

病原性遺伝子として、gipA、sodC1、sopE1、sseC、gtgB、sspH1、spvC、pipA、ssrB および pefA の 10 種の遺伝子を対象にした。

### 3) 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 trypticase soy 寒天培地 (TSA,BBL) に接種し、37°C で 24 時間培養後、その 1 白金耳を、滅菌蒸留水 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 による病原遺伝子の増幅

200  $\mu$  の PCR チューブ (Bio-Rad) に、TaKaRa Ex Taq(5units/ $\mu$ ) (TaKaRa) を 0.25  $\mu$ 、10  $\times$  Ex Taq Buffer を 5  $\mu$ 、dNTP Mixture(2.5mM each) を 4  $\mu$ 、滅菌精製水を 33.75  $\mu$ 、50  $\mu$ M のフォワードおよびリバースプライマーを各 1  $\mu$  ならびにテンプレート DNA を 5  $\mu$  入れ、良く混和し、総量を 50  $\mu$  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プライマーの条件に従った。PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターで観察した。

## 2.ベトナム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、2015 年 7~9 月にベトナム・メコンデルタで採取した水田の表土 200 検体を用いた。

### 2) 類鼻疽菌の分離・同定

#### (1) 培養法

供試検体 10g 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ド 5ml、コリシン 15000U) に入れ、37°C 24 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。(2) PCR 法

2)-(1) の増菌培地 2ml をマイクロチューブに移し、10,000rpm で 10 分間遠心分離後、上清を捨て、滅菌蒸留水 2ml へ加えて、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。PCR は、Ho らの方法に従って行った。

## C. 研究結果

### 1. 病原遺伝子の検出結果

今回供試した *S.Weltevreden* 21 株における 10 種の病原遺伝子の保有状況は、gtgB、sspH1、pipA および ssrB はいずれも 100%、

gipA および sodC1 はそれぞれ 95.2%、sseC は 42.9%、sopE1 は 4.8%ならびに spvC は 0%であった。病原遺伝子の保有状況の組み合わせにより、供試した 21 菌株は 5 パターンに型別された。また、sopE1 遺伝子は 1 菌株からのみ検出されたが、この菌株は沖縄由来株であった。

## 2.ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離結果

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 200 検体について、増菌法と PCR 法を併用して *Burkholderia* 属菌の分離を行ったところ、*Burkholderia* 属菌は 26 検体(13.0%)から検出された。分離された *Burkholderia* 属菌はいずれも類鼻疽菌であった。また、PCR 法でも増菌培養法で菌が検出されたものと同じ 26 検体(13.0%)から類鼻疽菌が検出された。

## D.考察

### 1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* の病原遺伝子の検出

東南アジアでは、*S.Weltevreden* が人のサルモネラ感染患者から分離される最も重要な血清型であり、ヤモリが本血清型を高率に保菌し、自然界における重要なレゼルボアであることが報告されている。昨年の研究で、供試した *S.Weltevreden* は 21 の PFGE パターンと 13 の MIVA パターンに型別されたが、本年度の研究により病原遺伝子の保有状態により5つのパターンに型別された。また、sopE1 遺伝子はこれまで *S.Weltevreden* から検出されたことがなかったが、本研究で沖縄のヤモリ由来株からのみ検出された。病原性遺伝子の保有の有無による菌株の型別法は、PFGE や MLVA に比

べ、菌株型別能力は低い、手技が簡便なため、菌株の遺伝子型別に使用できる可能性が示された。今後さらに病原遺伝子の種類を増やして、*S.Weltevreden* における保有状況を検討し、遺伝子型別への応用を試みたい。

また、本研究でこれまで *S.Weltevreden* から検出されたことのない sopE1 遺伝子が日本の沖縄からのみ検出されたことから、今後本血清型菌の我が国への侵入を検討する際、本病原遺伝子の有無がその指標になる可能性があり、今後、さらに菌株を増やし検討をしていきたい。

### 2.ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

今回、昨年度に引き続き、我が国で発生する類鼻疽の海外での感染国として報告の多いベトナムの水田の土を採取し、増菌培養法ならびに PCR 法を用いて類鼻疽菌の分離を試みた。その結果、類鼻疽菌は 200 検体中 26 検体(13.0%)から分離された。また、土壌から分離された *Burkholderia* 属菌はすべて類鼻疽菌であった。また、類鼻疽菌特異的な遺伝子を標的とした PCR 法でも増菌培養法で類鼻疽菌が検出された検体がいずれも陽性になった。これらのことから、ベトナム・メコンデルタには類鼻疽菌が広く分布していることが判明した。我が国では、2010 年に 2 例、2011 年に 3 例、2013 年に 4 例、2015 年に 1 例と、近年、類鼻疽が頻発しており、その多くが東南アジア、特にベトナムでの感染例である。また、最近の研究で類鼻疽の分布はこれまで考えられていたよりもずっと広範囲に分布し、その感染事例も報告されているよりもっと多数に上ることが報告され

た。今後、本菌の分布や予防法などについて、より詳細に検討し、本菌の我が国への侵入を防ぐ手立てを考えていく必要がある。

なし

#### E. 結論

1. 東南アジアのヤモリ由来 *S.weltevreden* 21 株における 10 種類の病原遺伝子の保有状況を PCR 法により調べたところ、最も高い遺伝子(4 種)では 100%、低い遺伝子(1 種)では 0%であった。供試した 21 菌株は、遺伝子保有の有無で 5 パターンに型別された。これまで *S.weltevreden* から検出されたことのない *sopE1* 遺伝子が、沖縄由来株からのみ検出された。
2. ベトナム・メコンデルタの土壌から、増菌培養法ならびに PCR 法で、200 検体中 26 検体(13.0%)から類鼻疽菌が検出された。

#### F 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lubick KJ, Robertson SJ, McNally KL, Freedman BA, Rasmussen AL, Taylor RT, Walts AD, Tsuruda S, Sakai M, Ishizuka I, Boer EF, Foster EC, Chiramel AI, Addison CB, Green R, Kastner DL, Katze MG, Holland SM, Forlino A, Freeman AF, Boehm M, Yoshii K, Best SM	Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 maturation and expression	Cell Host Microbe	18	61-74	2015
Muto M, Bazartseren B, Tsevel B, Dashzevge E, Yoshii K, Kariwa H	Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from Ixodes persulcatus in Mongolia in 2012.	Ticks and tick-borne diseases	6	623-629	2015
Sakai M, Muto M, Hirano M, Kariwa H, Yoshii K	Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR.	Virus Res	203	36-40	2015
Yoshii K, Okamoto N, Nakao R, Hofstetter RK, Yabu T, Masumoto H, Someya A, Kariwa H, Maeda A	Isolation of the Thogoto virus from a Haemaphysalis longicornis in Kyoto city, Japan.	J Gen Virol	96	2099-2103	2015
Shimada S, Posadas-Herrera G, Aoki K, Morita K, Hayasaka D	Therapeutic effect of post-exposure treatment with antiserum on severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in a mouse model of SFTS virus infection.	Virology	482	19-27	2015
Yu F, Du Y, Huang X, Ma H, Xu B, Adungo F, Hayasaka D, Buerano CC, Morita K	Application of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for the detection of SFTSV-specific human IgG and IgM antibodies by indirect ELISA.	Virol J	12	117	2015
Hayasaka D, Shimada S, Aoki K, Takamatsu Y, Uchida L, Horio M, Fuxun Y, Morita K	Epidemiological survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in ticks in Nagasaki, Japan.	Trop Med Health	43	159-164	2015
Hayasaka D, Yu F, Yoshikawa A, Posadas-Herrera G, Shimada S, Tun MM, Agoh M, Morita K	Seroepidemiological evidence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infections in wild boars in Nagasaki, Japan.	Trop Med Health			accepted
Shimada S, Aoki K, Nabeshima T, Yu F, Kurosaki Y, Shioyama K, Onouchi T, Sakaguchi M, Fuchigami T, Ono H, Nishi K, Posadas-Herrera G, Uchida L, Takamatsu Y, Yasuda J, Tsutsumi Y, Fujita H, Morita K, Hayasaka D	Tofla virus: A newly identified Nairovirus of the Crimean-Congo hemorrhagic fever group isolated from ticks in Japan.	Sci Rep			accepted
早坂大輔	マダニ媒介ウイルス感染症	科学療法の領域	31	48-54	2015
早坂大輔、余福勲、森田公一	重症熱性血小板症候群の診断	科学療法の領域	増刊号	175-182	2015
Sato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., Maruyama, S.	Japanese Macaques ( <i>Macaca fuscata</i> ) as Natural Reservoir of <i>Bartonella quintana</i> .	Emerg. Infect. Dis.	21	2168-2170	2015
Kim, K. S., Inoue, K., Kabeya, H., Sato, S., Takada, T., Pangjai, D., Chiu, S. H., Fujita, H., Kawabata, H., Takada, N., Kariwa, H., and Maruyama, S.	Prevalence and diversity of <i>Bartonella</i> species in wild small mammals in Asia.	J. Wildl. Dis.	52	10-21	2016
井上智	狂犬病. 特集: 感染症の新たな脅威.	J. Pub. Heal. Prac.	79	467-472	2015
濱本紀子、井上智	狂犬病とその対策	山口獣医学雑誌	41	1-12	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi, Y., Imaoka, K., Kataoka, M., Uda, A., Nakatsu, D., Horii-Okazaki, S., Kunishige, R., Kano, F. and Murata, M.	Yip1A, a novel host factor for the activation of the IRE1 pathway of the unfolded protein response during Brucella infection.	PLoS Pathog.	11	e1004747	2015
Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H.	The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia.	J Neuropathol Exp Neurol.	74	250-260.	2015

