

牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium に関する分子疫学的研究

玉村雪乃

Molecular epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle.

Yukino TAMAMURA

牛サルモネラ症は様々な血清型のサルモネラに起因する感染症であり、発症牛は下痢、肺炎、重症例では敗血症を呈し死亡する。北海道においては、以前は子牛を中心として発生が認められていたが、近年では成牛、特に搾乳牛における発生が多く、酪農現場で問題となっている。搾乳牛のサルモネラ症増加の一因として飼養環境の変化が挙げられているが、一方で分離される菌株の性状に変化があることも報告されており、分離菌株の詳細な解析が必要と考えられる。本研究では、北海道で分離された牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium の遺伝学的性状とその変遷を明らかにすることを目的として、過去 33 年間に渡って分離された菌株について分子疫学的手法を用いて解析した。さらに、一発生事例の疫学的調査を遺伝子型等の分子疫学的解析結果を集積したデータベースを用いて実施し、その有用性について検証した。加えて、近年分離された主な流行型株が産生する毒素の性状や、薬剤耐性因子に関する解析を実施した。

第 I 章では、北海道内で 1977 年から 2009 年の間に分離されたサルモネラ症発症牛由来 *S. Typhimurium* 545 株に関して、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) および Multi-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) により型別した。PFGE により、545 株は 116 種類の PFGE プロファイルを示し、9 つの遺伝子型に分類された。全株の内 248 株が PFGE I 型に、165 株が PFGE VII 型に分類され、2 つの優勢な遺伝子型が存在することが示された。さらに、MLVA により各 PFGE 型の代表株 116 株について解析した結果、4 つの MLVA クラスタ (A ~ D) が形成され、MLVA クラ

スター A は PFGE I 型、MLVA クラスタ C は PFGE VII 型で構成された。PFGE I 型および VII 型は、異なる型別手法を用いてもそれぞれ同じグループに分類されることから、それぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されていることが示唆された。I 型の多くは 1992 年から 2004 年の間に分離されており、VII 型は全て 2000 年以降に分離されていた。I 型には、1990 年代に世界的に流行した多剤耐性ファージ型 DT104 が含まれていた。VII 型は、多くの株が多剤耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有していた。さらに、VII 型のうち 1 株が第 3 世代セファロsporin であるセフォタキシムに耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドの他に CMY-2 型 β ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{CMY-2} を含むプラスミドを保有していた。以上のことから、1992 年以降 DT104 を含む I 型菌が増加したが、2004 年以降減少し、それに代わり 2000 年以降に新型の多剤耐性 VII 型菌が出現し、これによるサルモネラ症が増加したことが明らかとなった。

第 II 章では、北海道内道央地域の酪農場において発生した牛サルモネラ症の分子疫学調査を、第 I 章で用いた手法で実施した。2008 年 2 月から 2009 年 2 月まで当該農場の乳用牛の糞便および環境材料を採取し、増菌培養によるサルモネラの検出、分離菌の PFGE、MLVA、ファージ型別による解析を行った。各種材料から 25 株が分離され、そのうち代表的な 9 株を解析した結果、最後に分離された 1 株 (RG08-5 株) を除き全株が同一の PFGE プロファイルおよび類似した MLVA プロファイルを示し、2 種類のクローン由来株による流行が示唆された。RG08-5 以外の株は道内のスズメ由来株と同一あるいは類似した PFGE および MLVA プロファイルを示

しており、ファージ型もスズメ由来株と同様の DT40 であった。以上のことから、当該農場で発生したサルモネラ症の原因菌のうち RG08-5 以外の株は、スズメ由来株と同一であると考えられ、スズメとの接触が感染経路である可能性が示された。2005 年から 2006 年に北海道内各所でスズメの大量死が確認されており、死亡したスズメから *S. Typhimurium* が分離され、DT40 と同定された。また、2008 年から 2009 年にも同様に旭川市周辺でスズメの大量死が認められ、死亡したスズメからは DT40 を含むいくつかのファージ型の *S. Typhimurium* が分離されている。本農場由来株と同一の MLVA プロファイルを示す菌が 2006 年以降道央地域の他の農場においても分離されており、スズメの大量死発生以降、当該タイプの菌が拡散したことが示唆された。

第Ⅲ章では、百日咳毒素様蛋白 ArtA/ArtB (*ArtAB*) を産生することが明らかにされている DT104 を含む I 型菌と、他の PFGE 型における *artAB* 遺伝子保有状況を調べ、その遺伝子産物の性状を解析した。I 型菌の 98% (242/248) および II 型菌の 14% (5/37) が当該遺伝子を保有していたが、その他の PFGE 型菌からは検出されなかった。遺伝子産物である *ArtAB* を複数のカラムクロマトグラフィーを実施することにより精製し、百日咳毒素と同様に A ユニット 1 つと B ユニット 5 つで構成されることを明らかにした。精製した *ArtAB* をマウスの腹腔内に接種すると致死活性が認められ、その LD₅₀ は 0.21 μg/匹であった。また、*ArtAB* は百日咳毒素と同様に、赤血球凝集活性およびインスリン分泌亢進活性を示したが、白血球増多活性が欠如している点が異なっていた。以上のことから、*ArtAB* が *S.*

Typhimurium における新たな病原因子である可能性が示唆された。

第Ⅳ章では、PFGE VII 型菌が保有するプラスミドの構造を解析した。VII 型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミド pYT1, pYT2 の全塩基配列を決定した結果、*S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミドに、アンピシリン、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリン、カナマイシン耐性遺伝子を含む領域が挿入されて構成されていた。pYT2 ではさらに、プラスミド複製や維持に関わる遺伝子を含む領域が挿入されていた。挿入された配列は *S. Dublin* 由来のプラスミド pSD88 と高い相同性を示した。セフトキシム耐性株が保有する *bla*_{CMY-2} プラスミド pYT3 は、大部分が大腸菌由来プラスミド pAR060302 と高い相同性を示し、一部は pYT2 と高い相同性を示した。いずれのプラスミドも伝達性は認められなかったが、以上の結果から、VII 型菌の薬剤獲得機構の一端が明らかとなった。

本研究により、牛サルモネラ症から分離される原因菌の遺伝子型における経年的変遷が確認された。PFGE および MLVA プロファイルを比較することにより、異なる地域や年代で分離された菌株間の比較による新型菌の検出や、感染源、感染経路に関する解析が可能となることが検証された。さらに、近年分離される牛由来 *S. Typhimurium* の病原性関連因子や薬剤耐性因子に関する特徴が明らかとなった。

酪農学園大学獣医学研究科
博士 (獣医学)
平成 27 年 12 月 25 日授与

学术誌掲載欧文論文抄録

目 次

Abe,H., Mine,J., Parchariyanon,S., Takemae,N., Boonpornprasert,P., Ubonyaem,N., Patcharasinghawut,P., Nuansrichay,B., Tanikawa,T., Tsunekuni,R., Saito,T. Co-infection of influenza A viruses of swine contributes to effective shuffling of gene segments in a naturally reared pig Virology. 484, p.203-212 (2015)	96
Akiba,M., Sekizuka,T., Yamashita,A., Kuroda,M., Fujii,Y., Murata,M., Lee,K., Joshua,D.I., Balakrishna, K., Bairy,I., Subramanian,K., Krishnan,P., Munuswamy,N., Sinha,R.K., Iwata,T., Kusumoto,M., Guruge,K.S. Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from rivers and sewage treatment plants in India Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60 (5), p.2972-2980 (2016)	96
Akiba,M., Senba,H., Otagiri,H., Prabhasankar,V.P., Taniyasu,S., Yamashita,N., Lee,K., Yamamoto,T., Tsutsui,T., Joshua,D.I., Balakrishna,K., Bairy,I., Iwata,T., Kusumoto,M., Kannan,K., Guruge,K.S. Impact of wastewater from different sources on the prevalence of antimicrobial-resistant <i>Escherichia coli</i> in sewage treatment plants in South India Ecotoxicology and Environmental Safety. 115, p.203-208 (2015)	96
Athey,T.B.T., Auger,J-P., Teatero,S., Dumesnil,A., Takamatsu,D., Wasserscheid,J., Dewar,K., Gottschalk,M., Fittipaldi,N. Complex population structure and virulence differences among serotype 2 <i>Streptococcus suis</i> strains belonging to sequence type 28 PLoS ONE. 10 (9), e0137760 (2015)	97
Fukai,K., Morioka,K., Yamada,M., Nishi,T., Yoshida,K., Kitano,R., Yamazoe,R., Kanno,T. Comparative performance of fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 and fetal porcine kidney cell line LFBK- α β γ δ ϵ ζ for <i>Foot-and-mouth disease virus</i> isolation Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 27 (4), p.516-521 (2015)	97
Gopurenko,D., Bellis,G.A., Yanase,T., Wardhana,A.H., Thepparat,A., Wang,J., Li,H., Cai,D., Mitchell,A. Integrative taxonomy to investigate species boundaries within <i>Culicoides</i> (Diptera: Ceratopogonidae): a case study using subgenus <i>Avaritia</i> from Australasia and Eastern Asia Veterinaria Italiana. 51 (4), p.345-378 (2015)	97
Hata,E. Complete genome sequence of <i>Mycoplasma arginini</i> strain HAZ 145_1 from bovine mastitic milk in Japan Genome Announcement. 3 (2), e00265-15 (2015)	98
Hayama,Y., Moriguchi,S., Yanase,T., Suzuki,M., Niwa,T., Ikemiyagi,K., Nitta,Y., Yamamoto,T., Kobayashi,S., Murai,K., Tsutsui,T. Epidemiological analysis of bovine ephemeral fever in 2012-2013 in the subtropical islands of Japan BMC Veterinary Research. 12: 47 (2016)	98

- Hirashima,Y., Kato,T., Yamakawa,M., Shirafuji,H., Okano,R., Yanase,T.
Reemergence of Ibaraki disease in southern Japan in 2013
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (10), p.1253-1259 (2015) 98
- Hoa,L.N.M., Bryant,J.E., Choisy,M., Nguyet,L.A., Bao,N.T., Trang,N.H., Chuc,N.T.K., Toan,T.K., Saito,T., Takemae,N., Horby,P., Wertheim,H., Fox,A.
Population susceptibility to a variant swine-origin influenza virus A (H3N2) in Vietnam, 2011-2012
Epidemiology and Infection. 143 (14), p.2959-2964 (2015) 99
- Hofmann,M., Wiethölter,A., Blaha,I., Jöst,H., Heinemann,P., Lehmann,M., Miller,T., Cadar,D., Yanase,T., Kley,N., Eiden,M., Groschup,M., Schmidt-Chanasit,J.
Surveillance of batai virus in bovines from Germany
Clinical and Vaccine Immunology. 22 (6), p.672-673 (2015) 99
- Hosoya,T., Hanafusa,Y., Kudo,T., Tamukai,K., Une,Y.
First report of *Veronaea botryosa* as a causal agent of chromomycosis in frogs.
Medical Mycology 53 (4), p.369-377 (2015) 99
- Imamura,M., Kato,N., Iwamaru,Y., Mohri,S., Yokoyama,T., Murayama,Y.
Multiple affinity purification of a baculovirus-derived recombinant prion protein with *in vitro* ability to convert to its pathogenic form
Preparative Biochemistry and Biotechnology. 10.1080/10826068.2016.1155058. (2016) 99
- Ito,H., Sueyoshi,M.
Development of a multiplex polymerase chain reaction method for *cps* typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 2, 5, 7, and 15
JARQ. 49 (3), p.277-280 (2015) 100
- Ito,H., Sueyoshi,M.
The genetic organization of the capsular polysaccharide biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (4), p.483-486 (2015) 100
- Ito,H.
The genetic organization of the capsular polysaccharide biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (5), p.583-586 (2015) 100
- Iwamaru,Y., Kitani,H., Okada,H., Takenouchi,T., Shimizu,Y., Imamura,M., Miyazawa,K., Murayama,Y., Hoover,E.A., Yokoyama,T.
Proximity of SCG10 and prion protein in membrane rafts
Journal of Neurochemistry. 136 (6), p.1204-1218 (2016) 100
- Kakisaka,M., Sasaki,Y., Yamada,K., Kondoh,Y., Hikono,H., Osada,H., Tomii,K., Saito,T., Aida,Y.
A novel antiviral target structure involved in the RNA binding, dimerization, and nuclear export functions of the influenza A virus nucleoprotein
PLoS Pathogens. 11 (7), e1005062 (2015) 100
- Kamimura,S., Sameshima,T., Ito,H.
Serovar and antimicrobial resistance profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Japan from 2006 to 2011
JARQ. 50 (1), p.73-77 (2016) 101

Kanehira,K., Uchida, Y., Saito,T. Visualization of avian influenza virus infected cells using self-assembling fragments of green fluorescent protein Electronic Journal of Biotechnology. 19, p.61-64 (2015)	101
Kanehira,K., Uchida,Y., Takemae,N., Hikono,H., Tsunekuni,R., Saito,T. Characterization of an H5N8 influenza A virus isolated from chickens during an outbreak of severe avian influenza in Japan in April 2014 Archives of Virology. 160 (7), p.1629-1643 (2015)	101
Kanemoto,H., Morikawa,R., Chambers,J.K., Kasahara,K., Hanafusa,Y., Uchida,K., Ohno,K., Nakayama,H. Common variable immune deficiency in a Pomeranian with <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia Journal of Veterinary Medical Science. 77 (6), p.715-719 (2015)	102
Kobayashi,A., Matsuura,Y., Iwaki,T., Iwasaki,Y., Yoshida,M., Takahashi,H., Murayama,S., Takao,M., Kato,S., Yamada,M., Mohri,S., Kitamoto,T. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1+2C and MM1 are identical in transmission properties Brain Pathology. 26 (1), p.95-101 (2016)	102
Kobayahshi,S., Tsutsui,T., Yamamoto,T., Hayama,Y., Muroga,N., Konishi,M., Kameyama,K., Murakami,K. The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk Journal of Veterinary Medical Science. 77 (7), p.861-863 (2015)	102
Konishi,M., Hayama,Y., Shirafuji,H., Kameyama,K., Murakami,K., Tsutsui,T., Akashi,H. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus infection in Japan Journal of Veterinary Medical Science. 78 (3), p.447-450 (2016)	102
Kusumoto, M., Hikoda, Y., Fujii, Y., Murata, M., Miyoshi, H., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., Akiba, M. Emergence of a multidrug-resistant Shiga toxin-producing enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> lineage in diseased swine in Japan Journal of Clinical Microbiology. 54 (4), p.1074-1081 (2016)	103
Mase,M., Kanehira,K. Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus serotype-1 in pigeons in Japan Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.919-923 (2015)	103
Masuda T, Murakami S, Takahashi O, Miyazaki A, Ohashi S, Yamasato H, Suzuki T. New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs Archives of Virology. 160 (10), p.2565-2568 (2015)	103
Masujin,K., Okada,H., Miyazawa,K., Matsuura,Y., Imamura,M., Iwamaru,Y., Murayama,Y., Yokoyama,T. Emergence of a novel bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion from an atypical H-type BSE Scientific Reports. 6: 22753 (2016)	103
Matsubayashi,M., Kanamori,K., Sadahiro,M., Tokoro,M., Abe,N., Haritani,M., Shibahara,T. First molecular identification of <i>Entamoeba polecki</i> in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with <i>Lawsonia intracellularis</i>	

Parasitology Research. 114 (8), p.3069-3073 (2015)	104
Matsubayashi,M., Murakoshi,N., Komatsu,T., Tokoro,M., Haritani,M., Shibahara,T. Genetic identification of <i>Entamoeba polecki</i> subtype 3 from pigs in Japan and characterisation of its pathogenic role in ulcerative colitis Infection, Genetics and Evolution. 36, p.8-14 (2015)	104
Mito,T., Yoshioka,K., Noguchi,M., Yamashita,S., Misumi,K., Hoshi,T., Hoshi,H. Birth of piglets from <i>in vitro</i> -produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium Theriogenology. 84 (8), p.1314-1320 (2015)	104
Miyazawa,K., Okada,H., Masujin,K., Iwamaru,Y., Yokoyama,T. Infectivity-associated PrP ^{Sc} and disease duration-associated PrP ^{Sc} of mouse BSE prions Prion. 9 (5), p.394-403 (2015)	104
Morioka,K., Fukai,K., Yoshida,K., Kitano,R., Yamazoe,R., Yamada,M., Nishi,T., Kanno,T. Development and evaluation of a rapid antigen detection and serotyping lateral flow antigen detection system for foot-and-mouth disease virus PLoS ONE. 10 (8), e0134931. doi: 10. 1371. (2015)	105
Murakami,S., Miyazaki,A., Takahashi,O., Hashizume,W., Hase,Y., Ohashi,S., Suzuki,T Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus variant Tottori2/JPN/2014 Genome Announcement. 3 (4), e00877-15 (2015)	105
Murata,Y., Chambers,J.K., Uchida,K., Nakashima,K., Hanafusa,Y., Ikezawa,M., Sugita,T., Nakayama,H. Mycotic aneurysm caused by <i>Graphium</i> species in a dog Journal of Veterinary Medical Science. 77 (10), p.1285-1288 (2015)	105
Murayama,Y., Ono,F., Shimozaki,N., Shibata,H. L-Arginine ethylester enhances <i>in vitro</i> amplification of PrP ^{Sc} in macaques with atypical L-type bovine spongiform encephalopathy and enables presymptomatic detection of PrP ^{Sc} in the bodily fluids Biochemical and Biophysical Research Communications. 470 (3), p.563-568 (2016)	105
Murayama,Y., Yoshioka,M., Okada, H., Takata,E., Masujin,K., Iwamaru,Y., Shimozaki,N., Yamamura,T., Yokoyama,T., Mohri,S., Tsutsumi,Y. Subcritical water hydrolysis effectively reduces the <i>in vitro</i> seeding activity of PrP ^{Sc} but fails to inactivate the infectivity of bovine spongiform encephalopathy prions PLoS ONE. 10 (12), e0144761 (2015)	106
Nakamura,K., Fujimori,H., Koyama,A., DAI,T.Q., Imai,K., Ikezawa,M., Yamamoto,Y. Immunohistochemistry and molecular epidemiology of avian paramyxovirus 1 from formalin- fixed and paraffin-embedded sections of Japanese doves (<i>Columba livia</i>) affected with neurological signs Journal of Veterinary Medical Science. 77 (7), p.837-841 (2015)	106
Nemoto,M., Oue,Y., Murakami,S., Kanno,T., Bannai,H., Tsujimura,K., Yamanaka,T., Kondo,T. Complete genome analysis of equine coronavirus isolated in Japan Archives of Virology. 160 (11), p.2903-2906 (2015)	106
Nguyen, V.T., Iwata,T., Kusumoto,M., Akiba, M. Lipooligosaccharide core truncations affect the ability of <i>Campylobacter jejuni</i> to attach to glass and form biofilms under aerobic conditions JARQ. 49 (3), p.269-275 (2015)	106

Noguchi,M., Yoshioka,K., Hikono,H., Suzuki,C., Kikuchi,K. Effect of semen extenders on frozen-thawed boar sperm characteristics and distribution in the female genital tract after deep intrauterine insemination in sows Animal Reproduction Science. 163, p.164-171 (2015)	107
Okada,H., Masujin,K., Miyazawa,K., Yokoyama,T. Acquired transmissibility of sheep-passaged L-type bovine spongiform encephalopathy prion to wild-type mice Veterinary Research. 46:81 (2015)	107
Okada,H., Masujin,K., Miyazawa,K., Yokoyama,T. Transmissibility of H-type bovine spongiform encephalopathy to hamster PrP transgenic mice PLoS ONE. 10 (10), e0138977 (2015)	107
Okagawa,T., Konnai,S., Nishimori,A., Ikebuchi,R., Mizorogi,S., Nagata,R., Kawaji,S., Tanaka,S., Kagawa,Y., Murata,S., Mori,Y., Ohashi,K. Bovine immunoinhibitory receptors contribute to suppression of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -specific T-cell responses Infection and Immunity. 84 (1), p.77-89 (2016)	107
Ooka,T., Ogura,Y., Katsura,K., Seto,K., Kobayashi,H., Kawano,K., Tokuoaka,E., Furukawa,M., Harada,S., Yoshino,S., Seto,J., Ikeda,T., Yamaguchi,K., Murase,K., Gotoh,Y., Imuta,N., Nishi,J., Gomes,T.A., Beutin,L., Hayashi,T. Defining the genome features of <i>Escherichia albertii</i> , an emerging enteropathogen closely related to <i>Escherichia coli</i> Genome Biology and Evolution. 7 (12), p.3170-3179 (2015)	108
Sakagami,N., Nishida,K., Misumi,K., Hirayama,Y., Yamashita,S., Hoshi,H., Misawa,H., Akiyama,K., Suzuki,C., Yoshioka,K. The relationship between oxygen consumption rate and viability of <i>in vivo</i> -derived pig embryos vitrified by the micro volume air cooling method Animal Reproduction Science. 164, p.40-46 (2016)	108
Sakagami,N., Nishida,K., Misumi,K., Hirayama,Y., Hoshi,T., Hoshi,H., Fujitani,A., Nakano,S., Akiyama,K., Suzuki,C., Yoshioka,K. Transportation of preimplantation porcine embryos without cryopreservation using a novel embryo carrier Journal of Mammalian Ova Research. 32 (3), p.121-127 (2015)	108
Samy, A.A., EI-Enbaaway, M.I., El-Sanousi,A.A., ,Nasel,S.A., Naguib,M.M., Abdelwhab, E.M., Hikono,H., Saito,T. Different counteracting host immune responses to clade 2.2.1.1 and 2.2.1.2 Egyptian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in naïve and vaccinated chickens Veterinary Microbiology. 183, p.103-109 (2016)	109
Shirafuji,H., Yazaki,R., Shuto,Y., Yanase,T., Kato,T., Ishikura,Y., Sakaguchi,Z., Suzuki,M., Yamakawa,M. Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton viruses by newly developed multiple TaqMan assays Journal of Virological Methods. 225, p.9-15 (2015)	109
Shiraiwa,K., Ogawa,Y., Eguchi,M., Hikono,H., Kusumoto,M., Shimoji,Y. Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine	

- strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*
Journal of Microbiological Methods. 117, p.11-13 (2015) 109
Suzuki,C., Sakaguchi,Y., Hoshi,H., Yoshioka,K.
Lipid-rich bovine serum albumin improves the viability and hatching ability of porcine blastocysts produced *in vitro*
Journal of Reproduction and Development. 62 (1), p.79-86 (2016) 109
Suzuki,S., Ohnishi,M., Kawanishi,M., Akiba,M., Kuroda,M.
Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*
Lancet Infectious Diseases. 16 (3), p.284-285 (2016) 110
Suzuki,T., Murakami,S., Takahashi,O., Kodera,A., Masuda,T., Itoh,S., Miyazaki, A., Ohashi,S., Tsutsui,T.
Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014
Infection, Genetics and Evolution. 36, p.363-368 (2015) 110
Suzuta,F., Kimura,K., Urakawa,R., Kusuda,Y., Tanaka,S., Hanafusa,Y., Haritani,M.
Variations in the morphology of *Rhizomucor pusillus* in granulomatous lesions of a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*)
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.1029-1031 (2015) 110
Takamatsu,H., Terui,K., Kokuho,T.
Complete genome sequence of Japanese vaccine strain LA-AKO of rinderpest virus
Genome Announcements. 3 (5), e00976-15 (2015) 111
Takanashi,S., Nochi,T., Abe,M., Itaya,N., Urakawa,M., Sato,K., Zhuang,T., Umemura,S., Hayashi,T., Kiku,Y., Kitazawa,H., Rose,M.T., Watanabe,K., Aso,H.
Extracellular cyclophilin A possesses chemotactic activity in cattle
Veterinary Research. 46:80 (2015) 111
Tamukai,K., Tokiwa,T., Kobayashi,H., Une,Y.
Ranavirus in an outbreak of dermatophilosis in captive inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*)
Veterinary Dermatology. 27 (2), p.99-105 (2016) 111
Unno,H., Inada,M., Nakamura,A., Hashimoto,M., Ito,K., Hashimoto,K., Nikaido,M., Hayashi,T., Hata,E., Katsuda,K., Kiku,Y., Tagawa,Y., Kawai,K.
Improved rapid and efficient method for *Staphylococcus aureus* DNA extraction from milk for identification of mastitis pathogens
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.1007-1009 (2015) 111
Yamamoto,T., Suzuki,T., Ohashi,S., Miyazaki,A., Tsutsui,T.
Genomic motifs as a novel indicator of the relationship between strains isolated from the epidemic of porcine epidemic diarrhea in 2013-2014
PLoS ONE. 11 (1), e0147994 (2016) 112
Yamamoto,Y., Nakamura,K., Yamada,M., Mase,M.
Corneal opacity in domestic ducks experimentally infected with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus
Veterinary Pathology. 53 (1), p.65-76 (2016) 112
Yamane,I., Ishizeki,S., Yamazaki,H.
Aujeszky's disease and the effects of infection on Japanese swine herd productivity: a cross-

sectional study	
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (5), p.579-582 (2015)	112
Yokota,R., Sato,K., Wada,Y., Ishikawa,Y., Kadota,K.	
Immature T cell neoplasms in three young cattle	
Journal of Veterinary Medical Science. 77 (12), p.1697-1700 (2015)	112
Yukawa,S., Tamura,Y., Tanaka,K., Uchida,I.	
Rapid detection of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium DT104 strains by the polymerase chain reaction	
Acta Veterinaria Scandinavica. 57, p.59 (2015)	113

阿部 遥, 峯 淳貴, Parchariyanon,S., 竹前喜洋, Boonpornprasert,P., Ubonyaem,N., Patcharsinghawut,P., Nuansrichay,B., 谷川太一郎, 常國良太, 西藤岳彦
養豚場離乳豚に共感染した豚インフルエンザウイルスの遺伝学的性状.

Virology. 484, p.203-212 (2015)

2012年2月, 継続的にIAV-Sの監視を行っているタイ Chachoengsao 県の大規模養豚場において, 40頭の離乳豚の鼻腔拭い液を用いた遺伝子検査により12頭のIAV感染を確認した。IAV遺伝子が検出された一頭の離乳豚の鼻腔拭い液から, 二種類の赤血球凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)遺伝子が検出されたことから, この豚は二種類のIAVに共感染したと考えられた。そこで共感染した豚の鼻腔拭い液から, プラーク法により遺伝子再集合ウイルスを別々に分離することを試みた。分離したIAVの全ゲノム配列の比較により, H1N1およびH3N2亜型のウイルス(H1N1-AおよびH3N2-A)が豚に共感染して遺伝子再集合を起こしたこと, 共感染により4つの亜型, 16種類の遺伝子構成の遺伝子再集合ウイルス(H1N1-A~G, H1N2-A~D, H3N1-A, H3N2-A~D)が産生された事が明らかになった。豚検体から分離されたウイルスの培養細胞での増殖を比較したところ, 最初に豚に共感染したと考えられる2種のウイルス(H1N1-AおよびH3N2-A)と比較して, それらの遺伝子再集合体であると考えられるウイルス(H1N1-B, H3N2-D)の増殖効率が勝っていたことは, 遺伝子再集合がより環境に適したIAVの産生に重要であることを示している。

秋庭正人, 関塚剛史, 山下明史, 黒田 誠, 藤井勇紀, 村田美郷, 李 謙一, Joshua, D.I., Balakrishna,K., Bairy,I., Subramanian,K., Krishnan, P., Munuswamy,N., Sinha, R.K., 岩田剛敏, 楠本正博, Guruge,K.S.

インドの河川および汚水処理施設から分離した広域セファロスポリンまたはカルバペネム耐性大腸菌における薬剤耐性決定因子の分布と関連.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60 (5), p.2972-2980 (2016)

インドの水環境から分離した広域セファロスポリン(ESC)及びカルバペネム耐性大腸菌における薬剤耐性遺伝子やプラスミドの分布と関係を明らかにするため, インド国内の5州において汚水処理施設及び河川から水サンプルを収集し, 総計446株の大腸菌をランダムに分離した。ESCおよび/またはカルバペネム耐性は169

株(37.9%)に認められ, その半数以上が8剤以上に耐性であった。カルバペネム耐性大腸菌21株中14株から bla_{NDM} 遺伝子が検出された: bla_{NDM-1} が2株, bla_{NDM-5} が7株, bla_{NDM-7} が5株。 bla_{CTX-M} 遺伝子は112株(66.3%)から検出された: $bla_{CTX-M-15}$ が108株, $bla_{CTX-M-55}$ が4株。ランダムに選んだ株から抽出した49プラスミドの全塩基配列を決定したところ, 50の薬剤耐性遺伝子と11の異なるレプリコン型の組み合わせが認められた。保有遺伝子の相同性に基づくネットワーク解析では, 同じレプリコン型を共有するプラスミドがコミュニティを形成する傾向が示され, 4~17のプラスミドを含む4つのコミュニティが観察された。うち3つのコミュニティが異なる州で検出されたプラスミドを含んでいたことは, 過去に祖先プラスミドが州を越えて拡散した可能性を示唆している。 bla_{NDM} 保有プラスミドの比較では, 様々な変異がプラスミドを進化させ, 類似の遺伝的背景を有するプラスミドがインド国内に広く播種された可能性が示唆された。

秋庭正人, 仙波裕信, 小田切春菜, Prabhasankar,V.P., 谷保佐知, 山下信義, 李 謙一, 山本健久, 筒井俊之, Joshua,D.I., Balakrishna,K., Bairy,I., 岩田剛敏, 楠本正博, Kannan,K., Guruge,K.S.

南インドの汚水処理施設における薬剤耐性大腸菌の分布に及ぼす汚水由来の影響.

Ecotoxicology and Environmental Safety. 115, p.203-208 (2015)

汚水処理施設(STP)は人集団と水環境の最も重要な接点の1つであり, 水環境の薬剤耐性菌汚染に関与する。薬剤耐性菌の分布に影響を与える因子を特定するため, 南インドの異なる3つのSTPから水検体を採取した。STP1は生活排水のみ処理している。STP2は主に生活排水を処理するが, 病院由来の排水も受け入れている。STP3は病院排水のみ処理している。汚水処理施設を通過する際の薬剤耐性菌除去率を調べるため, 最初沈殿池, 曝気槽, 最終沈殿池の後と濾過処理後の4カ所で水検体を採取した。季節変動の影響を調べるため検体は3つの異なる季節に採取した。水検体から分離した大腸菌の12薬剤に対する感受性を調査した。ロジスティック回帰分析の結果, 処理過程と検体採取季節が薬剤耐性菌の分布率に影響しなかったのに対し, 病院排水の受け入れにより薬剤耐性菌の分布率は有意に上昇することが示された。STP3由来大腸菌遺伝子型分布には偏りが見られた。結論として, インド環境の薬剤耐性菌汚染を防

止するためには病院排水の処理に注意を払う必要のあることが示された。

Athey,T.B.T., Auger,J-P., Teatero,S., Dumesnil,A., 高松大輔, Wasserscheid,J., Dewar,K., Gottschalk,M., Fittipaldi,N

シークエンスタイプ 28 に属する血清型 2 型豚レンサ球菌株集団の複雑な遺伝的構造と病原性の違い.

PLoS ONE. 10 (9), e0137760 (2015)

豚レンサ球菌 (*S. suis*) は、豚の主要な病原体であり、人獣共通感染症の原因菌でもある。血清型 2 型株が最も高頻度に病気を引き起こすが、すべての 2 型株が強毒株ではない。実際、これまでは、シークエンスタイプ (ST) 28 の血清型 2 型株は弱毒と記載されていた。しかし、いくつかの国では ST28 株も病豚から分離されており、ST28 株による人の感染例も報告されている。そこで、我々は、ST28 の株集団は異なる遺伝的背景と異なる病原性を持つ株によって構成されているのではないかという仮説をたて、全ゲノム解析と動物感染実験によって検証した。実験には、カナダ、アメリカ、日本、タイで分離された病豚由来 (50 株) および人感染例由来 (1 株) の ST28 の *S. suis* 株、合計 51 株を用いた。解析の結果、ST28 株は遺伝的な多様性を持っており、その多様性は保有遺伝子の種類の違い、過去に起こった組換え、組換えとは関係ないゲノム全体にわたる配列の多様性に起因していることが明らかとなった。また、株間で保有する抗生物質耐性遺伝子の種類も異なっていた。コアゲノム中の 1 塩基多型を利用した系統解析の結果、解析した 51 株は分離地域と強い相関のある 4 つのクレードとアメリカ、タイ、日本の株で構成される 5 つめのクレードに分類された。感染実験の結果、この 5 つめのクレードの株はカナダの ST28 の株よりも強毒であることが明らかとなった。これらの結果は、系統解析と病原性の推測における MLST による型別法の限界を示しており、人の臨床例における ST28 株の台頭の可能性について警鐘を与えるものである。

深井克彦, 森岡一樹, 山田 学, 西 達也, 吉田和生, 北野理恵, 山添麗子, 菅野 徹

山羊胎子舌株化細胞 ZZ-R 127 と豚胎子腎株化細胞 LFBK- $\alpha_v\beta_6$ の口蹄疫ウイルスの分離に関する比較解析.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 27 (4), p.516-521 (2015)

山羊胎子舌株化細胞 ZZ-R 127 と豚胎子腎株化細胞

LFBK- $\alpha_v\beta_6$ は、様々な口蹄疫ウイルス (FMDV) 株に高い感受性を示すことが知られている。FMDV の分離に関する ZZ-R 127 細胞の有用性は、上皮乳剤のみならず、その他の臨床材料に関しても、既報においてすでに確認されている。しかしながら、LFBK- $\alpha_v\beta_6$ 細胞の有用性は、上皮乳剤以外の臨床材料に関しては検証されていない。また、FMDV の分離に関して、両細胞は同一条件下で比較されていない。そこで本試験において、両細胞によるウイルス分離率を、FMDV の感染試験動物から採取した材料を用いて比較した。ウイルスは、両細胞により上皮乳剤以外の臨床材料から分離された。両細胞のウイルス分離率はほぼ同様であった。両細胞のウイルス分離成績に関するコーエンのカップ係数は著しく高かった。本試験の成績から、上皮乳剤以外の臨床材料からの FMDV の分離に関して、LFBK- $\alpha_v\beta_6$ 細胞は有用であることが確認された。また、FMDV の分離に対する両細胞の感受性は同程度であることが確認された。

Gopurenko,D., Bellis,G. A., 梁瀬 徹, Wardhana,A.H., Thepparat,A., Wang,J., Li,H., Cai,D., Mitchell,A

***Culicoides* 属 (ハエ目ヌカカ科) における種の境界を探るための包括的な分類の試み：オーストラリアとアジア東部から収集した *Avaritia* 亜属を用いた事例研究.**

Veterinaria Italiana. 51 (4), p.345-378 (2015)

本研究では、オーストラリアとアジア東部から収集した家畜衛生上重要な *Avaritia* 亜属のヌカカのうち、記載種 15、未記載種 2 を用いて、種の境界についての検討を行った。我々は、DNA バーコーディング、核遺伝子の配列の解析、ならびに古典的な形態解析を組み合わせた統合的な分類学的手法を用いた。*Culicoides fulvus* やワダヌカカのようないくつかのアルボウイルス媒介種では、分布地域全体で、遺伝的、形態的な均一性が認められたが、オクマヌカカやスチャヌカカなどの他の種では、場合によっては同所性の隠蔽種と思われる 2 つ以上の遺伝的に独立した集団が含まれていた。これらの隠蔽種のうちいくつかは、はっきりとした形態的な違いと示していたが、その他の種では、未だ形態的な違いは明らかになっていない。加えて、未記載種である *C. Avaritia* sp. No. 3 は *C. fulvus* のシノニムであることがわかった。これらの結果は、*Avaritia* 亜属のそれぞれの種の分布についての理解を高めるとともに、種の記載と分布記録は、部分的に見直す必要があることを示している。更に、ほとんどの種について媒介能の精査は、オーストラリアの個体群を用いて行っているため、その他の地域

で見つかった推定上の隠蔽種の媒介能については、別個の試験が必要である。特に隠蔽種を含む系統群の現状や分布を明らかにするため、包括的な分類の評価は、それぞれの種の基準産地から得られた標本の遺伝学のおよび形態学的精査を必要とする。国際的な共同研究は、この種の研究を促進するためには必要不可欠である。

秦 英司

わが国の牛乳房炎乳汁から分離された *Mycoplasma arginini* HAZ145_1 株の全ゲノム配列の決定.

Genome Announcement. 3 (2), e00265-15 (2015)

マイコプラズマは様々な牛疾病の原因となるが、*Mycoplasma arginini* や *Acholeplasma* 属菌などは感染実験でも明確な病態を示さず、牛に対する病原性は無いとも考えられる。また、*M. arginini* は遺伝学的特性などの基礎的知見も未解明である。本研究ではわが国の牛乳房炎乳汁から分離された *M. arginini* HAZ145_1 株の全ゲノム解析を実施し、既知の病原遺伝子の有無等を確認した。本株のゲノムサイズは 678, 592bp であり、518 の open reading frame, 10 の偽遺伝子, 33 の tRNA 遺伝子, 2 組の rRNA オペロン (5S, 16S, 23S) が存在していた。また、本ゲノムにはマイコプラズマの重要な病原因子である活性酸素産生に関わる遺伝子群と莢膜多糖体合成に関わる遺伝子群は認められなかった。一方、表層抗原の変異への関与が示唆される遺伝子群の存在が確認された。本ゲノム情報は、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている (accession no. AP014657)。

早山陽子, 森口紗千子, 梁瀬 徹, 鈴木萌美, 丹羽 毅, 池宮城一文, 新田芳樹, 山本健久, 小林創太, 村井清和, 筒井俊之

2012-2013 年に八重山地方で発生した牛流行熱の疫学解析.

BMC Veterinary Research. 12: 47 (2016)

2012 ~ 2013 年に石垣島を中心とする八重山地方で発生した牛流行熱について、発生の特徴を疫学的に解析し、地域内での発生と地理的要因の関係を空間解析手法を用いて解析した。また、離島への伝播と八重山地域への疾病の侵入について、ウイルスを保有した媒介昆虫の飛来の可能性を大気拡散モデルを用いて検証した。初発例は 2012 年 9 月に石垣島西部の肉牛農場で確認され、感染は石垣島南部と周辺の離島に広がり、翌年 9 月までに 225 例が確認された。空間解析の結果、石垣島内では、牧草地を含む農用地や水田の割合が多い場所、傾斜角度

が大きい場所で発生率が有意に高く、これらの要因がウイルス保有媒介昆虫の地域内での拡散に影響を与えた可能性が示唆された。大気拡散モデルを用いて石垣島から離島への風の流れを分析した結果、離島で感染が確認される 1 週間以内前に石垣島からの風が確認され、離島への伝播には風によるウイルス保有媒介昆虫の拡散の可能性が示唆された。また、大気拡散モデルを用いて、石垣島への大気の移動を解析したところ、8 月下旬に東南アジアから八重山地域へ空気塊の流入が確認され、東南アジアからのウイルス保有媒介昆虫の長距離伝播の可能性が示唆された。

平島宜昌, 加藤友子, 山川 睦, 白藤浩明, 岡野良一, 梁瀬 徹

2013 年に南日本で再発生したイバラキ病.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (10), p.1253-1259 (2015)

2013 年に、鹿児島県北部で 2 頭の牛が発熱と嚥下障害を呈したことから、イバラキ病が疑われた。RT-PCR により、発症牛と症状を示していない同居牛から流行性出血病ウイルス (EHDV) のゲノムが検出された。128 ~ 1,024 倍のイバラキウイルス (IBAV) に対する高い中和抗体価が RT-PCR 陽性牛で認められ、また、IBAV が発生農場のひとつで分離された。第 2 分節にコードされる外殻タンパク質である、VP2 の配列を基した相同性解析ならびに分子系統樹解析では、今回の分離株と過去の IBAV 株の間の近縁性が明らかになった。また、VP2 を用いた分子系統樹解析は、1997 年に分離された IBAV 変異株が IBAV とは異なり、異なる血清型である EHDV 血清型 7 に分類されることを示していた。これらの結果から、26 年ぶりに国内でイバラキ病が再発生したことが明らかになった。興味深いことに、IBAV と EHDV 血清型 1 が、同時期に発生地域で確認されたことから、野外でのこれらの異なる血清型の株間で遺伝子再集合が起こりえたことが示唆された。鹿児島県における、おとり牛を用いたサーベイランスでは、IBAV の侵入は 2013 年 10 月におこり、その感染の広がり是一部地域に限定されたことが示された。媒介昆虫による伝播にとって不適な晩秋の気温の影響で、広範囲へのウイルスの感染の広がりには抑制されたのかもしれない。イバラキ病の再発生は、経済的な損失を防ぐためにワクチンの継続的な使用が重要であることを示した。

Hoa,L.N.M., Bryant,J.E., Choisy,M., Nguyet,L.A., Bao,N.T., Trang,N.H., Chuc,N.T.K., Toan,T.K., 西藤岳彦, 竹前喜洋, Horby,P., Wertheim,H., Fox,A

2011年から2012年にかけてのベトナムでの豚由来 H3N2 亜型変異インフルエンザウイルスに対する集団感受性.

Epidemiology and Infection. 143(14), p.2959-2964 (2015)

再集合体のブタ由来の A (H3N2) ウイルス (A/swine/BinhDuong/03-9/2010) は, 2010 年にベトナム南部における豚サーベイランスプログラムで検出された。このウイルスは, 2004 年から 2006 年にかけて循環していた人間の A (H3N2) ウイルスの赤血球凝集素蛋白遺伝子とノイラミニダーゼ遺伝子を保持し, 内部遺伝子はトリプルリアソータント豚インフルエンザ A ウイルスに由来している。人々のこのウイルスに対する感受性を評価するために, 2011 年から 2012 年にかけてベトナムの都市部および農村ベトナムの人々から収集した 947 血清の A/swine/BinhDuong/03-9/2010 及び A/Perth/16/2009 に対する赤血球凝集阻害力価を測定した。血清陽性率は二つのウイルスに対して同様であり, 都市部と農村部の人々の間で有意な差はなかった。5 歳以下の子供たちは, A/Perth/16/2009 に対する抗体保有者は多かったが, A/swine/BinhDuong/03-9/2010 に対する抗体を欠いていた。これらの結果は, <5 歳の小児が豚由来ウイルスに対する感受性が高いことを示している。一方で, 成人に認められるこのウイルスに対する交差反応性はこのウイルスによる流行の出現の可能性を制限するであろう。

Hofmann, M., Wiethölter, A. Blaha, I., Jöst, H., Heinemann, P., Lehmann, M., Miller, T., Cadar, D., 梁瀬 徹, Kley, N., Eiden, M., Groschup, M., Schmidt-Chanasit, J.

ドイツの牛におけるバタイウイルスのサーベイランス.

Clinical and Vaccine Immunology. 22(6), p.672-673 (2015)

バタイウイルスの獣医学的な重要性を判断するために, 我々はドイツ南西部の 548 頭の牛でバタイウイルス特異抗体ならびにウイルス RNA の保有状況を調べ, 3 頭の牛の血清中に特異抗体が含まれていたことを示した (抗体保有率, 0.55%)。従って, 我々の結果はドイツ南西部において, バタイウイルスの地域的な伝播が起こっていたことを確認するとともに, 牛が宿主となり得ることを示唆する。

細矢 剛, 花房泰子, 工藤朝雄, 田向健一, 宇根有美
Veronaea botryosa によるカエル黒色真菌症の初報告.
Medical Mycology 53 (4), p.369-377 (2015)

カエルから分離された真菌が変温動物において病原性を有する可能性があることを明らかにした。この真菌は, 組織病理学的検査, 形態学的特徴および分子系統学的証拠により *Veronaea botryosa* と同定された。*V. botryosa* は環境中に広く分布し, ヒトの病原体としても知られている。この論文は, *V. botryosa* が無尾類を含めた変温動物において致死的な感染症を引き起こすことを確認した初報告である。

今村守一, 加藤紳子, 岩丸祥史, 毛利資郎, 横山 隆, 村山裕一

異常型プリオン蛋白質への構造変換能をもつバキュロウイルス由来組換えプリオン蛋白質の多段階アフィニティー精製.

Preparative Biochemistry and Biotechnology. 10. 1080/10826068. 2016. 1155058. (2016)

我々はこれまでに, バキュロウイルス由来組換えプリオン蛋白質 (Bac-PrP) が蛋白質ミスフォールディング循環増幅 (PMCA) により感染性のある異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) に構造変換することを示している。翻訳後修飾される Bac-PrP は抗プリオン蛋白質抗体の生成のための免疫原や, 抗プリオン蛋白質薬やプリオン病診断法の開発, 試験管内プリオン増幅モデルの構築に有用である。これらの目的のためには, コンタミネーションを最小限に防ぐため, 高度に精製された Bac-PrP が必要である。さらに, 立体構造への干渉を防ぐために外因性のアフィニティータグが付加されない, ネイティブ Bac-PrP が望ましい。そこで本研究では, ポリヒスチジンタグと profinity eXact タグの二重アフィニティータグと PrP の N 末端領域のオクタリピート領域を組み合わせた, 3 段階のアフィニティー精製法を確立した。このアフィニティー精製法により, Bac-PrP はほぼ均一に精製され, 異常型構造への変換能を保持していることが示された。この精製方法は PrP だけでなく, 高精製度と完全な生理活性を必要とする他の真核生物由来の組換え蛋白質への応用が期待される。

伊藤博哉, 末吉益雄

豚胸膜肺炎血清型 1, 2, 5, 7 及び 15 の莢膜多糖合成遺伝子型別用の PCR の開発.

JARQ. 49 (3), p.277-280 (2015)

莢膜多糖合成遺伝子に特異的なプライマーを用いた豚胸膜肺炎菌の血清型 1, 2, 5, 7 及び 15 を型別可能なマルチプレックス PCR 法を開発した。日本で分離される血清型のほとんどは, 上記の血清型であるため, 本法は実用性の高い方法である。

伊藤博哉, 末吉益雄

豚胸膜肺炎血清型 15 の莢膜多糖合成遺伝子領域の遺伝子構造.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (4), p.483-486 (2015)

豚胸膜肺炎菌血清型 15 の莢膜多糖合成遺伝子 (*cps*) 領域の遺伝子構造を決定した。*cps* 領域からは, Cps15A ~ Cps15C タンパクをコードする *cps15A* ~ *cps15C* の 3 つのオープンリーディングフレームが検出された。血清型 15 の Cps15A 及び Cps15B タンパクのアミノ酸配列は, 血清型 1, 4 及び 12 の CpsA 及び CpsB タンパクのアミノ酸配列とそれぞれ 67 ~ 68.7% 及び 31.7 ~ 36.8% の相同性を示したが, Cps15C のアミノ酸配列は, 他のいずれの豚胸膜肺炎菌血清型の蛋白質のアミノ酸とも相同性を示さず血清型 15 特異的であった。本研究は, 豚胸膜肺炎菌血清型 15 の診断薬及びワクチン開発のための基礎的知見となる。

伊藤博哉

豚胸膜肺炎菌血清型 14 の莢膜多糖合成遺伝子領域の遺伝子構造.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (5), p.583-586 (2015)

豚胸膜肺炎菌血清型 14 の莢膜多糖合成遺伝子 (*cps*) 領域の遺伝子構造を決定した。*cps* 領域からは, Cps14A ~ Cps14G 蛋白質をコードする *cps14A* ~ *cps14G* の 9 つのオープンリーディングフレームが検出された。Cps14A 及び Cps14B 蛋白質のアミノ酸配列は *A. pleuropneumoniae* 血清型 1, 4 及び 12 の CpsA 及び CpsB 蛋白質のアミノ酸配列とそれぞれホモロジーを示した。このことから豚胸膜肺炎菌血清型 14 の莢膜多糖の化学構造は, 血清型 1, 4, 12 及び 15 と同一のグループに属することが明らかになった。また特筆すべきは血清型 14 の莢膜多糖合成遺伝子の塩基配列, 遺伝子構造及び塩基配列から推定されるア

ミノ酸配列は, *Actionobacillus suis* のものとほぼ同一であることである。本研究は, 豚胸膜肺炎菌血清型 14 の診断薬及びワクチン開発のための基礎的知見となる。

岩丸祥史, 木谷 裕, 岡田洋之, 竹之内敬人, 清水善久, 今村守一, 宮澤光太郎, 村山裕一, Hoover,E.A., 横山隆

正常プリオン蛋白質と SCG10 蛋白質は, 脂質ラフト上で近接している.

Journal of Neurochemistry. 136 (6), p.1204-1218 (2016)

病原体プリオンの主要構成要素である異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は, 自身を鋳型にして正常プリオン蛋白質 (PrP^C) の立体構造変換を起こすと考えられている。その詳細な機構は未解明であるが, 脂質ラフトとそこに局在する分子が立体構造変換に関与することが指摘されている。PrP^C 構造変換に関与する分子群の同定を目的とし, 脂質ラフト上で PrP^C と共局在する分子群の検索を, EMARS (enzyme-mediated activation of radical sources) 反応を用いて行った。その結果, 神経特異的に発現する微小管再構築調節蛋白質 SCG10 が同定され, SCG10 は PrP^C と共局在していた。SCG10 はプリオン持続感染細胞における PrP^{Sc} 産生には関与していなかったが, 末期のプリオン感染マウス海馬神経細胞において, SCG10 の発現は有意に減少していた。

Kakisaka,M., Sasaki,Y., Yamada,K., Kondoh,Y., 彦野弘一, Osada,H., Tomii,K., 西藤岳彦, Aida,Y.

インフルエンザ A ウイルス核タンパク質の新規抗ウイルス剤標的構造は, RNA 結合, 二量体形成, 核外輸送機能を含んでいる.

PLoS Pathogens. 11 (7), e1005062 (2015)

これまでの研究で 50,000 の化合物ライブラリーのスクリーニングにより, 抗ウイルス性化合物 RK424 が同定されている。RK424 はウイルス核タンパク質 (NP) を細胞核内に蓄積させ, ウイルスのリボ核タンパク質複合体 (vRNP) 活性を阻害する。In silico 結合解析で RK424 は, ウイルス NP の小さなポケットに結合していることを明らかにした。このポケットは, RNA 結合, オリゴマー化におよび NP の核エクスポート機能に関与する可能性が示された。表面プラズモン共鳴 (SPR) 及びプルダウンアッセイで, RK424 が NP-RNA および NP-NP 相互作用を阻害することを示した。一方で, サイズ排除クロマトグラフィーにより, RK424 がウイルス RNA によって誘導される NP の多量体化を阻害する

ことが示された。また, in vitro での核輸送アッセイによって, RK424 は, NP の核外輸送を阻害することが確認された。NP ポケットを含むアミノ酸残基は, 7,000 以上のトリ, ヒト, および豚インフルエンザウイルスの NP 配列において保存されている。これらの結果は, NP 内の新規ポケット構造を標的するアプローチがインフルエンザウイルス薬を開発する有望な新しいアプローチであることを示している。

上村俊介, 鮫島俊哉, 伊藤博哉

2006 ~ 2011 年に日本で分離された豚胸膜肺炎の血清型及び薬剤耐性プロファイル.

JARQ. 50 (1), p.73-77 (2016)

日本で 2006 ~ 2011 年に分離された豚胸膜肺炎菌 48 株の血清型を調べた。その結果, 血清型 1, 2, 5, 6, 7, 12 及び 15 の割合は 10.4, 60.4, 14.6, 2.1, 2.1, 2.1, 8.3% で, 近年は血清型 15 の分離例が増加していた。さらにディスク拡散法を用いて 6 種の抗菌剤に対する抵抗性を調べた。その結果, ペニシリン G, アンピシリン, オキシテトラサイクリン (OTC), スルフィキサゾール, クロラムフェニコール及びノルフロキサシンそれぞれに 25.0, 12.5, 39.6, 37.5, 18.8 及び 0% の耐性を示した。耐性抗菌剤の数は, 血清型間で異なる傾向にあった。すなわち, 血清型 1 は全株 3 種以上の抗菌剤に耐性であったが, 血清型 2 の 44.8% が全ての抗菌剤に感受性, 34.5% が 1 種の抗菌剤のみに耐性であり, 血清型 1 は血清型 2 に比べてより多剤耐性の傾向にあった。さらに血清型 1, 5 及び 15 の全ての株は OTC 耐性であったが, 血清型 2 は OTC に対して低い耐性率 (6.9%) を示した。抗菌剤耐性の傾向は, 既報の 1989 ~ 2005 年に分離された株と比較すると, 大きな変化は認められなかった。

金平克史, 内田裕子, 西藤岳彦

自己会合型緑色蛍光タンパク質を用いた鳥インフルエンザウイルス感染細胞の可視化.

Electronic Journal of Biotechnology. 19, p.61-64 (2015)

断片化した改変型緑色蛍光タンパク質の自己会合により緑色蛍光を呈する性質を利用して, 鳥インフルエンザウイルス (AIV) 感染細胞の可視化を試みた。AIV の NP セグメントに自己会合型断片化緑色蛍光タンパク質の GFP₁₁ が融合したタンパク質をコードする遺伝子 (GFP₁₁-NP 遺伝子) を人工遺伝子合成により合成し, プラスミドにクローニングした。この GFP₁₁-NP 遺伝子をクローニングしたプラスミドと共に, AIV の他の野生

型遺伝子をクローニングしたプラスミドを利用し, リバースジェネティクスにより感染型ウイルスを得た。発育鶏卵で増殖させた本組換えウイルスを自己会合型断片化緑色蛍光タンパク質の他方の断片である GFP₁₋₁₀ を一過性に発現させた培養細胞に感染させ, 96 時間後に蛍光顕微鏡で観察したところ緑色蛍光が観察された。本法は, 断片化した短い GFP₁₁ のみをウイルスタンパク質に融合させるため組換えウイルスの増殖性への影響が少ないと考えられ, AIV の培養細胞における感染動態を理解するために利用できる。

金平克史, 内田裕子, 竹前喜洋, 彦野弘一, 常國良太, 西藤岳彦

2014 年 4 月の日本での高病原性鳥インフルエンザ発生において分離された H5N8 亜型 A 型インフルエンザウイルスの性状.

Archives of Virology. 160 (7), p.1629-1643 (2015)

日本の養鶏場から 2014 年 4 月に A/chicken/Kumamoto/1-7/2014 という高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) が分離された。系統学的解析により, このウイルスの HA クレードは 2.3.4.4 であることが明らかになった。全 8 つのウイルス遺伝子は全て 2014 年 1 月に韓国で分離された H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 及び A/baikal teal/Korea/Donglim3/2014 と高い配列相同性を示した。A/chicken/Kumamoto/1-7/2014 のニワトリにおける病原性と, 水鳥が潜在的にこのウイルスのレゼルボアやキャリアになるのかを評価するために, ニワトリ及びアヒルを用いた経鼻感染実験を実施した。高濃度 (1 羽当たり 10⁶ EID₅₀) でウイルスを接種したニワトリは全羽死亡したが, より低い濃度 (1 羽当たり 10⁴ 及び 10² EID₅₀) の接種では感染しなかった。高濃度から低濃度 (10⁶, 10⁴ 及び 10² EID₅₀) をアヒルに接種した実験において, このウイルスはアヒルには感染するが症状を呈さないことが明らかになった。さらに, HI 試験によって, A/chicken/Kumamoto/1-7/2014 はクレード 2.3.4.4 以外の H5 ウイルスに対して低い交差反応性しか示さないことを明らかにした。以上のことから, 水鳥は過去に蔓延したクレード 2.3.4.4 以外の H5 ウイルスに対する抗体を持っていたとしても, このウイルスを拡散させることができることが示唆された。

金本秀之, Morikawa R., Chambers, J.K., Kasahara, K.,

花房泰子, 内田和幸, 大野耕一, 中山裕之

カリニ性肺炎を呈するポメラニアンに認められた免疫不全.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (6), p.715-719 (2015)

犬, ポメラニアン, 1歳8か月, 去勢雌. 持続性の呼吸困難や, 再発性のニキビダニ症を示した. 診察時, チアノーゼ, 荒い呼吸音, 目周囲の皮膚と会陰部および前肢背側に多病巣性脱毛症や皮膚びらんが認められた. X線検査により, 重度のびまん性間質性肺パターンが胸部に観察された. 血液検査では好中球増多症と低グロブリン血症が認められ, 血清イムノグロブリン濃度として, Ig A および IgG 濃度が低値を示した. 病理組織学的検査により, *Pneumocystis carinii* 感染による, 重度のびまん性間質性肺炎が明らかとなった. 重度のリンパ球欠損が脾臓とリンパ濾胞を有する他臓器で観察され, リンパ組織は主に CD3 陽性 T 細胞で構成され, B 細胞系は極めてわずかしか存在しなかった. B 細胞欠損と, それに起因する抗体欠損が疑われた.

小林篤史, 松浦裕一, 岩城 徹, 岩崎 靖, 吉田真理, 高橋 均, 村山繁雄, 高尾昌樹, 加藤信介, 山田正仁, 毛利資郎, 北本哲之

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 MM1+2C 型は MM1 型と同じ感染性を示す.

Brain Pathology. 26 (1), p.95-101 (2016)

孤発性 CJD は患者のプリオン蛋白質遺伝子での正常なアミノ多型, コドン 129 番目メチオニン (M) とバリオン (V) に加えて, 脳に蓄積した異常プリオン蛋白質の性質によって区別される. CJD の型の違いによってその感染性が異なることから, 医原性 CJD の予防の観点から孤発性 CJD のヒトへの感染性を詳細に把握する必要がある. そこで, ヒト化マウスを使った感染実験で 2 つの型が混在した MM1+2C 型の感染性 (マウスにおける潜伏期間, PrP 沈着パターン, 異常型 PrP のタイプ) を調べた. その結果, MM1+2C 型は MM1 型と全く同じであった. MM2C 型はヒト化マウスに伝達できなかった. また, 硬膜移植関連 CJD45 例のうち, MM1+2C 型の特徴を示す症例が認められなかった. これらのことから, 孤発性 CJD MM1+2C の感染性は感染実験でもヒトへの医原性感染においても MM1 型と同じであり, MM2C 型の感染力は非常に弱いと考えられる. MM1+2C 型は MM1 型と異なるグループに分類されるが, 医原性 CJD の予防の観点からは両者を区別して考える必要がないと示さ

れた.

小林創太, 筒井俊之, 山本健久, 早山陽子, 室賀紀彦, 小西美佐子, 亀山健一郎, 村上賢二

牛白血病ウイルス伝播に関する隣接感染牛の役割.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (7), p.861-863 (2015)

牛白血病ウイルス (BLV) 感染農場において, 牛舎内の牛の配置が非感染牛の感染成立に与える影響を評価した. 感染牛が隣接配置された非感染牛 (n=53) は, 感染牛が隣接配置されていない非感染牛 (n=81) よりも, より多くの感染が成立し, この関連は統計学的にも有意であった (P=0.001). このことは, 感染農場における感染牛と非感染牛の分離飼育の有用性を示唆しており, BLV まん延防止対策を推進する上での科学的根拠の一つとなる.

小西美佐子, 早山葉子, 白藤弘明, 亀山健一郎, 村上賢二, 筒井俊之, 明石博臣

わが国における山羊関節炎・脳脊髄炎ウイルスの浸潤状況調査.

Journal of Veterinary Medical Science. 78 (3), p.447-450 (2016)

わが国における山羊関節炎・脳脊髄炎ウイルス (CAEV) の浸潤状況を把握するため, 2006-2007 年に全国規模の調査を実施した. 28 県, 113 戸の農場で飼養される山羊 857 頭にを対象とした抗体検査の結果, 農場別では 15.0% (17/113), 個体別では 10.0% (86/857) で CAEV 感染が確認された. また, CAEV 感染リスクを解明するため, 農場および個体別の疫学情報を収集し, 抗体検査の結果と併せて統計学的解析を実施したところ, 農場別では「飼養頭数 (10 頭以上)」および「飼養目的 (乳用・種畜用)」, 個体別では「年齢 (3 歳以上)」, 「品種 (ザーネン)」, 「外部からの導入」, 「性別 (雌)」ならびに「放牧なし」が CAEV 感染に関連のある項目であることが示された. また, 抗体陽性率を品種別に比較すると, ザーネン種やアルパイン種など, 外来種における陽性率が高いことが明らかとなった. 今回の解析結果から, CAEV 感染に関連のある項目を多く有す大規模の乳用山羊飼育農家における CAE の清浄化が, わが国の CAE 対策において非常に重要であると考えられる.

楠本正博, 彦田夕奈, 藤井勇紀, 村田美聡, 三好洋嗣,

小椋義俊, 後藤恭宏, 岩田剛敏, 林 哲也, 秋庭正人
わが国の豚群における新規多剤耐性志賀毒素産生性大腸菌系統の出現.

Journal of Clinical Microbiology. 54 (4), p.1074-1081 (2016)

毒素原性大腸菌 (ETEC) および志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は, 豚の下痢および浮腫病の原因となる重要な病原体である。その血清型は特定の O 群に限られる傾向があり, O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157 などの分離に関する報告が世界的に多い。しかし国内においては, 特に近年の調査報告が少ないため, 豚から分離される病原性大腸菌の全体像 (分離状況や性状の推移など) については不明な点も多い。本研究では, 1991 年から 2014 年にかけて国内で下痢または浮腫病の豚から分離された病原性大腸菌 967 株について O 群血清型別を行い, O139, O149, O116, OSB9 の 4 種が全体の 71% を占める主要な O 群血清型であることを見出した。本研究ではさらに, これら 4 種の主要 O 群血清型について, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), 病原因子プロファイリングなどによる解析を行った。ほとんどの O139 および O149 は PFGE によりそれぞれ O 群血清型特異的なクラスター (I および II) に分類されたが, O116 と OSB9 は同一のクラスター (III) に分類された。PFGE クラスター III に属するすべての株が MLST により単一のシーケンスタイプ (ST88) に分類され, エンテロトキシン (LT/ST) および志賀毒素 (Stx2e) 両方の遺伝子を保有していた。また, 様々なカテゴリーの抗菌剤 21 種に対する感受性を調べたところ, PFGE クラスター III/ST88 に属する菌株は高度な多剤耐性 (4~15 剤・中央値 10 剤) を有しており, 驚くべきことにその 90% がフルオロキノロン耐性であった。家畜飼養環境への PFGE クラスター III/ST88 の浸潤は, その毒素産生性および薬剤耐性の点から畜産における重大なリスクと考えられる。

真瀬昌司, 金平克史

わが国のハトにおけるトリパラミクソウイルス 1 型の分子疫学.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.919-923 (2015)

わが国のハトにおけるトリパラミクソウイルス 1 型 (APMV-1) の疫学を理解するために, 2011 年 6 月から 2013 年 3 月にかけて, 40 都道府県で収集した糞便を用いてウイルスサーベイランスを行った。分離された株と

過去の国内分離株を用いて分子疫学的解析を行い, 海外分離株と比較した。サーベイランスの結果, 合計 1021 検体から 1 株の APMV-1 が分離された。F 蛋白遺伝子の開裂部位を含む部分塩基配列に基づく分子疫学的解析の結果, わが国でハトから分離された APMV-1 はすべて単一の遺伝子型 VIb/1 に属していた。これらの株はさらに 4 つのグループに細分された。各グループの株は特徴的な F 蛋白開裂部位のアミノ酸配列を示した。これらの結果は, わが国のハトにおける APMV-1 は多様であり, また海外から複数のルートで侵入し続けている可能性を示唆する。

増田恒幸, 村上 聡, 高橋 理, 宮崎綾子, 大橋誠一, 山里比呂志, 鈴木 亨

スパイク遺伝子に大きな欠失を有する豚流行性下痢ウイルス野外変異株の発見.

Archives of Virology. 160 (10), p.2565-2568 (2015)

2013 年 10 月から我が国では, 豚流行性下痢 (PED) が流行し, これまでに約 1,000 戸の農場において発生が報告されている。2014 年 10 月, 鳥取県では県内 2 例目の PED 症例が報告されたが, その症例では最近の PED 症例で認められる哺乳豚での死亡が確認されなかった。そこで, 著者らはその理由を探るために, Vero 細胞で分離したウイルス株 (Tottori2) について, 次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を解読し, 既報の PED ウイルス株との間で遺伝子配列の比較・解析を実施した。その結果, Tottori2 株は既報の PED ウイルス株とは異なり, スパイク蛋白質をコードする S 遺伝子に関して, 582 塩基の欠損が認められることが明らかとなった。さらに, Tottori2 株の全ゲノム配列に最近の世界各国 (特に米国) で検出された流行株の全ゲノム配列情報を加えて分子系統樹解析を実施した結果, Tottori2 株は最近の我が国を含む世界各国における流行株と極めて近縁であり, それら流行株から自然突然変異により派生したことが示唆された。

舛甚賢太郎, 岡田洋之, 宮澤光太郎, 松浦裕一, 今村守一, 岩丸祥史, 村山裕一, 横山 隆

H 型非定型牛海綿状脳症 (BSE) から新規 BSE の出現.

Scientific Reports. 6, 22753 (2016)

H 型非定型 BSE を牛型マウスで継代すると, 従来知られていなかった新たな BSE が出現することを示した。このプリオンは牛に対しても病原性を示し, 新たなリスクとなる危険性が示唆された。この結果は, 従来型

BSEが清浄化された後も、孤発性に生じる可能性のある非定型BSEの牛群内での循環を防止する必要性、すなわち動物性蛋白質の飼料規制の継続の必要性を示す。

松林 誠, 金森健太, 貞弘真行, 所 正治, 阿部仁一郎, 播谷 亮, 芝原友幸

日本の子豚における初めての *Entamoeba polecki* の分子生物学的同定と *Lawsonia intracellularis* との混合感染による回腸炎の増悪.

Parasitology Research. 114 (8), p.3069-3073 (2015)

アメーバは、ヒトを含む多くの脊椎動物で確認されている。豚では3種類のアメーバ(*E. suis*, *E. polecki* 及び *E. histolytica*) が確認されているが、これらの病原性は不明な点が多い。慢性下痢がみられた3頭の子豚について細菌学的、ウイルス学的及び病理組織学的検査を実施した。2頭は、*Lawsonia intracellularis* に感染し増殖性回腸炎に罹患していた。アメーバに感染した子豚では、栄養体(1核。約10~15 µm)が固有層に侵入し、潰瘍及び偽膜の形成により病変が重度になっていた。遺伝子分析により、このアメーバは *E. polecki* (99.5%の相同性) と同定された。ヒトまたは動物における *E. polecki* は、単独感染では病原性は低いものの、*L. intracellularis* を含む他の病原体と混合感染することにより、その病態を悪化させると考えられた。

松林 誠, 村越奈穂子, 小松徹也, 所 正治, 播谷 亮, 芝原友幸

日本の豚における *Entamoeba polecki* サブタイプ3の遺伝学的同定と潰瘍性大腸炎におけるその病原性の役割.

Infection, Genetics and Evolution. 36, p.8-14 (2015)

豚では3種類のアメーバ(*E. suis*, *E. polecki* 及び *E. histolytica*) が確認されているが、これらの病原性および分子生物学的特徴は不明な点が多い。下痢を呈した豚3頭を病性鑑定したところ、アメーバがみられた。病理組織学的に、盲腸及び結腸で重度の潰瘍性腸炎がみられた。多くの栄養体がびらんまたは潰瘍病変に確認された。アメーバの種を同定するためにリボソーム小サブユニットRNA(SSU rRNA)系統解析を実施したところ、*E. polecki* サブタイプ3であることがわかった。

水戸友美, 吉岡耕治, 野口倫子, 山下祥子, 三角浩司,

星 翼, 星 宏良

化学的組成の明らかな保存液でガラス化保存したブタ体外生産胚盤胞由来産子の作出.

Theriogenology. 84 (8), p.1314-1320 (2015)

化学的組成の明らかな保存液でガラス化保存したブタ体外生産胚の発生ステージ、日齢およびPBMでの後期培養が、ガラス化融解後の胚生存性に及ぼす影響を検討した。PZM-5で体外培養した媒精後4および5日目の胚は、さらに1~2日間PZM-5あるいはPBMで培養して、媒精後5および6日目の胚盤胞と拡張胚盤胞を作製し、クライオトップ法でガラス化した。ガラス化胚は融解後、10%ウシ胎子血清添加PBMで培養し、生存率および孵化率を調べた結果、ブタ体外生産胚では胚盤胞に比べて拡張胚盤胞で耐凍性が高く、媒精後5日目以降にPBMで培養すると6日目胚の耐凍性が向上した。さらに、媒精後5および6日目のガラス化保存拡張胚盤胞をレシピエントに移植したところ、媒精後5日目胚の移植では3頭すべて、媒精後6日目胚の移植では3頭中1頭が分娩し、発生ステージや培養条件は、ブタ体外生産胚の耐凍性に大きく影響することが示唆された。

宮澤光太郎, 岡田洋之, 舛甚賢太郎, 岩丸祥史, 横山 隆

マウス BSE プリオンには感染性に関与する PrP^{Sc} と病態の進行に関与する PrP^{Sc} の存在が示唆される.

PRION. 9 (5), p.394-403 (2015)

ウシのプリオン病である牛海綿状脳症(BSE)は、脳内への異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の蓄積を特徴とし、人を含む様々な動物種に感染する人獣共通感染症である。PrP^{Sc}はプリオン病を診断する唯一の指標として利用されている。本研究では、マウス馴化BSE感染脳乳剤をマウスに脳内接種後、経時的に脳組織を採取してPrP^{Sc}蓄積量とその感染価を調べ、感染後期においては両者が必ずしも一致しないことを示した。さらに、感染末期の脳乳剤を20,000×g、10分遠心後の上清に残存する比較的小さなPrP^{Sc}凝集体の感染価は高く、遠心により沈殿する大きなPrP^{Sc}凝集体は、死に至るまでの生存日数に影響を与える可能性があることを示した。以上の結果から、サイズの異なるPrP^{Sc}凝集体はプリオン病の進行過程において果たす役割が異なることが示唆された。

森岡一樹, 深井克彦, 吉田和生, 北野理恵, 山添麗子,

山田 学, 西 達也, 菅野 徹

迅速に口蹄疫ウイルスの検出および血清型別が可能なラテラルフローシステムの開発と評価.

PLoS ONE. 10 (8), e0134931. doi: 10.1371. (2015)

我々はモノクローナル抗体を用いて、迅速に口蹄疫ウイルスの検出および血清型別が可能なラテラルフローシステムを開発した。この口蹄疫ウイルス血清型別用ストリップは口蹄疫ウイルス全7血清型の検出と血清型O,A,CおよびAsia1の型別が可能であり、検出感度は概ね $10^3 - 10^4$ TCID₅₀程度であり、市販品Svanodipと同等の感度を示した。また、臨床検体118サンプルを用いて評価した結果、高い検出感度とELISAおよびRT-PCRと相関した高い特異性を示した。

本法は特別な装置を必要とせず、ウイルス検出と血清型別を同時に行える方法で、これまでに報告されていない。

本法は診断施設および機器の不足している国での口蹄疫の診断に活用されることが期待される。

村上 聡, 宮崎綾子, 高橋 理, 橋爪 渉, 長谷要一, 大橋誠一, 鈴木 亨

豚流行性下痢ウイルス Tottori2/JPN/2014 の全ゲノム配列.

Genome Announcement. 3, e00877-15 (2015)

2013年10月から我が国では7年ぶりに豚流行性下痢(PED)が発生した。2014年10月、鳥取県では県内2例目のPED症例が報告されたが、その症例では最近のPED症例で認められる哺乳豚での死亡が確認されなかった。そこで、著者らはその理由を探るために、次世代シーケンサーを用いて、そのPEDウイルス株(Tottori2/JPN/2014)の全ゲノム配列を解読する方法を考案した。PEDウイルス株のゲノムRNAを常法に従って、逆転写反応し、引き続き独自にデザインした特異的プライマーを用いてゲノム全長を増幅した。その増幅したゲノム全長をIon PGM(サーモフィッシュサイエンス社)を用いて、マニュアルに従って解読した。最終的に、解読したTottori2/JPN/2014株の全長は27342塩基であり(GenBankアクセッション番号:LC022792)、USA/Colorado/2013株(28038塩基)と比較すると、約700塩基短く、この相違は5'末端および3'末端における未解読配列とスパイク蛋白質をコードするS遺伝子における欠損(582塩基)に起因することが明らかとなった。

村田洋介, Chambers, J.K., 内田和幸, 中島 亘, 花房泰子,

生澤充隆, 中山裕之

Graphium 属真菌による犬の真菌性動脈瘤.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (10), p.1285-1288 (2015)

犬, 雑種, 10歳, 去勢雄が、嘔吐, 嗜眠および食欲不振を示した。腹部超音波検査により腹部大動脈の巣状拡張が認められた。犬は、検査後2日目に死亡。剖検により、腎臓周囲の腹部大動脈に動脈瘤破裂が認められた。病理組織学的検査により、真菌を含む重度の肉芽腫と壊死性汎動脈炎が明らかとなった。ホルマリン固定-パラフィン包埋サンプル由来DNAを用いたDNA塩基配列の解析により、Graphium属真菌が同定された。これは、犬におけるGraphium属真菌による真菌性大動脈瘤の初報告である。

村山裕一, 小野文子, 下寄紀子, 柴田宏昭

アルギニンエチルエステルはL型非定型牛海綿状脳症に感染したマカクサル由来の異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の試験管内増幅を増強し、体液中のPrP^{Sc}の発症前検出を可能にする.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 470 (3), p.563-568 (2016)

血液や尿, 唾液等の体液類に含まれるプロテアーゼ耐性の異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})はプリオン病の診断マーカーとして有用であり、非ヒト霊長類モデルはヒトクロイツフェルト・ヤコブ病の診断法の有効性評価に適している。我々は、L型非定型牛海綿状脳症(L-BSE)に感染したマカクサルに由来するPrP^{Sc}の効率的な増幅方法を開発するため、ポリアニオンとアルギニンエチルエステルを含むマウス脳乳剤を増幅基質に用いた。この方法は非常に高感度であり、感染脳乳剤を100億倍に希釈したサンプルからもPrP^{Sc}を検出可能であった。リンタングステン酸沈殿法を併用すると、L-BSE脳内接種サルの脳脊髄液(CSF), 唾液, 尿や血漿に含まれる極少量のPrP^{Sc}が検出可能になり、さらに発症前に採取された唾液や尿およびCSFサンプルからもPrP^{Sc}が検出された。このように我々の新しい方法により、非ヒト霊長類モデルにおけるPrP^{Sc}の体液漏出に関して理解が深まると期待される。

村山裕一, 吉岡都, 岡田洋之, 高田依里, 舛甚賢太郎,

岩丸祥史, 下嵯紀子, 山村友昭, 横山 隆, 毛利資郎,
堤 祐司

亜臨界水による加水分解処理は牛海綿状脳症プリオンの試験管内増幅活性を効果的に減少させるが、感染性は不活化できない。

PLoS ONE. 10(12), e0144761 (2015)

牛海綿状脳症 (BSE) の世界的な発生は、汚染された肉骨粉を餌として再利用したことに起因する。BSE プリオンを不活性化できれば、肉骨粉を有機資源として安全に利用できる可能性がある。水の臨界点 (374 °C) よりもやや低い近傍の領域の水の状態を亜臨界水といい、有機化合物に対して強い加水分解活性を示す。本研究では BSE 感染牛の脊髓乳剤を用いて、230 ~ 280 °C で 5 ~ 7.5 分間の亜臨界水処理を行い、残存する異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) や感染性を解析した。亜臨界水処理後のサンプルでは、蛋白質ミスフォールディング循環増幅法 (PMCA) 解析により PrP^{Sc} は検出されず、脳内接種マウスも発症しなかった。しかしながら、接種マウスの脳を PMCA 解析したところ、すべてのマウスに PrP^{Sc} が蓄積している事が判明し、その脳乳剤を別のマウスに脳内接種すると発症する例が認められた。したがって、上記の亜臨界水処理条件下では、BSE プリオンの感染性は不活化されないと考えられる。

中村菊保, 藤森秀雄, 小山亜紀子, Dai,T.Q., 今井邦俊,
生澤充隆, 山本 佑

神経症状を示したドバトにおけるホルマリン固定パラフィン包埋切片からのトリパラミクソウイルス 1 型の遺伝子検出と免疫組織化学。

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (7), p.837-841 (2015)

神経症状 (ふらつき, 回転行動, 斜頸) を示した 4 羽のドバト (No. 1-4) が病理学的, 微生物学的に検査された。4 羽の気管スワブとクロアカスワブからのウイルス分離は陰性であった。また No.1 と 2 の肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 脳からもウイルスは分離されなかった。4 羽からウイルスは分離されなかったが, 4 羽はトリパラミクソウイルス 1 (APMV-1) に対して高い血中抗体を有していた。組織学的に, ドバトは APMV-1 感染症に特徴的な病変を有しており, 非化膿性脳炎, 間質性腎炎が観察された。APMV-1 抗原を検出する免疫組織化学では, 1 羽 (No.3) の腎臓の壊死性尿細管上皮細胞で抗原が検出された。RT-PCR によって, パラフィン包埋切片から APMV-1 遺伝子を試みた。塩基配列解析の結果, 腎臓から検出され

た PCR 産物の遺伝子配列は, 過去に鳩から分離された APMV-1 株 (遺伝子型 VI) の配列と一致していた。本事例のように, ウイルス分離に適した新鮮な検査材料が得られない場合, パラフィン包埋切片を用いた遺伝子解析が, ウイルスの分子疫学解析に有用であることが示唆された。

根本 学, 尾宇江康啓, 村上 聡, 菅野 徹, 坂内 天,
辻村行司, 山中隆史, 近藤高志

馬コロナウイルス日本分離株の全ゲノム解析。

Archives of Virology. 160 (11), p.2903-2906 (2015)

馬コロナウイルスによる熱性消化器病の集団発生についての報告は米国や日本からなされているが, ウイルス分離およびその全ゲノム解析に関しては米国の NC99 株についての報告のみであった。本研究で我々は日本における 2009 および 2012 年の集団発生例時の糞便材料から分離されたウイルス 3 株の全ゲノム解析を行った。Tokachi09, Obihiro12-1 および Obihiro21-2 と命名したウイルスの総塩基長は 3' 末端の poly(A) 配列を除きそれぞれ 30,782, 30,916 および 30,916 ベースであった。3 つの分離ウイルスは NC99 株と高い相同性 (98.2-98.7%) を示したが, ORF1a の nsp3, NS2 および p4.7 領域に遺伝子欠失や挿入も認められた。

Nguyen,V.T., Iwata,T., Kusumoto,M., Akiba,M.

リポオリゴサッカライドコア糖鎖の欠損は、好気環境における *Campylobacter jejuni* のガラス付着性およびバイオフィーム形成能に影響する。

JARQ. 49 (3), p.269-275 (2015)

カンピロバクター食中毒は主として *Campylobacter jejuni* に引き起こされる細菌性食中毒である。*C. jejuni* の外膜には糖脂質の一種であるリポオリゴサッカライド (LOS) が存在しており, 細菌外膜に埋め込まれたリピド A から, 細胞外に糖鎖 (内部コア領域および外部コア領域) が突き出す形で菌体表面を覆っている。本研究では, *C. jejuni* NCTC11168 および 81-176 株から作出した様々な LOS 糖鎖長の変異株を用い, LOS 糖鎖の欠損が, 好気環境における *C. jejuni* のガラス付着性, 自己凝集性, 細胞外 DNA 分泌能および試験管内のバイオフィーム形成能にどのように影響するかを調べた。その結果, 好気環境においては LOS 糖鎖欠損がガラス表面への付着, 自己凝集性, バイオフィーム形成に影響することが示唆された。また, バイオフィーム形成能の変化は付着性と相関しており, 自己凝集性や細胞外 DNA 分泌能

とは相関していなかった。以上のことから、微好気性細菌である本菌が増殖できない好気環境であっても、LOS糖鎖欠損により *C. jejuni* のガラス付着性が上昇することでバイオフィーム形成能が上がると思われた。

野口倫子, 吉岡耕治, 彦野弘一, 鈴木千恵, 菊地和弘
ブタ凍結精子の性状および子宮深部授精後の生殖道内分布における精液希釈液の影響.

Animal Reproduction Science. 163, p.164-171 (2015)

ブタ凍結精液の融解精子の性状および定時子宮深部授精後の生殖道内分布における精液希釈液（モデナ液およびPFM）の影響を調べた。PFMでは直進運動精子や先体膜損傷精子の割合がモデナ液に比べ高かった。また、PFMではモデナ液に比べ子宮内多形核白血球数は少なく、白血球に貪食されない精子数が増加した。22頭のブタに、それぞれの希釈液で融解した精液を子宮深部授精したところ、モデナ液では36%、PFMでは64%の妊娠率を得た。PFMを凍結精液融解液とした場合、精子の直進運動性を高めるとともに子宮内の多形核白血球の遊走を抑制して受胎性を高めることが示唆された。

岡田洋之, 舩甚賢太郎, 宮澤光太郎, 横山 隆
羊で継代したL型非定型BSEは野生型マウスへの伝達性を獲得する.

Veterinary Research. 46: 81 (2015)

プリオン蛋白質のアミノ酸配列がA₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ホモ接合であるチェビオット羊で継代したL型非定型牛海綿状脳症（BSE）プリオンを野生型マウスに脳内接種し、L型BSEが種の壁を超えてマウスに伝達するかを検討した。羊で継代したL型BSEは約2年間の野生型マウス生存期間中に臨床学的神経症状を示す個体はいなかったが、15匹中1匹（710 dpi）の脳に、さらに15匹中9匹（200-765 dpi）のリンパ系組織に異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）蓄積が検出され、羊で継代したL型BSEの野生型マウスへの伝達に成功した。さらにPrP^{Sc}が蓄積していた脾臓をマウスに継代接種したところ、接種後600日まで発症個体はいなかったが、すべてのマウスで花弁状のアミロイド斑が主に大脳皮質と海馬に蓄積していた。PrP^{Sc}の分子量はL型BSEに感染した牛、羊さらに牛型プリオン過発現マウスのそれらよりも高かったが、糖鎖パターンは類似していた。これらの結果から、野生型マウスでのL-BSEの生物学的ならびに生化学的性状は定型C-BSE、H型BSEと異なっていた。現在、馴化株を得るべく3代目に継代中である。

岡田洋之, 舩甚賢太郎, 宮澤光太郎, 横山 隆
ハムスター型プリオン蛋白質過発現マウスにH型非定型BSEは伝達する.

PLoS ONE. 10 (10), e0138977 (2015)

神経細胞にハムスターのプリオン蛋白質（PrP）を特異的に発現する遺伝子改変（TgHaNSE）マウスにH型非定型牛海綿状脳症（BSE）プリオンを脳内接種し、H型BSEが種の壁を超えて伝達するかを検討した。H型BSE感染脳乳剤をTgHaNSEマウスに脳内接種後、生存期間中の約2年間に発症はなかったが、解剖したマウス4匹中3匹の脳に異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）が蓄積していた。さらにTgHaNSEマウスへ継代接種したところ、全頭が接種後230日までにプリオン病に特徴的な臨床学的神経症状を呈したが、PrP^{Sc}脳内蓄積パターンは定型（C-）BSE及びL-BSEのそれとは異なっていた。牛型プリオン過発現（TgBoPrP）マウスに戻し伝達を行ったところ、PrP^{Sc}の生物学的及び生化学的性状はH型BSEに感染したTgBoPrPマウスのそれと類似しており、固有宿主での性状に戻るトレースバック現象が確認された。この成績は、プリオンが異種間伝達する間に株特異的性状を宿主の環境に応じて柔軟に変化させる表現型の可塑性を有していることに関係する、と示唆された。

岡川朋弘, 今内 覚, 西森朝美, 池淵良洋, 溝呂木聖子, 永田礼子, 川治聡子, 田中省吾, 賀川由美子, 村田史郎, 森 康行, 大橋和彦

ウシの免疫抑制受容体を介したヨーネ菌特異的T細胞応答の疲弊化.

Infection and Immunity. 84 (1), p.77-89 (2016)

ヨーネ病は、ヨーネ菌感染による慢性肉芽腫性腸炎で、病態進行に伴うT細胞応答の疲弊化を特徴とする。ヨーネ菌感染牛における免疫抑制受容体PD-1/PD-L1, LAG-3/MHC-IIの発現解析と機能解析を行った。フローサイトメトリー法により、感染牛T細胞におけるPD-1及びLAG-3の発現上昇を認めた。これにより、ヨーネ菌抗原に対するIFN-γ応答が抑制された。また、感染牛マクロファージにおいてPD-L1及びMHC-IIの発現が認められた。さらに、PD-L1及びLAG-3経路を抗体で阻害すると、感染牛におけるヨーネ菌特異的なT細胞が活性化され、IFN-γ応答が上昇した。PD-1/PD-L1, LAG-3/MHC-IIの相互作用により、ヨーネ菌特異的T細胞は疲弊化し、LAG-3はヨーネ菌特異的T細胞応答の制御因子となりうることが示唆された。

大岡唯祐, 小椋義俊, 桂 啓介, 勢戸和子, 小林秀樹, 河野喜美子, 徳岡英亮, 古川真斗, 原田誠也, 吉野修司, 瀬戸順次, 池田徹也, 山口敬司, 村瀬一典, 後藤義孝, 藺牟田直子, 西順一郎, Gomes, T.A., Beutin, L., 林 哲也

大腸菌と緊密な関係にある新興腸管病原体である *Escherichia albertii* のゲノム機能の定義.

Genome Biology and Evolution. 7 (12), p.3170-3179 (2015)

Escherichia albertii は, 近年認識された大腸菌 (*Escherichia coli*) の近縁種である。この新興腸管病原体は, 腸管病原性および腸管出血性大腸菌 (EPEC と EHEC) に似た腸管粘膜細胞消失に関与する遺伝子群によってコードされた III 型分泌システム (T3SS) を有する。また, 当該菌種は志賀毒素産生株も同定されている。*E. albertii* のゲノムの特徴として他の大腸菌種との特異的な違いはまだ十分に解明されていない。ここでは, 29 株の *E. albertii* (3 株は全ゲノム解析完了, 26 株はドラフト配列) のゲノム配列を決定し, ゲノム間比較を行った。*E. albertii* ゲノムの大きさは大腸菌株のものよりも小さい 4.5 から 5.1 MB の範囲であった。同族菌種間のゲノムの比較は, *E. albertii* の 5 つの phylogroup で実施した。ゲノム比較により *E. albertii* の推定されるコアゲノムは大腸菌が 1345 遺伝子を含むのに対し, 3250 遺伝子を含むことを明らかにした。我々の分析はさらに, 既知の生化学的特徴や毒性因子と大腸菌で不活性化されている ETT2 (大腸菌 T3SS 2) として知られている第 2 の T3SS が *E. albertii* ではおそらく発現可能であるなどのいくつかのユニークなまたは顕著な遺伝的特徴を明らかにした。この生物は, in vitro では非運動性であることが観察されたが, 鞭毛合成のための遺伝子は完全に保存されている。走化性関連遺伝子は選択的に削除されていた。これらの結果に基づき, 我々は, *E. albertii* を検出するための nested-PCR 系を開発した。我々のデータは, *E. albertii* ゲノムの特徴を定義し, この重要な新興腸管病原細菌の将来研究のための貴重な基礎知見を提供した。

坂上信忠, 西田浩司, 三角浩司, 平山祐理, 山下祥子, 星 宏良, 御澤弘靖, 秋山 清, 鈴木千恵, 吉岡耕治

マイクロボリュームエアークーリング法でガラス化保存したブタ体内発育胚の呼吸量と生存性との関係.

Animal Reproduction Science. 164, p.40-46 (2016)

本研究では, ブタ体内発育胚のガラス化加温後の呼吸量と生存性を検討した。人工授精後 6 日目に回収したブタ胚盤胞の呼吸量を測定し, マイクロボリュームエアー

クーリング法でガラス化保存した。生存性を評価するため, ガラス化保存胚 60 個の呼吸量を 48 時間培養後に測定した。加温後の生存率 (胞胚腔の再拡張率) は 85.0% であった。培養後に胞胚腔が再拡張した胚の加温直後の平均呼吸量 ($F = 0.75 \pm 0.04$) は, 再拡張しなかった胚の平均呼吸量 ($F = 0.33 \pm 0.05$) と比較して高かった。さらに培養後に透明帯から脱出した胚の平均呼吸量 ($F = 0.88 \pm 0.06$) は脱出しなかった胚 ($F = 0.53 \pm 0.04$) と比較して有意に高かった。ガラス加温胚の呼吸量と生存細胞, 死滅細胞数の関係を解析すると, 呼吸量と生細胞数との間に正の相関があった ($P < 0.01$, $R = 0.538$)。ガラス化加温後に呼吸量を測定した 29 個の胚を外科的に 2 頭の受胎豚の子宮角に移植した結果, 2 頭とも受胎し 12 頭の正常な子豚を分娩した。以上より, ガラス化加温後のブタ胚の呼吸量は生存細胞数と関係があり, 呼吸量の測定は胚の生存性評価に有用であることが示された。

坂上信忠, 西田浩司, 三角浩司, 平山祐理, 星 翼, 星宏良, 中野貞雄, 秋山 清, 鈴木千恵, 吉岡耕治

新しい輸送器を用いてブタ胚を凍結せずに長距離輸送に成功.

Journal of Mammalian Ova Research. 32 (3), p.121-127 (2015)

本試験では, 振動がブタ体内生産胚に与える影響と化学的合成培地 (PBM) を用いてストローに密封した場合とガス濃度を調整して輸送した場合の発育性を調査した。人工授精後 5 日目に外科的に胚を採取し, PBM と共にストローに入れ, 振動試験機で 20 時間振動したところ, 振動を与えない区と同等の生存率であった。次に PBM を用いてストロー内に胚を入れた密封区と, 炭酸ガス濃度 5%, 温度 38 °C を維持可能な輸送器で, サンプリングチューブ内に PBM と共に胚を入れたガス濃度調整区で, 胚を宅配便で約 22 時間輸送したところ, ガス濃度調整区では, 輸送しない場合と同等の生存率 (輸送区 100%, 非輸送区 97.4%), 透明帯脱出率 (輸送区 57.9%, 非輸送区 47.5%) が確認された。これらのことから, PBM と試作した輸送器で輸送したブタ胚は, 輸送しない場合と同等の発育性を示すことが明らかとなった。

Samy, A.A., El-Enbaaway, M.I., El-Sanousi, A.A., Nasel, S.A., Naguib, M.M., Abdelwhab, E.M., 彦野弘一, 西藤岳彦

クレード 2.2.1.1 及び 2.2.1.2 に属するエジプトで分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する鶏の異なった宿主免疫応答.

Veterinary Microbiology. 183, p.103-109 (2016)

エジプトでは、古典的 2.2.1.2 及び変異型 2.2.1.1 というクレードに属する高病原性鳥インフルエンザウイルスが存在する。本研究では、古典的ウイルス (C121) と変異型ウイルス (V1063) に対する鶏の免疫応答を比較した。非免疫鶏では、C121 ウイルスがより効率的に増殖した。C121 と V1063 は共に、ウイルス接種 48 時間後のインターフェロン (IFN)- γ およびインターロイキン (IL)-10 の遺伝子発現を増加させたが、肺および脾臓におけるこれらのサイトカインのレベルは、C121 に感染したニワトリで低かった。対照的に、不活化 C121 ワクチンを接種した鶏では C121 の増殖は低く、C121 及び V1063 による攻撃では IFN- γ 遺伝子発現は増加しなかったが C121 攻撃では、IL-4 遺伝子の発現が増加した。これらの結果 HPAI ウイルスの病原性は非免疫鶏での IFN- γ を産生するヘルパー又は細胞傷害性 T 細胞応答と相関し、一方でワクチン効果は肺での IL-4 産生ヘルパー T 細胞応答と相関することを示唆している。この事は、従来の血清 HI 力価に加えて、肺における IL-4 活性がアジュバントやブライム/ブースト法のような新規のワクチン戦略のスクリーニングに活用できることを示唆している。

白藤浩明, 矢崎 竜, 首藤洋三, 梁瀬 徹, 加藤友子, 石倉洋司, 坂口善二郎, 鈴木萌美, 山川 陸

新たに開発した TaqMan 法による Simbu 血清群 lineage 1 のアルボウイルスの広範な検出ならびにアカバネ, アイノ, ピートン各ウイルスの特異的検出.

Journal of Virological Methods. 225, p.9-15 (2015)

オルソブニヤウイルス属 Simbu 血清群において lineage 1 に分類されるアルボウイルスを広範に検出し、かつ同 lineage に含まれるアカバネウイルス (AKAV), アイノウイルス (AINOV), ピートンウイルス (PEAV) をそれぞれ特異的に検出するマルチプレックス TaqMan 法を開発した。本研究では、おもに AKAV, AINOV, PEAV, サシペリウイルス (SATV), シャモンダウイルス (SHAV) といったアルボウイルスを広範に検出するため、1 組のプライマー・プローブセットを設計した (Pan-Simbu set)。また、Pan-Simbu set のプライマー

は、AKAV 検出用のプローブと組み合わせて使用することとし、これらをアカバネウイルス特異的検出用のプライマー・プローブセット (AKAV-specific set) とした。さらに、AINOV と PEAV を特異的に検出するためのプライマー・プローブセットをそれぞれ設計し (AINOV-specific set, PEAV-specific set), 計 4 組のプライマー・プローブセットを使用することとした。これらのセットは、本研究で供試した標的ウイルス (AKAV, AINOV, PEAV, SATV, SHAV) の遺伝子をすべて検出することが可能であった。また、TaqMan プローブのレポーター色素を 2 種類使用し、クエンチャー色素として BHQ を使用することで、2 組のプライマー・プローブセットを 1 つのチューブに混和して使用することも可能であり、さらに、牛ベータアクチン遺伝子検出用のプライマー・プローブセットと併用することも可能であった。本法による 1 反応当りの検出限界は、AKAV が 10 コピー、AINOV と PEAV が 100 コピー、SATV が 1 コピー、SHAV が 10 コピーであった。また、野外材料を用いて本法の有用性を検証したところ、既存のコンベンショナル RT-PCR 法と同等以上の検出感度を有することが示された。これらの結果から、本法は AKAV をはじめとした Simbu 血清群 lineage 1 のアルボウイルスを野外材料から検出する方法として有用と考えられる。

白岩和真, 小川洋介, 江口正浩, 彦野弘一, 楠本正博, 下地善弘

豚丹毒菌生ワクチン株と野生株とを迅速に識別できる PCR 法の開発.

Journal of Microbiological Methods. 117, p.11-13 (2015)

生ワクチン株と野外分離株との識別は、感染症をコントロールする上で重要である。我々は豚丹毒菌生ワクチン株と参照株の比較ゲノム解析により同定した一塩基多型を利用し、生ワクチン株と野外株とを識別できる PCR 法を開発した。

鈴木千恵, 坂口陽祐, 星 宏良, 吉岡耕治

豚後期胚培養用培地への AlbuMAX 添加が豚体外生産胚盤胞の体外発生に及ぼす影響.

Journal of Reproduction and Development. 62 (1), p.79-86 (2016)

豚体外生産胚の孵化率改善を目的に、脂質含有量が多い牛血清アルブミン AlbuMAX (AM) の豚後期胚培養用培地 (PBM) への添加が豚体外生産胚盤胞の発生に及ぼす影響について調べた。媒精後 6 日目 (D6) 胚の

部分孵化及び完全孵化率は 1 mg/ml 以上或いは 5 mg/ml AM 添加で、D7 胚は各々 0.5 mg/ml 以上或いは 1 または 5 mg/ml AM 添加で無添加に比べ有意に増加した。1 mg/ml AM 添加の D6 胚の部分孵化及び D7 胚の部分・完全孵化率は PBM, 1 mg/ml ヒト血清アルブミン又は 1 mg/ml BSA 添加に比べ有意に増加したが、細胞数及びアポトーシス指数に差はなかった。D6 及び D7 胚の直径と ATP 含有量は、1 mg/ml AM 添加で無添加と比べ有意に増加したが、ミトコンドリア膜電位は処置による差を認めなかった。D7 胚の脂肪酸代謝酵素の mRNA 発現量は、1 mg/ml AM 添加で無添加と比べ有意に増加した。これより、PBM への AM 添加は孵化率、胚盤胞細胞数及び ATP 含有量を増加させることが判明し、AM に含まれる脂質/脂肪酸がこれらを促進している可能性が示された。本研究は、農水省・農食事業の助成を受けた。

鈴木里和, 大西 守, 川西路子, 秋庭正人, 黒田 誠
プラスミドゲノムデータベースにおけるコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* の探索.

Lancet Infectious Diseases. 16 (3). p.284-285 (2016)

GenEpid-J はプラスミドに着目したゲノム科学と疫学の統合データベースとして 2014 年に開始された。2015 年 11 月現在、グラム陰性桿菌 671 株の 1,747 プラスミドのデータが GenEpid-J に格納されている。671 株の内訳は、入院患者由来が 431 株、動物由来株が 184 株、環境由来が 56 株である。

Liu らが中国におけるプラスミド媒介性コリスチン耐性遺伝子、*mcr-1* を報告したことを受け、GenEpid-J データベースを検索したところ、動物由来 5 株のプラスミドが *mcr-1* 遺伝子を保有していたが、*mcr-1* 遺伝子を保有する入院患者由来株はなかった。これらの 5 つプラスミドは *mcr-1* 遺伝子以外の薬剤耐性遺伝子を保有しておらず、Liu らが報告した pHNSHP45 のプラスミドと極めて類似した塩基配列であった。

日本の家畜 (food-producing animal) における *mcr-1* 遺伝子の分布状況を調べるため、家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング (JVARM) で収集した大腸菌を調査した。2000 ~ 2014 年に分離された 9,308 株の大腸菌のうち、90 株 (1.0%) が寒天平板希釈法もしくは微量液体希釈法で測定したコリスチンの MIC が 8 以上であった。これらの 90 株について PCR で *mcr-1* 遺伝子を検査したところ、2008 年と 2010 年に分離された 2 株のみが *mcr-1* 遺伝子陽性であった。

鈴木 亨, 村上 聡, 高橋 理, 伊藤咲江, 小寺 文, 宮崎綾子, 大橋誠一, 筒井俊之

2013 年から 2014 年にかけて我が国で分離された豚流行性下痢ウイルスの分子生物学的特徴.

Infection, Genetics and Evolution. 36, p.363-368 (2015)

2013 年 10 月から我が国では 7 年ぶりに豚流行性下痢 (PED) が流行し、これまでに約 1,000 戸の農場において発生が確認された。著者らはこの PED の流行要因を探るために、2013 年から 2014 年にかけて 18 県 38 農場で検出された PED ウイルス株について全ゲノム配列を解読し、近年の世界各国で検出された PED ウイルス流行株との遺伝的類縁関係を明らかにすることを試みた。ゲノム配列を解読した 38 株の中に、S 遺伝子、ORF3 遺伝子において、それぞれ 582 塩基、412 塩基の欠損を持つ株が認められた。38 株の国内流行株に国外流行株の遺伝子情報を加えて、S 遺伝子、全ゲノム配列について分子系統樹解析を実施した。S 遺伝子に関して、国内流行株は北米型 34 株、INDELs 型 4 株に大きく分類された。また、過去に我が国で流行した株とは遺伝的に大きく異なることも明らかとなった。さらに全ゲノム配列に関しては、2013 年以降北米および韓国で流行している株と遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。これらのことから、2013 年以降の我が国における PED の流行は近年の国外流行株の侵入によってもたらされたことが示唆された。

鈴木史子, 木村久美子, 浦川 了, 楠田幸雄, 田中省吾, 花房泰子, 播谷 亮

マゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*) にみられた *Rhizomucor pusillus* による肉芽腫病変の病理組織学的多様性.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.1029-1031 (2015)

ペンギンの接合菌症の病理組織学的検査において、無数の孢子嚢胞子と孢子嚢、および菌糸の多様性が観察されたので報告する。症例は 4.5 歳のマゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*) で、食欲不振、発育不良、開口呼吸を呈して死亡した。剖検では胸部および腹部に多数の結節状病変が観察された。病理組織学的に肺、気嚢および結節性病変に様々な大きさ・太さの菌糸が観察された。また、気管支あるいは傍気管支の腔内あるいは周囲に孢子嚢が散見され、非常に多くの孢子嚢胞子を伴っていた。結節病変では、菌糸巾が非常に細く短い菌糸が多数観察され、これらの形態は接合菌の特徴と

は一致していなかった。しかしながら、結節病変内の菌糸を含むほとんどの菌糸、孢子嚢胞子および孢子嚢が免疫組織化学的に接合菌抗体に対して陽性を呈した。更に、これらの菌糸は遺伝子解析によっても *Rhizomucor pusillus* と同定された。

高松仁美, 照井和哉, 國保健浩

牛疫予防液製造用国内株 LA-AKO の全ゲノム解析.

Genome Announcements. 3 (5), e00976-15 (2015)

日本の牛疫予防液製造用株である LA-AKO IV は家兎化牛疫ワクチン株である中村 III 株から、さらに家兎ならびに鶏胚で継代することにより樹立された。LA-AKO IV は日本産黒毛和牛や韓国産黄牛と言った感受性動物に対しても親株より病原性が減弱されており、アジア地域で使用されてきた。現在、緊急備蓄用ワクチンの製造用株として承認、利用されているこの LA-AKO IV のゲノムを解読したので報告する。

高梨 暁, 野地智法, 阿部未来, 板谷奈波, 浦川めぐみ, 佐藤勝祥, Zhuang,T., 梅村紗緒里, 林 智人, 菊 佳男, 北澤春樹, Rose,M.T., 渡邊康一, 麻生 久

外分泌型シクロフィリン A はウシ炎症性細胞に対して走化性活性を持っている.

Veterinary Research. 46: 80 (2015)

シクロフィリン A (CYPA) は、免疫抑制剤のシクロスポリン A の細胞質ゲル結合タンパク質としてウシ胸腺組織中の細胞から発見された。最近の研究では、マウスやヒトのシクロフィリン A (CYPA) は、被損傷または感染組織中の細胞からも分泌され、炎症誘導の役割をもつことも明らかにされている。本研究では、ウシの外分泌型 CYPA が炎症を有する組織で多量に観察されることを明らかにした。また外分泌型 CYPA の役割を調査するため、我々は遺伝子組換えウシ CYPA (rbCyPA) を精製し、炎症性メディエーターとしてその生物学的活性を解析した。ウシ末梢血細胞を in vitro で rbCyPA で刺激したところ、rbCyPA が顆粒球、単球およびリンパ球の膜表面と反応することを明らかにした。走化性分析では、顆粒球が rbCyPA に向かって移動することまた細胞の移動が抗ウシ CyPA 抗体によって阻害されることも示した。これらの結果は、マウスとヒトの場合と同様に、ウシにおいても外分泌型 CYPA は、炎症性細胞(顆粒球など)を移動させる走化性の作用があることを明らかにし、外分泌型 CYPA が炎症治療のために活用できる可能性があることを示した。

田向健一, 常盤俊大, 小林秀樹, 宇根有美

ラナウイルスが関与したフトアゴヒゲトカゲ (*Pogona vitticeps*) で集団発生したデルマトフィルス症.

Veterinary Dermatology. 27 (2), p.99-105 (2016)

トカゲの皮膚病は様々な病原体によって引き起こされる。今回、日本国内で 100 頭のフトアゴヒゲトカゲを飼養するある繁殖施設で皮膚病の集団発生がみられた。うち 50 頭に皮膚病変が形成され、15 頭の死亡が報告された。検査材料は 3 頭の死亡個体、2 頭の瀕死状態による安楽死個体、3 頭の病変保有個体の合計 8 頭の材料標本を無作為に選択した。検査材料は皮膚病変および健康な皮膚部分から採取した。死後検査は安楽死させた材料で実施した。皮膚のサンプルは、細菌を対象に 16S リボソーム DNA (rDNA) シークエンシング、ラナウイルス属主要キャプシドタンパク質 (MCP) 遺伝子配列決定および組織病理学的検査、微生物培養検査を実施した。皮膚病変材料からの培養あるいは遺伝子検査により、*Austwickia chelonae* およびラナウイルス属 (DNA) の両方が検出された。病理学的検査からは、*A. chelonae* またはラナウイルス属の感染によって引き起こされる有意な内臓病変がないことを明らかにした。筆者らの知る限りではトカゲ類における *A. chelonae* およびラナウイルス属との同時感染は初めてだと思われる。皮膚病変形成起因微生物が同時に多重感染して、より重篤化病変となり多くの個体を死亡させたと考察された。今後爬虫類デルマトフィルス症とラナウイルス属との同時感染は要注意複合感染として考慮されるべきである。

海野洋敬, 稲田美雅, 中村明義, 橋本みちえ, 伊藤桂子, 橋本幸二, 二階堂勝, 秦 英司, 林 智人, 菊 佳男, 勝田 賢, 田川裕一, 河合一洋

乳汁中の乳房炎原因菌同定のための迅速かつ効率的な黄色ブドウ球菌 DNA 抽出法の改良.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (8), p.1007-1009 (2015)

迅速かつ効率的に乳汁中の乳房炎原因菌を検出するため、細菌 DNA 抽出法を開発した。最初に重要な抽出ステップとなる細菌壁の破壊は物理的にビーズビートングを用いて行った。このステップは同様な目的で行う細菌壁をプロテナーゼ K 酵素で破壊するよりも黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌の DNA 抽出に対してより高い効果があった。次に精製プロセスのステップで重要な乳脂質とタンパク質の除去は、酢酸および硫酸アンモニウムを使用することにより効率よく除去することができ

た。これらの方法を合わせて用いることにより、LAMP法に適した細菌 DNA の抽出が 30 分以内で得られることが確認できた。さらにこの方法にはいては、200 CFU/ml の少ない数の乳汁中黄色ブドウ球菌でも迅速かつ高感度に検出する DNA を精製することができた。

山本健久, 鈴木 亨, 大橋誠一, 宮崎綾子, 筒井俊之
2013-2014 年の豚流行性下痢の発生例から分離されたウイルス株間の関連性を示す新たな指標としての遺伝的特徴領域.

PLoS ONE. 11 (1), e0147994 (2016)

豚流行性下痢 (PED) は子豚で下痢を起こすウイルス性の伝染病である。2010 年以降、中国で病原性の高いウイルスによる子豚の死亡例が急増したことが報告され、その後、米国、日本を含むアジア各国、南米、欧州に拡大した。我々は、複数のウイルスの遺伝子について、数百塩基単位で全長に渡って順番に比較し、比較したウイルスの一部にだけ共有されている領域を検出するプログラムを開発し、得られた情報から分離株間の関係を推察した。2013 年から 2014 年に日本国内で分離された PED ウイルス 36 株の分析から得られた遺伝子情報と、データベースに公表されている米国、カナダ、メキシコ、ドイツ及び韓国で分離された 83 株の遺伝子情報 (合計 119 株) について、開発したプログラムを用いて解析した結果、これらのうち 61 株で M1 ~ M8 までの 8 つの特徴領域が得られた。M1 ~ M6 の 6 つの特徴領域は 2 つ以上の国から分離された株で認められたことから、これらの国の流行株は互いに関連していたと考えられた。また、日本では、M1 ~ 3, 5, 6 をそれぞれ別に保有する株が分離されたことから、海外から日本への PEDV の侵入は複数回あったと考えられた。

山本 佑, 中村菊保, 山田 学, 真瀬昌司
H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したアイガモの角膜混濁.

Veterinary Pathology. 53 (1), p.65-76 (2016)

家畜カモ類は H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの地域的蔓延に重要である。我々は、家畜カモ類 (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*) における H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス感染と角膜混濁との関連を調べるため感染実験を実施した。3 羽の鳥を含む、計 99 羽の鳥を用いた。実験 1 で、アイガモにウイルスを接種した所、角膜混濁は神経症状や死亡よりも高頻度に認められた。角膜潰瘍や眼球突出はまれに認めら

れた。実験 2 では、眼球の組織学的検査を行った。角膜混濁は、角膜内皮細胞の脱落と、その後の角膜炎によって引き起こされることが明らかとなった。免疫組織化学によりウイルス抗原が角膜内皮細胞やその他の眼球の細胞で検出された。以上の結果は、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したアイガモでは、角膜混濁が特徴的で頻繁に認められる症状であることを示唆している。この眼球の病変は、野外におけるウイルス感染家畜カモ類の摘発に利用できる可能性がある。

山根逸郎, 石関紗代子, 山崎尚則

オーエスキー病感染の日本の養豚場の生産性に与える影響：横断調査.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (5), p.579-582 (2015)

オーエスキー病 (AD 病) は、現在でも日本の一部の地域で蔓延している届出伝染病である。本研究では、農場レベルでの AD 病感染の、豚群の生産性に与える影響を調べた。AD 病が清浄化されていない県に所属する 48 の養豚場を対象とし、肥育豚の 4 ステージと繁殖豚の低産歴、高産歴のグループからそれぞれ 3 検体の血清を採取した。血清は AD 病ウイルス野外株に対する抗体を競合 ELISA 法にて検出し、一頭でも陽性豚がいる群を陽性群 (n=12)、それ以外を陰性群 (n=36) とした。単変量解析の結果、陽性群の離乳後死亡率 (6.84%) は、陰性群の離乳後死亡率 (4.73%) より有意に高かった ($P=0.0018$)。母豚数を説明変数に入れた重回帰分析の結果、離乳後死亡率は陽性群で有意に高く ($P=0.002$)、出荷頭数 ($P=0.031$)、分娩腹数 ($P=0.026$)、分娩率 ($P=0.021$) は陽性群で有意に低かった。オーエスキー病陽性群の生産性が低下している事実より、オーエスキー病の撲滅キャンペーンは経済的な正当性があるものと考えられた。

横田利恵, 佐藤研志, 和田好洋, 石川義春, 門田耕一
3 頭の若齢牛における未熟 T 細胞性腫瘍.

Journal of Veterinary Medical Science. 77 (12), p.1697-1700 (2015)

3 頭のホルスタイン種、若齢牛に胸腺の腫瘍化があり、未熟な T 細胞の腫瘍であった。症例 1 は前駆 T リンパ芽球性白血病 (子牛型白血病) で、86 日齢の雌牛であった。この腫瘍は白血病細胞による骨髓と脾臓の置換を特徴としていたが、上皮性細網細胞から成る構築が胸腺組織全体で保たれていた。他の 2 つの腫瘍は $\gamma \delta$ T 細胞性リンパ腫で、246 日齢の去勢牛 (症例 2) と 16 ヶ月齢

の未経産牛（症例 3）に見られた。組織学的には、正常の胸腺構造の消失と間質の線維化があり、脾臓と肝臓の腫瘍性変化は症例 1 よりもはるかに軽度であった。症例 2 と 3 は症例 1 とは細胞学的にも違っていた。さらに、WC1 と CD8 は症例 2 と 3 だけに発現していた。このように、今回の白血病とリンパ腫は、組織学的、免疫組織化学的特徴に基づいて、まったく別の疾病単位とみなすべきである。

湯川尚一郎, 田村 豊, 田中 聖, 内田郁夫

PCR による *Salmonella enterica* serovar Typhimurium フェージ型 DT104 の迅速同定法.

Acta Veterinaria Scandinavica. 57, p.59 (2015)

PCR を用いた *Salmonella enterica* serovar Typhimurium フェージ型 104 (DT104) の迅速・簡便同定法を確立した。DT104 が共通して保持するプロフェージ (ST104) のシークエンスを標的としたプライマーを作出し、これを用いて DT104 を含む 50 株の *S. enterica* について PCR を実施した。この結果、DT104 のみが陽性となり、DT104 以外の serovar Typhimurium 株や、Typhimurium 以外の *S. enterica* に属する血清型菌は全て陰性となった。さらに、PCR 産物をプローブとしたサザンブロットニングにより、PCR 産物が DT104 のゲノム DNA 由来であることも確認された。以上の結果から、プロフェージ ST104 を標的とした PCR は DT104 を検出するための手法として有用であることが示唆された。