをプラスミドに依存していることから、ミニゲノム転写・複製系よりもアーティファクトの影響が少ないと考えられる。

本研究では、L 蛋白質発現プラスミドを導入した細胞に Nishi- $\Delta$ L/GFP 株および Nishi- $\Delta$ L/Luc 株を感染させることで経時的なレポーター遺伝子の発現上昇が確認された(図 2 および 3)。このことは、上記の発現プラスミド上の L 遺伝子 cDNA に種々の変異を導入した後、同様の実験を実施することで L 蛋白質の機能領域の解析が可能となることを示している。すなわち、本系は、狂犬病ウイルスの L 蛋白質の機能解析に有用なツールとなることが明らかとなった。

Nishi- $\Delta$ L/Luc 株を接種した L 蛋白質非発現細胞において、非接種細胞よりも高いルシフェラーゼ活性が検出されたことより(図 4)、これを指

標とすることで、狂犬病ウイルスの初期転写が検出可能であることが強く示唆された。通常の狂犬病ウイルスやミニゲノム転写・複製系を用いた場合、技術的に初期転写と二次転写を区別することはできない。したがって、Nishi- $\Delta$ L/Luc 株を用いた本系は、狂犬病ウイルスの初期転写の機序を解明する上で極めて有用なツールとなることが予想される。

## E. 結論

本年度は、GFP およびルシフェラーゼを発現する L 遺伝子欠損狂犬病ウイルス (Nishi- $\Delta$ L/GFP 株および Nishi- $\Delta$ L/Luc 株)の作出に成功した。これらの L 遺伝子欠損ウイルスの性状を解析した結果、これらが狂犬病ウイルスの L 蛋白質機能ならびに初期転写の分子機序を解明する上で有用な研究ツールとなる可能性を示すことができた。

## L. 健康危険情報

該当なし

## M. 研究発表

### 1.論文発表

該当なし

### 2.学会発表

- 1) Nakagawa K, Ito N, Okada K, Okadera K, Mitake H, Sugiyama M, Generation and characterization of L gene-deficient rabies virus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan (2015. 1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

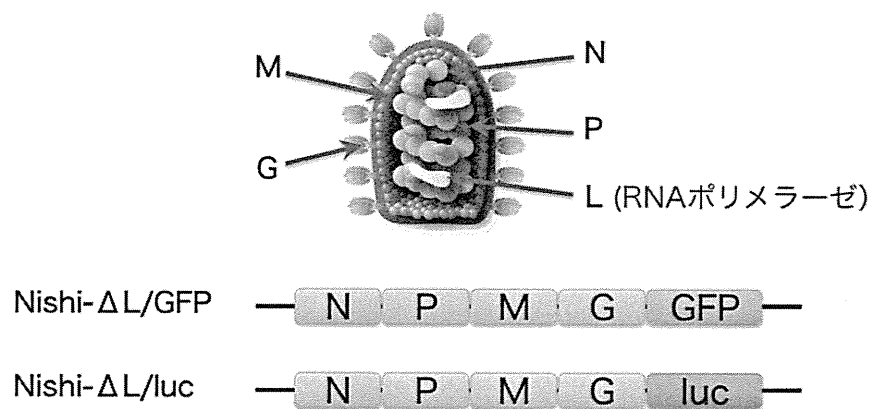


図1. 本研究において作出したL遺伝子欠損狂犬病ウイルス

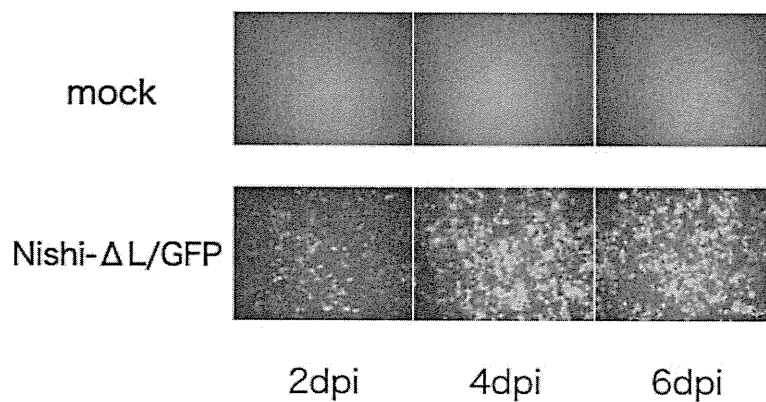


図2. Nishi- $\Delta$ L/GFP株によるGFPの発現  
(L蛋白質発現プラスミド導入細胞)

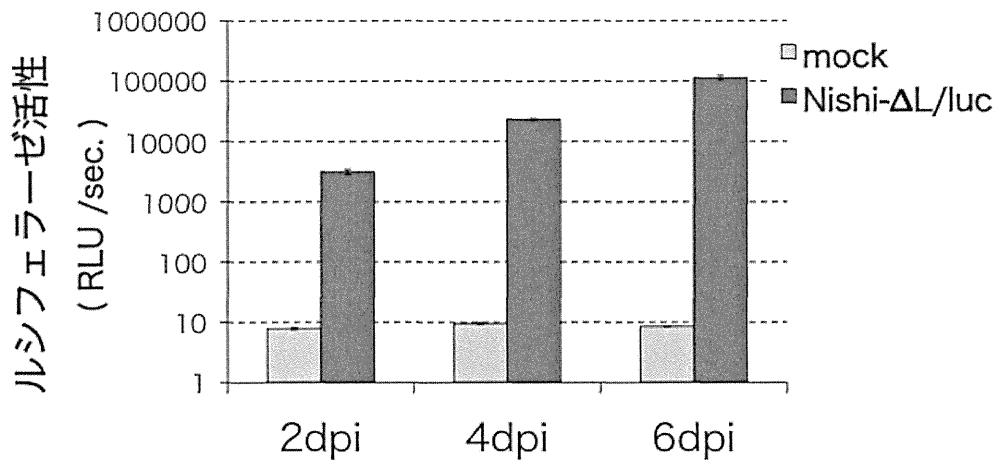


図3. Nishi-ΔL/luc株によるルシフェラーゼの発現  
(L蛋白質発現プラスミド導入細胞)

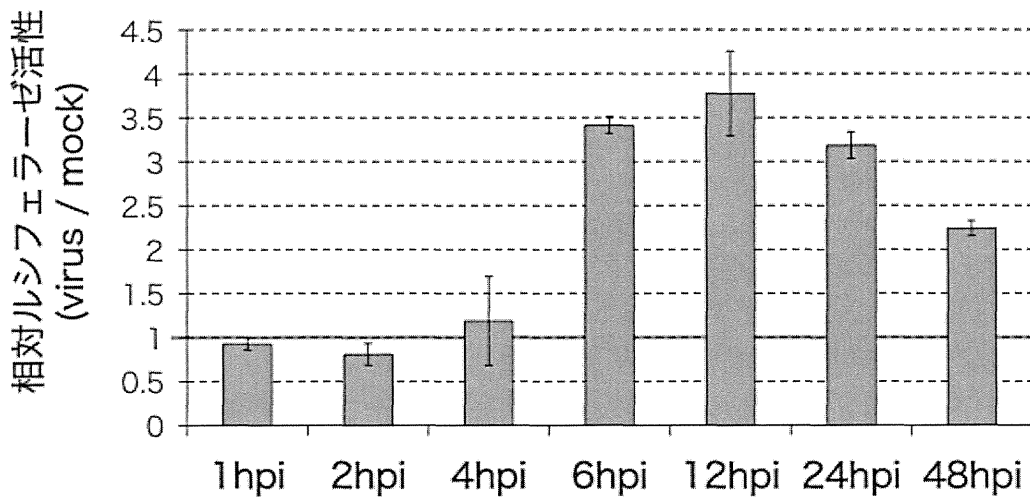


図3. Nishi-ΔL/luc株の初期転写を反映する  
ルシフェラーゼ活性の検出  
(L蛋白質非発現細胞)

ブルセラ症の診断法の開発  
(無尾類からの新規ブルセラ属菌の分離と解析)

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	宇根 有美	麻布大学	獣医学部 獣医学科	教授

**研究要旨：** 昨年度、本研究にて、新たな2株を無尾類より分離し、新規ブルセラ属菌であると同定したが、今回、別種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試み、無尾類のブルセラ属菌保有の有無を検討したところ、ベルツノガエル3個体から3株が分離された。これら、分離株は、Combinatorial-PCRの結果、いずれも新規のブルセラ属菌であったが、昨年度報告した株とはPCRの反応性、生化学的性状に違いが見られ、昨年度の株とも異なる新規のブルセラ属菌であることが明らかとなった。さらに、昨年2株では、培養ヒト由来細胞（HeLa）への感染・増殖も認められたことから、ヒトへの感染リスクが有ることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

波状熱やマルタ熱として知られるブルセラ症（Brucellosis）は、ブルセラ属菌（*Brucella* spp.）による、世界中の多くの国と地域で重要な人獣共通感染症である。近年では、旧来の家畜由来（*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*）や犬由来ブルセラ属菌（*B. canis*）だけでなく、海棲哺乳類由来や、その他新種のブルセラ属菌が、齧歯類、食肉類、霊長類、さらにヒト患者からも分離されてきている。（表1）。

*B. inopinata* は豊胸手術部位の病変

から分離された新規ブルセラ属菌として、2008年に報告され、その後、慢性肺疾患の患者からも近縁の菌が分離・報告された。*B. inopinata* はヒトに感染しうる菌と考えられているが、その自然宿主や生態は不明であった。そのような中、2012年にアフリカ産無尾類由来の新たなブルセラ属菌が独、米の異なるグループにより相次いで報告され、これらは *B. inopinata* に近縁であった。我々も昨年度、本研究にて、新たな2株を無尾類より分離し、新規ブルセラ属菌であると同定したが、今回、別種の無尾類よりブルセラ属菌の分離を試

み、無尾類のブルセラ属菌保有の有無を検討し、分離株については、その生化学的性状、薬剤感受性、ヒトへの伝播の可能性を検討した。

## B. 研究方法

1. 無尾類由来ブルセラ属菌の分離：愛玩用無尾類の繁殖施設で、2014年に変態後間もない幼蛙の大量死が発生した。そのベルツノガエル (*Ceratophrys ornate*) 10個体の臓器（肝臓、腎臓、大腿骨・骨髄）、計20検体を用いた。菌分離は、粉碎後の検体をブルセラ選択サプレメント（関東化学SR83）添加20%ウマ血清入り ATCC488 ブロスで培養、適宜、BHIプレートにサブカルチャーし、発育してきたコロニーを釣菌し、分離株については、Combinatorial-PCR法により確認した。

2. 生化学的性状の解析：無尾類由来分離株として、昨年度報告したA105株（イエアメガエル由来）、A141株（デニスフロッグ由来）および今年度、ベルツノガエルより分離したA7h株、A9h株、A10h株を用いた。対照としては、*B. melitensis* 16M、*B. suis* 1330、*B. canis* QE13、*B. neotomae* ATCC23459、*Ochrobactrum anthropi* ATCC49187、*O. intermedium* AQZ08を用いた。検査には、API20E（バイオメリュー）、NF-18（ニッスイ）、BACTOLABO オキシダーゼテスト（和光純薬）を用いた。分離株をBHI寒天培地で24時間培養後、それぞれに添付のプロトコールに従い実施した。

3. 薬剤感受性の解析：無尾類由来分離株として、A105株、A141株、A7h

株、A9h株、A10h株を用いた。対照としては、*B. canis* QE13、*E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC25923を用いた。試験はセンシ・ディスク（BD）を使用したKB法で行った。*Brucella*属菌は、本法の標準培地である、ミューラーヒントンおよびヘモフィルステスト寒天培地では、極めて生育が悪く判定が困難なためBHI寒天培地を使用した。

4. 細胞内増殖能の検討：A105株、A141株を用いた。菌はマイクロバンクからヒツジ血液寒天培地に播種し、2回継代24時間後に使用した。細胞（HeLa細胞）は、6wellカルチャープレートに $2.5 \times 10^5$ /wellとなるように加えた。24時間培養後、菌を各wellに加え、遠心吸着させた後、37°C、5%CO<sub>2</sub>で、1時間感染させた（感染処置後の時点を0hpiとする）。洗浄後、細胞外の菌を殺菌するため、50ug/ml ゲンタマイシン添加培地で1時間処理した。その後、10ug/ml ゲンタマイシン添加培地に交換したのち、培養を継続し、経時的（1, 4, 8, 12, 16, 20, 24hpi）に細胞を回収し、セアーマーチン寒天培地でCFUを計測した。

## C. 研究結果

1. 菌分離（図1）：ベルツノガエル10個体のうち、3個体の肝臓より、菌が分離された（A7h株、A9h株、A10h株）。Combinatorial-PCR法により、omp2-caを除く3種のプライマーによる明らかな特異的増幅が認められた。ただ、昨年度分離したA105株、A141株では、4種のプライマーによる特異的増幅が認められたのに対して、今回

は *omp2-ca* の反応性が著しく弱いことから、これらとは異なることが明らかとなった。A7h、A9h、A10hの間には差は認められなかった。

2. 生化学的性状 (表2): 無尾類分離株は対照としておいたブルセラ属菌よりも特に糖の分解能において、*Ochrobactrum* 属の菌と類似のパターンを示した。また、無尾類分離株内でも、2タイプ (A105、A141タイプと、Ah7、Ah9、Ah10タイプ) に分かれるようであった。

3. 薬剤感受性 (表3): マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の抗生物質に対しては概ね感性であったが、ブルセラ症の治療に用いられるアミノグリコシド系やリファンピシンには中間を示した。対照に用いた *B. canis* とは若干、異なるプロファイルを示した。

4. 細胞内増殖能 (図2): A105株、A141株は、Hela細胞に感染し、細胞内で増殖を示すことが明らかとなった。特に、12hpi以降、増殖が顕著になるが、20ないし24hpiでは増殖曲線に鈍化が認められた。

#### D. 考察

今年度は、国内繁殖の無尾類 (ベルツノガエル) 3 個体から、新たにそれぞれ1株、計3株が分離され、特異的PCRによりブルセラ属菌と判定された。しかしながら、*omp2-ca* タイプの

配列を検出するプライマーでの反応性が非常に弱く、昨年度の2株とは異なる遺伝子背景を持つ、新菌種である可能性が示唆された。

これら、計5株について、生化学的性状を検討したところ、これまで知られている他のブルセラ属菌よりも、遺伝的に最もブルセラ属菌と近縁であると考えられている *Ochrobactrum* 属菌に近い性状を示した。さらに、昨年度の2株と今年度の3株はその性状に差が認められた。

また、薬剤感受性については、概ね既知のブルセラ属菌と似ているが、ブルセラ症の治療に用いられる薬剤に対する感受性が、やや劣っていた。今回はディスク法による検討であったが、E-test など、さらに詳細に検討する必要がある。

分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であることから、ヒト培養細胞への感染性と細胞内増殖能を検討したところ、*B. abortus* や *B. suis* と同様に、顕著な感染・増殖能を示した。ヒトに対する病原性が家畜由来ブルセラ属菌 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*) より劣る *B. canis* ではヒト培養細胞での感染・増殖とも非常に弱いことを考えると、無尾類由来ブルセラ属菌は、ヒトに明確な病原性を持つ公衆衛生学的にも注意が必要な菌である可能性がある。

今後さらにその病原性について、病原性遺伝子や感染実験により明らかにしていく必要があると考えられる。

#### E. 結論

本研究において、3種の無尾類から

の分離株 5 株は、いずれも新規のブルセラ属菌であった。

分離株はいずれも、ヒトに感染しうる *B. inopinata* にブルセラ属菌中で最近縁であり、ヒト培養細胞に感染・増殖能を示した。未だ無尾類由来のブルセラ属菌によるヒト症例の報告はないものの、飼育者への感染も起こりえるのではないかと懸念される。公衆衛生学的リスクを明らかにするためにも、病原性遺伝子の検出や、他のブルセラ属菌との遺伝的関係を詳細に検討することが必要であると思われる。

#### \*参考文献

1. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 46, 43-9.
2. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M. 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 78, 3753-5.
3. Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kämpfer P, Scholz HC, Lierz M. 2012. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J Zoo Wildl Med.* 43, 625-8.
4. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 20, 7-34.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表等

### 1. 論文発表等

(1) 水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳子, 松村藍, 山本智美, 木村昌伸, 今岡浩一. 東京都における犬の抗 *Brucella canis* 抗体保有状況. *日本獣医師会雑誌*, 67(3):204-207, 2014

(2) 佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 莊子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一. *Brucella melitensis* による椎間板炎の一例. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 35(7): 182-183, 2014

(3) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症—特集・人獣共通感染症の新しい知見. in: 臨床と微生物, 近代出版, 42(1): 27-32, 2015

### 2. 学会発表等

(1) 今岡浩一. 動物由来感染症について. 平成26年度全国動物関係事業所協議会関東甲信越静ブロック会研修会, 千葉, 2014

(2) 木村昌伸, 宇根有美, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 札幌, 2014

(3) 今岡浩一. 身近な愛玩動物から感染する動物由来感染症について. 平成26年度動物由来感染症研修会(栃木県), 宇都宮, 2014

(4) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無

尾類（カエル）に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 第13回(爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会)ワークショップ, 相模原, 2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



表 1 : ブルセラ属菌と主なホスト

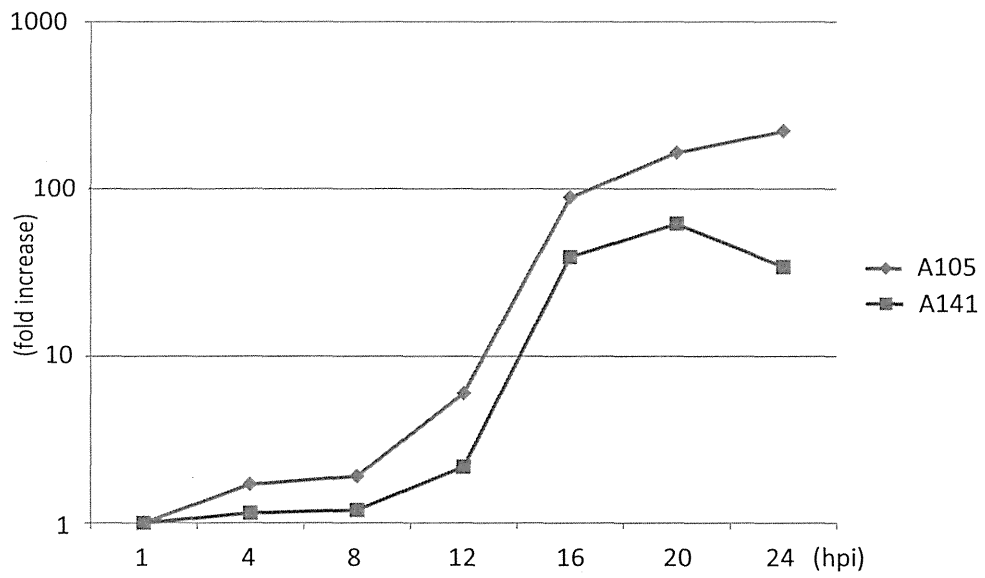
Brucella sp.	Main Host	
<i>B. melitensis</i>	caprine, ovine	
<i>B. abortus</i>	Bovine	
<i>B. suis</i>	porcine, wild boar, hare, caribou, reindeer	Classic Brucella
<i>B. canis</i>	canine	
<i>B. ovis</i>	ovine	
<i>B. neotomae</i>	desert wood rat ( <i>Neotoma lepida</i> )	
<i>B. pinnipedialis</i>	Seal	Marine Brucella
<i>B. ceti</i>	Dolphin, Porpoise, Whale	
<i>B. microti</i>	common vole ( <i>Microtus arvalis</i> )	
<i>B. inopinata</i>	unknown	Novel Brucella
NVSL 07-0026	baboon ( <i>Papio</i> sp.)	
F965	Red fox ( <i>Vulpes vulpes</i> )	

表 2 : 生化学的性状

Test	Anuran isolate					O. anthropi	O. intermedium	B. melitensis	B. suis	B. canis	B. neotomae
	A105	A141	A7h	A9h	A10h	ATCC49187	AQZ08	16M	1330	QE13	ATCC23459
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	- (+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amygdalin fermentation	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Esculin in hydrolysis	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Urea hydrolysis	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Arginin dihydrolase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Beta-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Acid produced from:											
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



図 2 : Hela 細胞における菌の増殖



近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究

－バルトネラ感染症の疫学－

研究分担者 丸山 総一 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨：青森県，山形県および和歌山県で捕獲した野生のニホンザル 45 頭のうち，6 頭（13.3%）から塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* が分離された。ニホンザルの血中菌数は 50～37,000CFU/ml と，高い菌血症状態を呈する個体が認められたが，いずれの個体も無症状であった。*gltA*，*rpoB* および ITS 領域において，検討した全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示し，中国のアカゲザル由来株と近縁な *B. quintana* であることが明らかとなった。また，MLST 法によって分離株を遺伝子解析した結果，ヒトおよびサルの種類ごとに独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布すること，わが国のニホンザルには固有の *B. quintana* が広く存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

*Bartonella quintana* は塹壕熱の原因菌で，ヒトに発熱，心内膜炎，細菌性血管腫症などを引き起こすことが知られている。本菌はヒトが唯一の自然宿主であると考えられていたが，近年，米国に輸入されたアジア産の飼育カニクイザルと中国の飼育アカゲザルから，それぞれ *B. quintana* が分離されたことから，サルも本菌の自然宿主である可能性が示唆された。

昨年度の研究から，野生のニホンザルも *B. quintana* を保菌していることが明らかとなった。本年度は，青森・山形・和歌山県に棲息するニホンザルを対象として，*B. quintana* の保有状況を検討するとともに，ヒト分離株とサル分離株の遺伝子性状を比較し，サルが *B. quintana* の自然宿主である

可能性について検討した。

B. 研究方法

2011年～2014年の間に，青森県，山形県，和歌山県で捕獲された野生ニホンザルそれぞれ 25 頭，5 頭，15 頭から血液を採取した。サルの血液 100 $\mu$ l を 5% 兔血液加チョコレート寒天培地に塗抹し，35 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 下で 1 カ月間培養した。培地上に発育した *Bartonella* を疑うコロニー数から血中菌数を測定した。分離株は，コロニー形態，発育日数ならびにグラム染色性（陰性）から *Bartonella* 属菌と推定した。*Bartonella* 属菌を保有していた各個体から無作為に 5 株を選択し，2 つのハウスキーピング遺伝子領域（*gltA* および *rpoB*）と 16S-23S rRNA 遺伝子間領域（ITS）の塩基配列に基づいて分離株の菌種を同定した。さらに，菌種同定

された3株から代表の1株を選択し、9つのハウスキーピング遺伝子領域 (*atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groE*, *nlpD*, *ribE*, *rpoB*) を用いた Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法によって得られた配列から遺伝子型 (Sequence Type : ST) を決定した。さらに、ニホンザル分離株 (4株) と既報のアカゲザル (37株), カニクイザル (16株) およびヒト分離株 (16株) の塩基配列から、各 ST タイプの9遺伝子領域の連結塩基配列に基づく系統解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

研究対象のニホンザルは、全て管理捕獲された個体であり、捕獲した個体は適切な麻酔下のもと、安楽殺した後に血液を採取した。

#### C. 研究結果

検討したニホンザルの13.3% (6/45) から *B. quintana* が分離された。各県のサルの陽性率は、青森県が4.0% (1/25頭), 山形県が20.0% (1/5頭), 和歌山県が26.7% (4/15頭) であった。血中菌数は50~37,000CFU/ml と、非常に高値を示す個体も認められた (表1)。

*gltA*, *rpoB* ならびに ITS 領域の塩基配列を解析した結果、全てのニホンザル分離株は同一の遺伝子性状を示したとともに、中国の飼育アカゲザルを由来とする *B. quintana* RM-11 株と同一であるか非常に高い相同性 (99.5~100%) を示した (表2)。

*B. quintana* 陽性の6個体から代表の1株を選抜し MLST 法を試みた結果、いずれの株も新規の ST22 に型別された。連結塩基配列に基づく系統解析では、ニホンザル、ア

カゲザル, カニクイザルおよびヒト分離株はそれぞれ独立した4つのクラスターを形成した (図1)。

#### D. 考察

青森県, 山形県および和歌山県に棲息する野生のニホンザルは *B. quintana* を保菌していることが初めて明らかとなった。さらに、3頭の *B. quintana* 陽性のニホンザルの血中菌数はそれぞれ 6,000, 12,000, 37,000CFU/ml と、高い菌血症状態であった。また、ニホンザル分離株はヒト由来の *B. quintana* Fuller<sup>T</sup> 株に比べ、アカゲザル由来の *B. quintana* RM-11 株とより近縁な株であることも明らかとなった。以上の結果から、サルはヒト分離株と異なる遺伝子性状の *B. quintana* を保有するとともに、本菌の自然宿主である可能性が示された。

MLST 法を用いて、ニホンザル分離株の ST を決定したところ、検討した6株は同一の ST22 型であることが明らかとなった。さらに、MLST 法に基づいて系統解析したところ、ST1~22 は4つの独立したクラスターを形成し、それぞれ分離されたヒトあるいはサルの種類ごとに ST が分類された。今回、ニホンザルから分離された *B. quintana* 株は新規の ST であり、また系統解析でもニホンザル独自のクラスターを形成したことから、ヒトおよびサルの種ごとに固有の遺伝子性状を有する *B. quintana* を保有している可能性が示唆された。さらに、青森・山形・和歌山県のニホンザルは、アカゲザルやカニクイザルとは異なる ST の *B. quintana* 株を保有していたことから、わが国ではニホンザル固有の *B. quintana* がサル集団内に

分布している可能性が考えられた。本研究のニホンザルの採材地域は3県に限定されていたことから、今後、より広範な地域のニホンザルにおける *B. quintana* の分布状況を検討するとともに、分離株の遺伝子性状を詳細に解析していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

青森県、山形県および和歌山県のニホンザルは塹壕熱の病原体である *B. quintana* を保有していることが初めて明らかとなった。*B. quintana* を保有していたニホンザルは高い菌血症状態であったにもかかわらず、無症状であったことから、本菌の自然宿主である可能性が示唆された。

#### N. 健康危険情報

今後、わが国でその生息数がさらに増加し、有害鳥獣駆除事業や管理捕獲でヒトとの接触が増加すると考えられるニホンザルを原因とする *B. quintana* の感染にも注意を払う必要があると思われる。

#### O. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1)

Pangjai, M., Maruyama, S., Boonmar, S., Kabeya, H., Sato, S., Nimsuphan, B., Petkanchanapong, W., Wootta, W., Wangroongsarb, P., Boonyareth, M., Preedakoon, P., Saisongkorh, W., and Sawanpanyalert, P. 2014. Prevalence of zoonotic *Bartonella* species among rodents and shrews in Thailand. *Comp.*

*Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37(2): 109-114.

##### 2) 丸山総一：猫ひっかき病，公衆衛生情報 Vol. 44/No. 3: 22-23. (2014)

#### 2. 学会発表

##### 1) 佐藤真伍，武野侍那子，壁谷英則，大橋正孝，大竹正剛，丸山総一．わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討．第22回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー（大分県太宰府館まほろばホール，2014年7月6日）

##### 2) 佐藤真伍，壁谷英則，吉野愛香，関根 渉，鈴木和男，東 英生，櫛引道彦，山崎翔気，玉手英利，丸山総一．わが国の野生ニホンザルに分布する *Bartonella quintana* とその遺伝的多様性．第157回日本獣医学会学術集会（北海道大学，2014年9月9日）

#### P. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1. *Bartonella* 属菌を保有していたニホンザルとその血中菌数

捕獲地域	検体数	陽性数 (%)	検体番号	血中菌数 (CFU/ml)
青森県	25	1 (4.0)	MF34	$3.7 \times 10^4$
山形県	5	1 (5.0)	MF19	$2.4 \times 10^2$
和歌山県	15	4(26.7)	MF1	$3.4 \times 10^2$
			MF3	$5.0 \times 10^1$
			MF10	$1.2 \times 10^4$
			MF11	$6.0 \times 10^3$

表 2. ニホンザル分離株と *B. quintana* Fuller<sup>T</sup> 株および RM-11 株の *gltA*, *rpoB* および ITS 領域における塩基配列の相同性

ニホンザル分離株*	<i>B. quintana</i> Fuller <sup>T</sup> 株 (ヒト由来)			<i>B. quintana</i> RM-11 株 (飼育アカゲザル由来)		
	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS	<i>gltA</i>	<i>rpoB</i>	ITS
MF1.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF3.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF10.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF11.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF19.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5
MF34.1	98.7	99.6	98.4	100	100	99.5

\* 同一個体のニホンザルから選択した 5 株は、3 領域において同一の遺伝子配列であった。

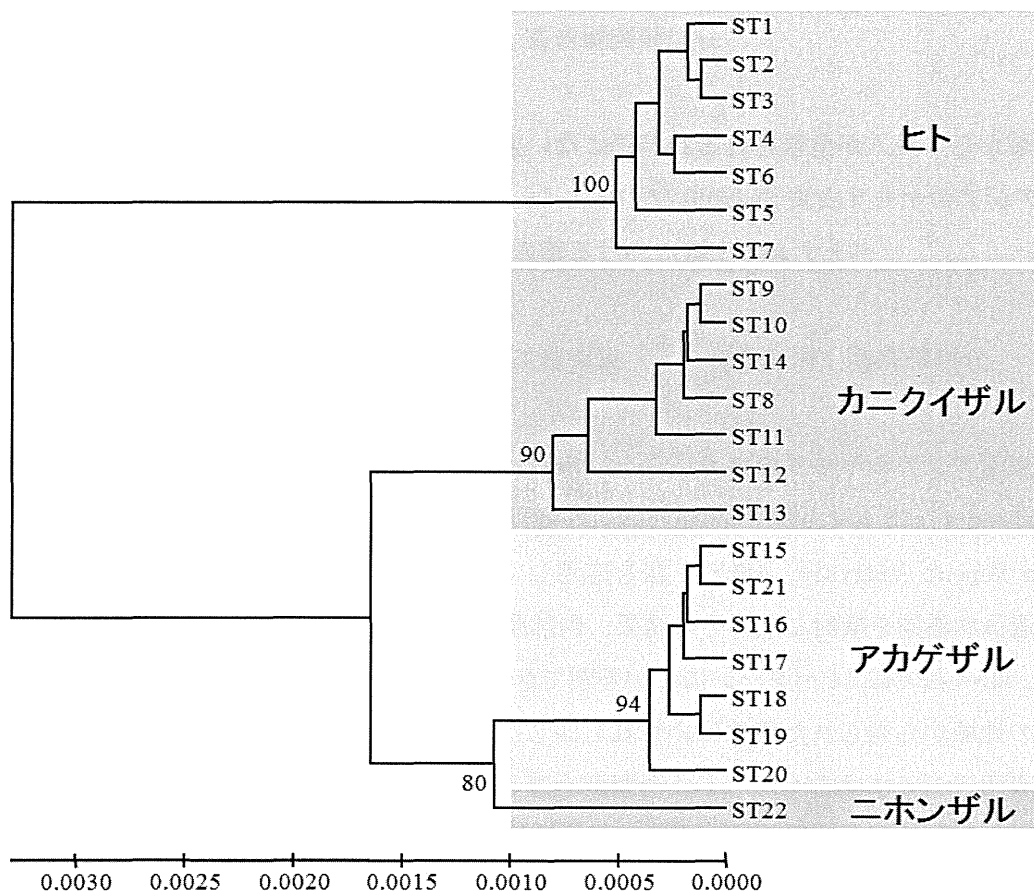


図 1. MLST 法に用いた 9 遺伝子領域の連結配列に基づく系統解析

MLST 法に用いた 9 つのハウスキーピング遺伝子領域の塩基配列を ST ごとに連結させ、UPGMA, Kimura 2-parameter モデルを用いて系統解析を行った。ST1~7, ST8~14, ST15~21, ST22 の 4 つのクラスターに分類され、それぞれヒト分離株, カニクイザル分離株, アカゲザル分離株, ニホンザル分離株によって構成された。



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

近隣地域からの侵入が危惧されるわが国にない感染症の発生予防に関する研究  
東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden の遺伝的関連性ならびに  
ベトナムの土壌における類鼻疽菌の分布

分担研究者 林谷秀樹 東京農工大学大学院・准教授

**研究要旨：**東南アジアのヤモリ由来 *Salmonella* Weltevreden 81 株について、分子遺伝子型別法である Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法ならびに Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 法を応用して、分子遺伝子型別を行ない、各地域での菌株間の遺伝的異同を検討した。その結果、供試菌 81 株は、PFGE 法では 22 パターンに型別されたが、MLVA 法では 14 パターンにしか型別できなかった。また、また、系統図解析から、それぞれの地域から得られた菌株はいずれも同じクラスターに分類されることが判明したことから、東南アジアには古くから本血清型が土着しており、やがて地域ごとに遺伝的に多様なものへ分化していったことを示していると考えられる。また、東南アジアの環境に広く分布し、人獣共通感染症の原因菌の一つとして知られ、近年、海外感染症として我が国に持ち込まれる事例が報告されている類鼻疽 (Meloidosis) について、ベトナム・メコンデルタの土壌から原因菌である類鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) の分離を試みた。その結果、増菌法を併用することで 40 検体中 3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌は分離され、本地域に類鼻疽菌が分布することが明らかになった。

#### A. 研究目的

東南アジアに広く分布し、これらの地域の人のサルモネラ感染症の大きな割合を占めており、近年、我が国の沖縄県に侵入し、その定着・拡大が問題となっている *Salmonella* Weltevreden について、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法ならびに昨年度の研究で開発した Multiple-Locus Variable Number Tandem

Repeat Analysis (MLVA) 法を応用して、分子遺伝子型別を行ない、各地域での菌株間の遺伝的異同を検討した。

また、日本に侵入・定着が危惧される類鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) について、昨年度は検出されなかったため、本年度は増菌法を併用し、ベトナム・メコンデルタの土壌から本菌の分離を試みた。

#### B. 材料と方法

## 1. 東南アジアのヤモリ由来 *S. weltevreden* の MLVA ならびに PFGE による遺伝子型別

### 1) 供試菌株

供試菌株として、ベトナム・メコンデルタ 1 市 2 省 (Can Tho 市、Ca Mau 省および Kien Giang 省) 由来 25 株、ベトナム・フエ由来 19 株、カンボジア・シエムリアップ由来 16 株、タイ由来株 16 株、沖縄県由来 2 株のヤモリ由来株計 78 株と、ベトナム・メコンデルタ (Can Tho 市) で分離されたヒトの胃腸炎患者由来株 3 株を加えた計 81 株の *S. Weltevreden* を用いた。

## 2) 染色体 DNA の PFGE 法による解析

### (1) 菌液の調整

供試菌株は trypticase soy agar (TSA) 平板寒天培地 (BBL) に塗抹し、37°C で 24 時間培養した。そして、培地上に発育したコロニーを Cell Suspension Buffer に接種、懸濁し、分光光度計の波長 610nm で吸光度が 0.145~0.155 になるように濃度を調整した。

### (2) DNA 包埋アガロースプラグの作製

アガロースプラグの作製は、Plug mold (Bio-Rad) を用いて行った。滅菌した 1.5ml のマイクロチューブ (TreffLab) に、Proteinase K solution (20mg/ml) を 10 $\mu$ l 入れ、濃度調整した菌液 200 $\mu$ l を加え、ピペットで良く混和した。TE Buffer に、それぞれ 1% となるように SDS solution と Agarose NA (GE Healthcare Bio-Sciences) を加えて作製したプラグ作

製用アガロースを、上記のマイクロチューブに 200 $\mu$ l ずつ分注し、ピペットで均一になるように混和した。この混合液を Plug mold に注ぎ入れ、固化させた。中試験管に Proteinase K solution (Wako) を 20 $\mu$ l と RIPA Buffer (Wako) を 4ml 入れ、それぞれの中試験管に 1 つずつ Plug を移し入れ、54°C に設定した恒温槽に入れ、振盪しながら 2 時間反応させた。反応後、溶菌バッファーをすべて除去し、50°C の滅菌蒸留水 5ml を中試験管に入れ、50°C の恒温槽で 15 分間攪拌した。同量の滅菌蒸留水と入れ替え、50°C で 15 分間再度攪拌した。同様の処理を、滅菌蒸留水でもう一度行い、その後、TE Buffer と入れ替え同じ処理を計 3 回行った。攪拌終了後、プラグを取り出し、2ml の TE Buffer が入った、2ml の滅菌マイクロチューブに移し、4°C で保存した。

### (3) 制限酵素処理による染色体 DNA の消化

溶菌処理後のアガロースプラグを 2mm 幅に切断し、プラグ断片を 1 $\times$ M Buffer (SuRe/Cut Buffer H, Roche) を 200 $\mu$ l 添加した 1.5ml マイクロチューブに入れ、37°C で 15 分静置した。M Buffer を除去し、*Xba*I (TaKaRa) を 25U、BSA を 0.01% になるよう加えた 1 $\times$ M Buffer 200 $\mu$ l を新たに添加し、37°C で 2 時間反応させた。酵素処理終了後、M Buffer を除去し、0.5 $\times$ TBE (Bio-Rad) を各チューブに添加し、10 分間静置し、プラグを洗浄した。

#### (4) 電気泳動

プラグ断片をコームに乗せ、1%Agarose NA でコームに固定させた。コームをキャスティングスタンドに設置し、1% Agarose NA を注ぎ入れ、冷え固まるまで静置し、コームを取り除き、コームによってできたウェルを1%Agarose NA で埋めた。パルスフィールドゲル電気泳動は泳動装置に CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems(Bio-Rad) を使用し、14°C、6V/cm、開始スイッチングタイム 2.2 秒、最終スイッチングタイム 63.8 秒で 19 時間電気泳動を行った。なお、分子マーカーとしては、*Salmonella* Braenderup を用いた。ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色し、UV を照射して撮影後、得られたバンドパターンの解析を行った。なお、PFGE パターンの解析にあたり、Tenover らの提言に従い、検出されたバンドパターンが 1 つまたは 2 つか変わらないものは同じ PFGE パターンと判断し、PFGE パターンの整理を行った。

#### (5) 系統樹解析

供試したヤモリ由来株 78 株とヒトの胃腸炎患者由来株 3 株の計 81 株の PFGE パターンから、Phoretix™ 1D (Nonlinear Dynamics) を用いて、非加重結合法 (UPGMA 法) により系統樹の作製、解析を行い、その遺伝的関連性を検討した。

### 3) 染色体 DNA の MLVA 法による解析

#### (1) TR 領域の選択

使用する TR 領域は、過去に *Salmonella*

*enterica* の MLVA で用いられた領域のうち、昨年度の研究で使用し差異が見られた 2 領域 Sal16 および SE-4 と、使用しなかった領域の中から 2 領域 STTR3 および STTR7 を選択し、使用した。

#### (2) DNA の抽出

供試菌株からの DNA 抽出は、ボイル法を用いて行った。まず、供試菌株を TSA (BBL) に接種し、37°C で 24 時間培養後、その 1 白金耳を、PBS 2ml へ懸濁し、10 分間煮沸溶菌した。その後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、その遠心上清を 1.5ml のマイクロチューブに移し、99.5%エタノールを加え、よく混合後、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、遠心上清を捨てた後、風乾させた。精製した DNA は、TE バッファーで適切な濃度になるように溶解し、テンプレート DNA とした。

#### (3) PCR による遺伝子の増幅

PCR 反応液は、200µl の PCR チューブ (Bio-Rad) に、TaKaRa Ex Taq(5units/µl) (TaKaRa) を 0.25µl、10×Ex Taq Buffer を 5µl、dNTP Mixture(2.5mM each) を 4µl、滅菌精製水を 33.75µl、50µM のフォワードおよびリバースプライマーを各 1µl ならびにテンプレート DNA を 5µl 入れ、良く混和し、総量を 50µl とした。スピンドウンした後、サーマルサイクラー (Bio-Rad) にセットし、PCR を行った。なお、PCR の反応条件はそれぞれの定法に従った。

#### (4) PCR 産物の精製

PCR 産物に滅菌精製水を加え 100µl に

メスアップし、5M NaCl 6μl およびイソプロパノール 100μl を加え、15,000rpm で10分間遠心分離した。遠心上清を除去し、70%エタノールを 50μl 加え、再び15,000rpm で3分間遠心分離し、遠心上清を除去し、風乾させた。完全に乾いた後、滅菌蒸留水 15μl を加えた。

#### (5) DNA シーケンシング

精製した PCR 産物の濃度を NanoDrop Lite (Thermo scientific)を用いて測定し、DNA が適量となるように PCR 用 96 穴プレートに入れた。それぞれの DNA 領域に対応するプライマーを 9.6pmol 加え、滅菌精製水で 21μl になるまでメスアップした。DNA シーケンシングはユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

#### (6) シーケンスデータの解析

得られた配列データは、遺伝子解析ソフトウェア FinchTV (geospiza) を用いて解析し、菌株ごとに TR 反復数をまとめた。

### 2. ベトナムならびに沖縄の土壌からの類鼻疽菌の分離

#### 1) 供試検体

供試検体として、2014 年月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 40 検体を用いた。

#### 2) 類鼻疽菌の分離・同定

供試検体10 g を、5倍量の選択増菌培地(1L 当たりトリプチケースソイブロス(Difco) 10g、グリセロール 40ml 0.1%クリスタルバイオレット 5ml、コリシン 15000U) に入れ、37°C24時間培養後、その上清を

Ashdown's Medium寒天培地に接種し、37°Cで48時間培養した。培養後、培地上に発育してきた類鼻疽菌が疑われるコロニーを釣菌し、純培養後、生化学的検査を行い、類鼻疽菌を同定した。

### C. 研究結果

#### 1. PFGE法による染色体DNAの解析結果

今回供試した *S.Weltevreden*81 株は、制限酵素 *XbaI*を用いた PFGE 法により、F1~F22 の 22 の PFGE パターンに型別された。供試菌株のパターン別の内訳は、F12 および F15 にそれぞれ 16 株ずつ、パターン F1 および F17 にそれぞれ 12 株ずつ、パターン F5 に 4 株、パターン F14 に 3 株、パターン F10 および F16 に 2 株ずつ、パターン F2、F3、F4、F6、F7、F8、F9、F11、F13、F18、F19、F20、F21 および F22 にそれぞれ 1 株ずつであった。また、各 PFGE パターンと分離された地域との関係をみると、F1 および F14 以外の 20 パターンの菌株は、それぞれ単一の地域で分離されたものであった。F1 および F14 についても、分離された地域は同じベトナム国内であり、比較的近い距離にあった。また、地域別に分離されたパターン数をみると、メコンデルタでは 13 パターンと最も多く、2 番目に多かったタイでは 5 パターンであった。

#### 2. 系統樹解析