

浅川賞受賞講演

病原性レンサ球菌の病原因子に関する研究

川端 重忠 (大阪大学大学院歯学研究科微生物学講座)

Study on the virulence factors of pathogenic streptococci

Shigetada Kawabata (Department of Microbiology, Graduate School of Dentistry, Osaka University)

私は1989年大阪大学大学院歯学研究科に入学し、大学院時代は腐敗性細菌 *Streptococcus mutans* を対象として研究を進めて、1993年学位取得、同大学院を修了した。米国留学を経て1997年より化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* の研究に着手した。当時、口腔細菌学教室には実験に供試できる菌株がなかったので、国内外の研究機関を頼って、多種類の血清型菌や遺伝子変異株などの収集を開始した。また、感染実験に使用する細胞株、未経験の実験方法、学術的知識などに関して、東西の先達に教えを乞い、論文を漁りながら自身のテーマを探る日々で、まさしく「走りながら考える」状態からのスタートであった。

S. pyogenes はヒト咽頭部より感染し、咽頭炎や扁桃炎を誘発し、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱などを引き起こすことが知られている。*S. pyogenes* は組織や臓器に積極的に侵入する細菌とはみなされていなかったが、日本では1992年、軟部組織壊死、ショックや多臓器不全などを伴う劇症型レンサ球菌感染症が初めて報告され、今日その報告例は増加傾向にある。未だ本菌に対するワクチンは開発されていない。

また、肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* はしばしばヒト小児の鼻腔などに常在し、肺炎や中耳炎を惹起する。後期高齢者の肺炎では高頻度に検出される起炎菌であり、近年、抗菌薬に耐性を示すものが臨床分離株で過半を占めるようになった。ワクチンに含まれていない莢膜血清型菌が市中で分離されるようになり、新たな臨床の問題となっている。新たなワクチン原や投与方法の開発が求められている。

私はこれら2菌種を研究対象として、宿主細胞への付着・侵入に関与する因子、食細胞から回避する機構、劇症化に関する機構、感染動物モデルの構築、ワクチン候補分子の探索などについて研究を進めてきた。本稿では3つのテーマについて概略を述べたい。

【ゲノム情報を応用した網羅的解析による機能分子の同定と制御法の探索】

当時、莢膜保有株と自然変異で得られた莢膜非保有株を用いて多くの研究が進められていた。遺伝子変異のバックグラウンドが多様なことから、結果にばらつきがみられた。そこで、莢膜合成遺伝子の不活化変異株の作製し、血清型に関わらず莢膜を失うと宿主細胞への付着と侵入が亢進することを明らかにした(1)。*S. pyogenes* SF370株のゲノム情報は、当初断片的にネット上で公開され、随時アップデートされていたので、(数年を経て2001年全ゲノム情報がPNASに発表された)その断片的なゲノム情報とアセンブル手法により、いくつかの新規菌体結合型タンパク質を同定し、それらの機能を明らかにした。フィブロネクチン結合タンパクであるFbaA(2)やFbaB(3)、ラミニン結合タン

パクであるLbp(4)、免疫グロブリン結合タンパクであるSib35(5)、感染防御抗原となりうるHtpA(6)などを同定した。FbaAはその中央領域に20~30アミノ酸の繰り返し構造を有し、同領域を介してフィブロネクチンに結合する。FbaAはヒト咽頭上皮細胞への侵入因子であることやグローバルレギュレーターMgaにより正の調節を受けることが示された(2)。FbaAの全長タンパク質および断片タンパク質をマウスに接種したところ、N末端部断片とフィブロネクチン結合ドメインワクチン候補として有望であることが明らかとなった(7)。また、表層タンパク質PepOは補体古典経路の上流で機能する補体C1qと結合することにより、*S. pyogenes* の溶菌への抵抗性に繋がることや本菌の補体免疫からの回避や血中での生存に寄与することが示唆された(8)。

S. pneumoniae においても同様の手法により、宿主細胞に結合する分子を探索した。その結果、ヒトのフィブロネクチンおよびプラスミンと結合能をもつタンパク質PfbAを同定し、*S. pneumoniae* がPfbAとフィブロネクチンの結合を利用して上皮細胞に付着および侵入することを明らかにした(9)。また、好中球と結合する菌体表層分子 α -enolaseを同定し、 α -enolaseが好中球の細胞外トラップNETs形成を誘導する分子であることを示した(10)。

【レンサ球菌の侵襲性機構の解明および疾患マウスモデルの構築・解析】

S. pyogenes 感染症では化膿病変が認められることから、細胞間接着と極性を担う分子群を破壊し組織侵入すると考えられてきた。臨床分離株の培養上清に含まれる成分により、細胞間接着分子であるE-カドヘリンおよびオクルディンが分解された(11)。*S. pyogenes* のプロテアーゼSpeBはE-カドヘリン細胞外ドメインEC2とEC3の間のカルシウム結合部位を分解し、細胞間隙部位からの本菌の上皮バリア突破に寄与した。*S. pyogenes* は主に上皮細胞のトリセルラータイトジャンクション(TTJ)に局在することを見出した(12)。この局在には、菌体表層のエノラーゼとプラスミノーゲンの結合、およびプラスミノーゲンとTTJの構成成分であるトリセルリンの結合が必要であり、これらの相互作用は*S. pyogenes* の宿主特異性を担う現象であることを明らかにした。*S. pyogenes* はプラスミノーゲンのトリセルリン結合能を利用することにより、TTJから上皮バリアを突破し、組織へ侵襲することが示唆された。*S. pyogenes* が皮膚の創傷部位から感染したとき、膿瘍などの化膿性病変が形成される。本菌のSpeBが皮膚のバリア機能に重要なデスモソーム構成タンパク質であるデスモグレイン1およびデスモグレイン3を分解することを見出した(13)。さらに、*S. pyogenes* による膿瘍の病態を呈す

るマウス経皮感染モデルを構築し、SpeB が皮膚の紅斑と浮腫を伴う化膿性病変の形成に関与することを明らかにした。

1990 年代において劇症型レンサ球菌感染症は原因不明といわれ、ヒトの病態を反映した感染動物モデルは限られており、その開発が望まれていた。当時、劇症型レンサ球菌感染症の流行時期は冬季であり、インフルエンザの流行時期と重なることから、二者の重複感染モデルの作出を試みた。マウスに非致死量のインフルエンザウイルスと非致死量の *S. pyogenes* を感染させたところ、90% 以上のマウスが感染死し、病理像もヒトの場合と類似していた (14)。一連の実験から、インフルエンザウイルスが肺において感染の足場を作り、二次的に *S. pyogenes* が感染することで、病原性が相乗的に発揮されることが明らかとなった。このマウスモデルと各種因子の欠失株を用いて細菌側の致死因子を探索すると、莢膜や M タンパクが最も重要な因子であることが示唆された (15)。インフルエンザウイルスと *S. pneumoniae* の重感染マウスモデルにおいて、ウイルス感染した気道組織細胞表層に分子シャペロン GP96 が表出され、続発して感染する *S. pneumoniae* の肺組織への伝播・定着を亢進させた (16)。GP96 阻害薬の投与により、下気道への *S. pneumoniae* の伝播・定着だけでなく、重感染マウスの肺組織で認められた炎症と組織傷害も著しく抑制されたことから、GP96 が宿主細胞側のレセプターとして機能することが示唆された。Pandemic2009 の剖検による研究から、インフルエンザウイルスとレンサ球菌の重感染による敗血症が 5~15% であったことが複数報告され、ヒトにおける重感染の関与が強く示唆された。

【バイオインフォマティクスを応用した病原因子の解析】

次世代シーケンサーの登場やスーパーコンピュータを用いた解析が身近なものとなり、従来のゲノム解析により塩基配列と生物学的機能に関連づけるアプローチは労力がかかりすぎる時代に入った。そこでトランスクリプトーム、プロテオーム、グライコームなどの解析を進めて、より短時間で大量に病原性の発揮に関与する因子の同定を始めた。血中に侵入した *S. pneumoniae* は、しばしば血液脳関門を突破して髄膜炎を引き起こすが、発症機序は不明な部分が多かった。そこで、*S. pneumoniae* の Zinc metalloprotease (Zmp) ファミリーに着目して、分子系統解析および感染モデル実験を行ったところ、*zmp* 遺伝子が 3 つのクラスターに大別され、*ZmpC* が宿主中枢系への本菌の侵入を抑制するように進化したことが示唆された (17)。また、*S. pneumoniae* の菌体表層に局在すると予測される 16 種類のコリン結合タンパク質について同一種内における分子進化解析、および感染マウスモデル実験を行ったところ、*CbpJ* が好中球による殺菌回避に寄与する、進化的に保存された病原因子であることが示された (18)。*S. pneumoniae* の 14 種類の細胞壁架橋タンパク質について同一種内における分子進化解析を行ったところ、進化的に強く変異の制限を受けている *bgaA* 遺伝子に関して、酵素活性を担うポケットの構造を崩さない変異が選択されていることや、*BgaA* が *in vivo* で病原因子として機能することが示唆された (19)。*S. pyogenes* の線毛形成遺伝子は FCT ゲノム領域に存在しており、9 つのタイプに分類されている。血清型 M6 菌を含む FCT タイプ 1 型が大量のバイオフィーム形成をすることから、線毛の直接的な関与について研究を進めた (20)。その結果、バイオフィーム形成には、*tee6*, *fetX*, *srtB* の遺伝子群が必要であり、本菌の凝集を減弱することが明らかとなった。*S. pyogenes* の線毛形成遺伝子の温度感受性発現は血清型 M49 菌株では観察されていたが、その詳細な発現機構は不明であった。そこで、線毛発現解

析などを行ったところ、転写因子 *Nra* を有する菌でのみ温度感受性で線毛を形成することやヒト組織での適応性に関与することが示唆された (21)。*S. pyogenes* の病原因子に関する研究が進むなか、宿主の感染局所で本菌がどのような挙動を示すかについての研究は限られていた。そこで、マウス壊死性筋膜炎モデルの感染局所において発現変動する *S. pyogenes* の遺伝子群を同定した (22)。感染により一貫して発現が変動する 483 の細菌遺伝子を特定したところ、アルギニンとヒスチジンの代謝に関連する遺伝子の発現が有意に上昇していた。皮膚表面のようなグルコース濃度の低い環境において、*S. pyogenes* のアルギニン代謝が本菌の生存と溶血毒素の発現に寄与すること、皮膚の角層細胞を構成する主要なタンパク質フィラグリンの分解産物にアルギニンが豊富に含まれていることから、フィラグリン欠損マウスを用いて感染実験を行った (22)。その結果、*S. pyogenes* がフィラグリン由来のアルギニンを利用して皮膚病変を引き起こすことを明らかにした。

【謝辞】

1989 年大阪大学大学院歯学研究科の入学時から直接研究のご指導を賜りました浜田茂幸先生（当時教授）に深く感謝いたします。浜田先生にはアメリカ留学のご推薦や、助手の採用など大変お世話になりました。また、色々なプロジェクト型研究班の総括者および評価者の先生方、共同研究をご一緒いただいたすべての関係者の皆様に感謝し、お礼を申し上げます。最後にこれまでの研究を財政的に支援していただいた各種省庁、財団法人、民間会社など関係者の皆様にお礼を申し上げます。

【引用文献】

1. Kawabata S., *et al.*, 1999, Microb. Pathog., 27: 71-80.
2. Terao Y., *et al.*, 2001, Mol. Microbiol., 42: 75-86.
3. Terao Y., *et al.*, 2002, J. Biol. Chem., 277: 47428-47435.
4. Terao Y., *et al.*, 2002, Infect. Immun., 70: 993-997.
5. Kawabata S., *et al.*, 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 296: 1329-1333.
6. Kunitomo E., *et al.*, 2008, Microb. Infect., 10: 414-423.
7. Terao Y., *et al.*, 2005, J. Infect. Dis., 192: 2081-2091.
8. Honda-Ogawa M., *et al.*, 2017, J. Biol. Chem., 292: 4244-4254.
9. Yamaguchi M., *et al.*, 2008, J. Biol. Chem., 283: 36272-36279.
10. Mori Y., *et al.*, 2012, J. Biol. Chem., 287: 10472-10481.
11. Sumitomo T., *et al.*, 2013, J. Biol. Chem., 288: 13317-13324.
12. Sumitomo T., *et al.*, 2016, Sci. Rep., 6: 20069.
13. Sumitomo T., *et al.*, 2018, Front. Cell Infect. Microbiol., 8: 10.
14. Okamoto S., *et al.*, 2003, J. Virol., 77: 4104-4112.
15. Okamoto S., *et al.*, 2004, Infect. Immun., 72: 6068-6075.
16. Sumitomo T., *et al.*, 2021, mBio, 12: e0326920.
17. Yamaguchi M., *et al.*, 2017, Virulence, 8: 1516-1524.
18. Yamaguchi M., *et al.*, 2019, Commun Biol., 2: 96.
19. Yamaguchi M., *et al.*, 2020, Front. Microbiol., 11: 582437.
20. Kimura K. R., *et al.*, 2012, J. Bacteriol., 194: 804-812.
21. Nakata M., *et al.*, 2020, Mol. Microbiol., 113: 173-189.
22. Hirose Y., *et al.*, 2019, Appl. Environ. Microbiol., 85: e01419-01428.
23. Hirose Y., *et al.*, 2021, Cell Rep., 34: 108924.

SL

The Microbiome and Gut Homeostasis

座長：藤永 由佳子（金沢大学）

Chair: Yukako Fujinaga (Kanazawa University)

SL

The Microbiome and Gut Homeostasis

○Andreas Bäumlér (Dept. Medical Microbiology and Immunology, Sch. Medicine, Univ. California Davis)

An imbalance in the microbiota may contribute to many human illnesses, which has prompted efforts to rebalance it by targeting the microbes themselves. However, by supplying the habitat, the host wields a prominent influence over microbial growth at body surfaces, raising the possibility that rebalancing the microbiota by targeting our immune system would represent a viable alternative. Host control mechanisms that sculpt the microbial habitat form a functional unit with the microbiota, which functions in conferring colonization resistance against pathogens. We will discuss how host factors select for microbial traits that licence growth and survival in the large intestine and explore whether these host control mechanisms can be harnessed for strengthening colonization resistance and restoring homeostasis.

ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群の活動

コンビーナー：飯田 哲也（大阪大学）
鈴木 定彦（北海道大学）

Activities of World-leading Vaccine Research and Development Centers

Conveners: Tetsuya Iida (Osaka University)
Yasuhiko Suzuki (Hokkaido University)

令和3年6月に閣議決定された国家戦略「ワクチン開発・生産体制強化戦略」を踏まえ、国産ワクチン等の実現に向けて、令和4年10月より、フラッグシップ拠点である東京大学国際高等研究所新世代感染症センターと4つのシナジー拠点（北海道大学ワクチン研究開発拠点、千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点、大阪大学ワクチン開発拠点先端モダリティ・DDS研究センター並びに長崎大学感染症研究出島特区ワクチン研究開発拠点）からなるワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群が活動を開始しました。本セッションでは、拠点群の全体像について解説するとともに、各拠点で取り組んでいるワクチン研究開発に関することに関して講演することにより、細菌学会員の皆様に拠点群参画機関の個々の活動の内容や目標を理解して頂き、ワクチンの開発においての会員の皆様のコミットメントの可能性を探りたいと考えています。

S1-1

Japan Initiative for World-leading Vaccine Research and Development Centers

○川口 寧^{1,2} (¹東京大・新世代感染症センター, ²東京大・医科学研究所)

○Kawaguchi Yasushi^{1,2} (¹The University of Tokyo Pandemic Preparedness Infection and Advanced Research Center, ²The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Based on the strategy for strengthening the vaccine development and production system and aiming for the achievement of Japanese-made vaccines, world-leading research and development centers (a flagship center, synergetic centers, support institutions) are set up. At these research centers, vaccine-related research aiming to achieve practical results are strengthened and promoted during normal times. Today I introduce these world-leading research and development centers.

S1-2

PanChol: a novel live-attenuated oral cholera vaccine

Masataka Suzuki¹, Deborah R. Zingl^{1,2}, Akina Osaki¹, Damien Slater¹, Jason Harris¹, Lindsey R. Baden¹, ○Matthew K. Waldor¹, BWH clinical investigation team¹ (¹Div. Infectious Diseases, Mass General Brigham, ²Dept. Microbiology, Harvard Medical School)

Cholera remains an important threat to global public health and a resurgence in cholera in the past few years along with an ongoing vaccine shortage has made the need for affordable vaccines more urgent. Although improved water and sanitation have helped to control cholera spread, vaccines are now recognized as a critical component of cholera control programs. While current whole cell killed vaccines have been shown to be useful, they have important limitations, particularly their limited effectiveness in children less than 5 years old. We recently created a novel live oral attenuated cholera vaccine (PanChol) based on a contemporary El Tor O1 *V. cholerae* outbreak strain. PanChol expresses both *V. cholerae* O1 serotype antigens, over-expresses the non-toxic B-subunit of cholera toxin, and was engineered to be resistant to toxigenic reversion. Pre-clinical studies in infant mice and rabbits showed that the vaccine induced a robust protective adaptive immune response. A Phase 1 clinical trial in healthy adults at the Brigham and Women's Hospital in Boston Massachusetts is ongoing and to date, our results are very promising. No safety concerns have been observed with PanChol doses ranging from 10⁴ to 10¹⁰ colony forming units. Furthermore, PanChol elicited robust vibriocidal antibody titers against both *V. cholerae* serotypes over this large dose range. While we are currently expanding our clinical experience of this vaccine in a cohort from an endemic region, we are also continuing to investigate the protection elicited by PanChol in a mouse model. Surprisingly, one dose of the vaccine protects against a lethal *V. cholerae* challenge within 24 hours after administration prior to the onset of antibody development. The observed rapid protection is partly based on PanChol-mediated colonization resistance resulting in lower colonization of the challenge strain. Currently, we are characterizing the underlying host and bacterial factors that account for this rapid protective effect of PanChol in the murine model.

S1-3

Commensal microbes modulate host immune antibody responses

○後藤 義幸¹, McCuaig Bonita¹ (¹千葉大・真菌・感染免疫, ²千葉大・災害・感染, ³千葉大・災害・ワクチン, ⁴千葉大・cSIMVa)

○Yoshiyuki Goto¹, McCuaig Bonita¹ (¹Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ., ²Dev. Infect. Med. Res. Inst. Disaster Med, Chiba Univ., ³Dev. Vaccine. Res. Inst. Disaster Med, Chiba Univ., ⁴Syn. Inst. Future Muc. Vac. Res. Dev, Chiba Univ.)

It is well understood that the quantity and quality of antibodies in individuals are extremely diverse. In addition to genetic backgrounds, environmental factors contribute to forming such diverse levels of antibodies. Recent works have shown that resident microorganisms including bacteria, fungi, viruses, and parasites are one of the important environmental elements to construct a host immune system. In particular, commensal fungi interact with resident microbes and modulate the host immune system. In this study, we analyzed the mechanism of colonization of commensal fungi, especially *Candida albicans*, in the gut and found that commensal microbes prevent the colonization of *C. albicans*. Using the antibiotics-treat strategy, we identified that Enterobacteriaceae have the potential to avoid colonization of *C. albicans* by producing specific metabolites with candidacidal effects in vitro and in vivo. Interestingly, *C. albicans* specifically induce host immune responses such as follicular helper T (TFH) cells in Payer's patch, IgA+ cells, CD4+ T cells, Th17 cells in lamina propria, epithelial alpha1, 2-fucose in the ileum. *C. albicans* colonization in the gut also induces systemic IgA production. These data suggest that unique resident fungi drive diverse immunological signatures, especially antibody responses in individuals.

S1-4

Tuberculosis: From Basic Research to Clinical Application

○Stefan H.E. Kaufman^{1,2} (¹Max Planck Institute for Infection Biology, ²Charité – Univ. Clinics Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin)

Tuberculosis (TB) remains a major health threat and better intervention measures are urgently needed. Notably, the use of better vaccines to prevent disease and/or infection and biosignatures to predict progression from latent to active TB could have a major impact. I will describe (i) design of host biosignatures based on transcriptomic and metabolomic markers and (ii) development of a recombinant vaccine candidate which has reached several clinical phase III trials for protection and safety. Prognostic biosignatures have been defined which can predict onset of active TB in household contacts of newly diagnosed index cases. Probably these signatures diagnose subclinical TB in healthy but contagious individuals. The attenuated live TB vaccine, VPM1002, has successfully completed phase I and II trials and has completed two of three phase III clinical trials. VPM1002 has been licensed to Serum Institute of India Pvt. Ltd. which has already established reproducible large-scale production in high throughput bioreactors. First efficacy and safety data are expected for 2025.

S1-5

Deciphering human T cell responses during infection

○山崎 晶^{1,2,3,4} (¹大阪大・微研・分子免疫制御, ²大阪大・免フロ・分子免疫, ³大阪大・CiDER, ⁴大阪大・CAMaD)

○Sho Yamasaki^{1,2,3,4} (¹Dept. Molecular Immunol., RIMD, The Univ. of Osaka, ²Lab. Molecular Immunol., The Univ. of Osaka, ³CiDER, The Univ. of Osaka, ⁴CAMaD, The Univ. of Osaka)

Cellular and humoral responses constitute fundamental elements of adaptive immunity to achieve successful protection against infection. In contrast to antibody-based immunity, T cell-mediated immune responses has not been fully characterized on a clonotype resolution. Using PBMCs from infected patients, we determined dominant clonotypes and epitopes of pathogen-reactive T cells which were associated with symptoms and immunological memories. These approaches also led us to identify a novel mycobacteria-specific unconventional T cell subset shared across humans. In this symposium, we would like to share and discuss our insights obtained from chronological × clonological analysis of human T cell responses during infection.

S2

バイオフィーム研究の最前線

コンビーナー：野村 暢彦 (筑波大学)
金城 雄樹 (東京慈恵会医科大学)

Frontline of Biofilm research

Conveners: Nobuhiko Nomura (Tsukuba University)
Yuki Kinjo (Jikei University School of Medicine)

多くの微生物はバイオフィームを形成することで集団として様々な機能を発揮し、他の微生物や宿主の動植物に作用する。感染症に関わる微生物や腸内細菌もバイオフィーム形態で存在する。また、土壌や水圏などの様々な環境においても多くの微生物はバイオフィーム形態で存在する。つまり、健康・食・環境にかかわる微生物もバイオフィーム形態で存在していることから、微生物の制御において、バイオフィームの形成機構の解明に基づく制御が重要である。近年、バイオフィームの形成機構の解明およびバイオフィームの制御に関する研究が進展している。また、バイオフィームのイメージング技術の発展も目覚ましい。本シンポジウムでは、日本細菌学会と日本バイオフィーム学会の共催により、微生物のバイオフィームに関して、医学、歯学、工学、生命環境学など種々の分野における最新の研究内容を紹介していただく。

共催：日本バイオフィーム学会

Co-sponsorship by The Japanese Society for Biofilm Research

S2-1

黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリクスに含まれる細胞外リン脂質のムーンライト機能

○杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (¹慈恵医大・医・細菌学, ²慈恵医大・バイオフィーム研究センター, ³慈恵医大・アミロイド制御研)

Moonlighting functions of extracellular phospholipids in biofilm matrix of *Staphylococcus aureus*

○Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (¹Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., ²Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., ³Lab. Amyloid Regulation., Jikei Univ. Sch. Med.)

黄色ブドウ球菌はバイオフィーム関連感染症の主要な起炎菌であり、常在菌である一方で、心内膜炎やカテーテル血流感染などの重篤な疾患を引き起こすことがある。これらの病態にはバイオフィームの形成が深く関与していると考えられている。黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリクスの主要成分として、細胞外 DNA やタンパク質が知られており、特定の菌株では細胞外多糖体や環境中の RNA がバイオフィーム形成に重要な役割を果たすことが示されている (Sugimoto et al. Sci. Rep. 2018; Yonemoto et al. Infect. Immun. 2019; Chiba et al. npj Biofilms Microbiomes 2021)。一方で、細胞膜の構成成分であるリン脂質がバイオフィーム形成にどのように関与するかについての知見は限られている。

本講演では、我々が最近見出したリン脂質の「ムーンライト機能」(従来の細胞膜構成成分としての機能とは異なる細胞外での役割)について報告する。黄色ブドウ球菌のバイオフィームマトリクス中に存在する細胞外リン脂質は、静電的相互作用および疎水性相互作用を介して菌体間の凝集を促進し、バイオフィーム形成を正に制御することが示唆された (Sugimoto et al. in preparation)。この知見は、細胞外リン脂質を標的とした新たなバイオフィーム制御技術の開発につながる可能性があり、バイオフィーム関連感染症の治療法への応用が期待される。

S2-2

Microbial Food Chain -*Fusobacterium* orchestrates oral biofilms-

○久保庭 雅恵（大阪大・歯・予防歯科）

○Masae Kuboniwa (Dept. Prevent. Dent., Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

我々の研究グループでは、基礎研究、臨床研究の双方から口腔と全身の疾患予防に関する研究を推進している。メタボロミクスを用いたこれまでの *in vitro* 研究により、歯肉縁下バイオフィームがその歯周病原性を亢進させていく成熟過程において、アルギニン代謝経路とその下流に位置するポリアミン代謝経路上の複数の代謝物が重要な役割を果たしていることを見出した。また、アクセサリー病原体と位置付けられる *Streptococcus gordonii* と歯周病関連菌 *Fusobacterium nucleatum* 間の代謝物の授受によってポリアミン産生経路の代謝の流れが促進され、その結果生じる代謝物が歯周組織の炎症程度と相関を示すバイオマーカー候補として有用であることを明らかにしてきた。さらに、大容量嫌気性共培養システムを新たに構築し、これを活用することにより、特定の口腔細菌間の代謝相互作用が口腔由来の主要な悪臭物質であるメチルメルカプタン (CH_3SH) 産生に重要な役割を果たしていることを示す新たな知見が得られた。この研究では、まず初めに *F. nucleatum* が CH_3SH の主要な産生菌であり、その産生は *S. gordonii* との代謝相互作用によって活性化されることを確認した。次に、 ^{13}C , ^{15}N -メチオニン安定同位体トレーサー法と遺伝子発現解析から、*S. gordonii* から分泌されたオルニチンが、*F. nucleatum* によるポリアミン合成を促進することで同菌のメチオニン需要を亢進させ、メチオニンサルベージ経路の活性化と CH_3SH 産生量の増加をもたらすことを示した。これらの知見は、今後、口臭や歯周炎を治療するためのより効果的な予防的アプローチの開発につながる可能性がある。

S2-3

Formation mechanism of unconventional biofilm structures by bacteria covered with adhesive hair

○堀 克敏（名大・工・生命分子工）

○Katsutoshi Hori (Dept. Biomolecular Eng., Grad. Sch. Eng. Nagoya Univ.)

We investigated the formation process of an unconventional biofilm formed by a bacterium that autoagglutinates through sticky, long, and peritrichate hair-like nanofibers. The alkane-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. Tol 5 forms biofilms via the interaction of AtaA, a trimeric autotransporter adhesin present on the cell surface like hair. This process occurs rapidly without cell growth or extracellular polymeric substance production. The biofilm formation begins with cell-cell interactions, progresses to cell clumping, and develops large cell aggregates. The cell-cell interaction can be explained using Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory, incorporating a novel concept that considers two independent interactions: one between cell bodies and another between virtual discontinuous surfaces formed by AtaA fiber tips. Even under low ionic strength conditions where energy barriers prevent direct cell body collisions, cells can agglutinate through the contact of AtaA fiber tips. Cell clumping follows the cluster-cluster aggregation (CCA) model, producing a biofilm with unique structural features, including void spaces and a fractal nature. Understanding this distinctive formation process provides new insights into the mechanisms behind various types of biofilms formed by diverse bacteria.

S2-4

抗酸菌症の難治性に関わる休眠現象とバイオフィーム

○松本 壮吉（新潟大・医・細菌）

Biofilms and dormancy that related to intractable infectious diseases caused by mycobacteria

○Sohkichi Matsumoto (Dept. Bacteriol. Niigata Univ. Sch. Medicine)

抗酸菌症は、結核、非結核性抗酸菌 (NTM) 症、ハンセン病などがあり、いずれも半年以上の投薬期間を要する難治性疾患である。難治性の根底に抗酸菌の発育性や休眠現象があるが、それは集団として種の生存を図るバイオフィームとも密接に関わっている。抗酸菌のほとんどは環境菌で、抗酸菌は自然環境においてバイオフィームを形成して休眠しながら生存していると考えられる。その性質は人に感染し、抗酸菌症を引き起こした抗酸菌にも引き継がれ、例えば結核菌は環境を離れ人に寄生しているが、病原性抗酸菌のコード形成はバイオフィームそのものと考えられるし、NTM 症の原因菌は、人環境中に存在する抗酸菌そのものであり、環境での性質をそのまま人体内に持ち込んでいて、疾患の難治性に関連するとおもわれる。私たちはこれまで抗酸菌のバイオフィーム形成が、栄養条件や酸素濃度、細胞外 DNA、低酸素適応遺伝子群によって調節されていることを見出してきた。NTM においては、糖新生経路や VII 型分泌系に関連する遺伝子が低酸素条件下で必須であり、また富栄養条件および低酸素条件が抗酸菌のバイオフィーム形成を促進すること、その際にグリコペプチドリビッド (GPL) が重要な役割を果たしていた。また特に病原性の高い遅発性抗酸菌に特異的に、細菌外 DNA が検出され、バイオフィーム形成や薬剤抵抗性に関わっていた。抗酸菌バイオフィームの理解は、疾病対策の糸口になると期待される。本会では、これまでの抗酸菌のバイオフィームの機能やその形成機構についての知見を紹介したい。

S2-5

Interaction of pathogenic bacteria and fungus in dual biofilm

○竹下 典男（筑波大・MiCS）

○Norio Takeshita (MiCS, Tsukuba Univ.)

The human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* establishes biofilm dual interactions in the lungs with the pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. A screen of *A. fumigatus* mutants revealed mutants that specifically reduce biofilm formation in the presence of *P. aeruginosa*. One of these mutants, the Ga protein, was shown to regulate the production of several secondary metabolites important for dual biofilm interactions. Deletion of the nonreducing polyketide synthase necessary for the biosynthesis inhibited *A. fumigatus* growth in the dual biofilm, although it did not affect monoculture biofilm formation. These results suggest that this secondary metabolite plays an important role in the dual biofilm interaction with *P. aeruginosa*.

S2-6

***Acinetobacter baumannii* のバイオフィルムを介した医療器具関連感染のメカニズム解明**

○鴨志田 剛¹, 山口 大貴², 沖 啓太¹, 山田 倫暉², 竹本 訓彦³, 中野 竜一⁴, 矢野 寿一⁴, 森田 雄二¹ (¹明治薬大・感染制御, ²京都薬大・微生物, ³国際医療研究セ・感染制御, ⁴奈良医大・微生物感染)

Mechanistic insights into biofilm-mediated device-related infection by *Acinetobacter baumannii*

○Go Kamoshida¹, Daiki Yamaguchi², Keita Oki¹, Noriteru Yamada², Norihiko Takemoto³, Ryuichi Nakano⁴, Hisakazu Yano⁴, Yuji Morita¹ (¹Dept. Infect. Cont. Sci., Meiji Pharm. Univ., ²Lab. Microbiol. and Infect. Cont., Kyoto Pharm. Univ., ³Pathogenic Microbe lab., Dept. Infect. Dis., NCGM, ⁴Dept. Microbiol. and Infect. Dis., Nara Med. Univ.)

Acinetobacter baumannii は免疫力が低下した患者に多彩な感染症を引き起こす典型的な日和見感染菌である。また、医療器具や院内施設に定着し医療関連感染症の原因となる。なかでも、人工呼吸器関連性肺炎 (VAP) の原因となりやすい。本研究では、*A. baumannii* が VAP など医療器具関連感染症を引き起こすメカニズムを解明することを目的に研究を行った。我々は、人工呼吸器に使用される気管挿管チューブ (メディカルデバイス: MD) に付着しやすい菌株が、VAP を引き起こすのではないかと着想した。そこで、*A. baumannii* を MD 存在下で培養を行い、MD に接着した菌を回収し、再度培養を繰り返すことで、実験的に MD に高度付着する株を樹立した。高度付着株のバイオフィルム形成能を評価した結果、野生株に比べて有意に高いことが示された。さらに、免疫不全マウスへの致死性も有意に増加していた。そこで、次世代シーケンスによる変異解析を実施した結果、非生物との接着に重要な Csu 線毛の先端分子である *csuE* 遺伝子に 1 アミノ酸欠失となる変異を見出した。次に、高度付着株で認められた *csuE* 遺伝子変異を相同組換え法により野生株で再現し、解析を行った。その結果、Csu 線毛変異株は野生株に比べ、高いバイオフィルム形成能を示した。また、MD への付着能を評価したところ、Csu 線毛変異株は野生株に比べ、優占的に MD に付着することが明らかとなった。本研究は、医療器具に定着した *A. baumannii* を感染源とする医療器具関連感染症発症のメカニズム解明に大きく貢献するものである。

S3

ゲノム・メタゲノム時代の菌種分類と新種命名

コンピーナー: 河村 好章 (愛知学院大学)
坂本 光央 (理化学研究所)

Taxonomy and Nomenclature of Bacterial Species in the Genomic/Metagenomic Era

Conveners: Yoshiaki Kawamura (Aichi Gakuin University)
Mitsuo Sakamoto (RIKEN)

細菌の分類学は、時代ごとに使われるようになった新技術を導入して、常に変化している。古くは形態や生理生化学性状の比較から細菌を分類していたが、その後 PCR やサンガー法 DNA sequencer が使えるようになると、16S rRNA などの遺伝子の塩基配列比較を基にした系統分類が盛んに行われるようになった。近年、次世代 sequencer が普及し、細菌の全染色体塩基配列が決められるようになり、そのデータを使った分類法が導入されている。さらに最近では、メタゲノムの手法を使い、サンプル中に存在する全ての細菌を一遍に解析する方法も導入されつつある。DNA 解析技術が突出して進化している状況下、遂には培養をしなくても DNA データさえあれば、新菌種などを提案しても良いのではないかとの新発想 (SeqCode) も生まれている。当日は、これらの分類の変遷を踏まえつつ、現在の分類の方法、ゲノム時代の細菌同定の在り方と問題点、さらに SeqCode の概要と現在の命名規約との対比、系統保存機関の役割などについてご紹介し、また議論する場を提供したい。

S3-1

細菌の命名規約と分類学の変遷

○玉澤 聡 (製品評価技術基盤機構・バイオC)

Overview of bacterial nomenclature and taxonomy

○Satoshi Tamazawa (NITE/NBRC)

細菌の命名と分類の歴史において 20 世紀後半は大きな転換点であり出発点であった。1975 年に国際細菌分類命名委員会 (ICSB) は国際細菌命名規約を制定し、それに基づき 1980 年 1 月 1 日、細菌学名承認リスト (Approved Lists of Bacterial Names) が出版された。それまでにおよそ 30,000 あったとされる学名の中から本リストに掲載された 290 属、亜種を含む 1922 種のみが正式に承認された学名となった。本規約により細菌は培養株に基づいて命名することが定義され、細菌命名が再スタートした。有効な (valid) 学名が確定した一方、細菌分類の方法自体は Approved Lists を境に大きく変わったわけではなく、1872 年に Cohn により細胞形態による細菌の分類がなされたことを端緒とし、続いて生理・生化学的性状、化学分類学などの表現性状が分類指標として用いられた。大きな転機は 1987 年に Woese による 16S リボソーム RNA の系統進化学的概念が細菌分類に適用されたことであり、客観的な分類指標として一般化した。また、分離培養は出来ないが 16S rRNA 遺伝子の塩基配列としては新規な未培養細菌を記述するため、ICSB により *Candidatus* という暫定的な地位が提案された。そして、2000 年代に入り状況は大きく変わる。次世代シーケンサーと環境ゲノム解析の出現により、未培養細菌のゲノムを簡便に取得可能となり、近年ではゲノム情報を唯一の分類指標とした学名提案が議論され始めた。本発表では、こうした背景を踏まえて Approved Lists の発効から現在に至るまでの細菌の命名規約と分類の変遷について概説したい。

S3-2

現在の細菌分類の実際

○河村 好章（愛知学院大・薬・微生物）

Current Practices in Bacterial Classification

○Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., AichiGakuin Univ.)

「今の細菌分類は変化が激しすぎて、どれが正しい菌種名かも判らない」という声をよく聞く。実際のところ、近年は、毎年 2,000 菌種以上が提案され、承認菌種名は約 27,000 に達している。また Whole genome sequence (WGS) を用いた属や科などの分類の再編も行われ、混乱を感じる研究者も少なくない。正式に承認されている分類名を確認するには LPSN (<https://lpsn.dsmz.de/>) が現時点で最も有益なツールだろう。本講演では、先生方が一番身近に感じられる、新菌種を提案する過程を題材として解説をしたい。研究者が未分類と推定される菌株を得た際、多くの場合 16S rRNA 塩基配列を決定し、BLAST 解析で所属する属を推定する事から始まる。ここで LPSN を使い正式な菌種名を確認し、16S rRNA や他の housekeeping gene による系統解析へと続く。近年では WGS の決定と近縁菌種との類似度計算データも必須となっている。また当該菌の生き物として特徴を表し類縁菌種と区別できる生理生化学性状などのデータも必要である。特に医療系の細菌分類学では、単に新菌種を提案するに留まらず、病原性・疾患との関連性・薬剤感受性・過去との分離株との比較など、WGS だけでは得られない多様な情報が必要となる。最後に正式な菌種の登録を確実に実施する事が必要である。当日は、新菌種提案の方法の理解のみならず、続く演者らから紹介のある検査の現場での問題点、さらに SeqCode や The best of both worlds など新しいコンセプトも踏まえて、分類学を身近に感じて頂ける時間となれば幸いである。

S3-3

ゲノム時代の細菌の同定と分類

○田中 香お里（岐阜大・糖鎖・嫌気性菌）

Bacterial identification and classification in the genomic era

○Kaori Tanaka (Anaerobe. Bacteriol. iGMol., Gifu Univ.)

物体や事象に名称がつくことは、その対象を周囲に認識させ、対象について調査しその性質や関連する事象を明らかにしていく上で重要である。ある指標の基に共通する点で対象をグループ分けし、その特徴を定義して名称を付すことで、私たちはその対象をある程度の共通認識を持って把握することができ、それまで身の回りにあっても見過ごしていた対象を見つけることが可能になる。近代細菌学の偉大な先人によって主要な感染症から発見され病原体として発表された病原細菌においてもまだ病原的意義が明らかになっていない細菌においても何らかの名称と特徴の情報がなければ感染症材料から分離されたとしても同定されず、疫学情報に繋がらない。まだ病原体であるかが明確でない細菌においては疫学情報が積み上がるのが基礎研究の対象としての興味に繋がり病原的意義の解明にも繋がります。まずは見つかって分離されること、分離株を用いた実験、研究によって病態との関連が明らかにされることが必要となる。MALDI-TOF MS による細菌同定は臨床検査の現場にも画期的な変革をもたらした。これまで同定困難であった菌種が簡便で高精度に可能になった。また、日常検査では困難であるが、症例報告に際して同定不能菌については 16SrRNA 配列決定による菌種同定も以前に比べれば身近になってきている。新たに菌種が定義され、同定も容易になってきていることは疫学情報の蓄積に有用であるが、同定手法へのハードルが下がっている一方、多数存在する細菌由来の遺伝子情報の取扱についての知識が不足していることや系統分類に従って再分類や細分化が進む状況から臨床細菌の場では混乱や困惑も見受けられる。

S3-4

ゲノムを基準とする新たな原核生物分類体系 SeqCode

○布浦 拓郎（海洋研究開発機構・生命理工）

Introduction of SeqCode, genome-based taxonomy of prokaryotes

○Takuro Nunoura (CeBN, JAMSTEC)

2022 年、ゲノムを基準とする原核生物分類体系 SeqCode Initiative が発足した。これは、未培養系統群を含む全ての原核生物を、ゲノムを基準に包括する体系であり、結果、従来の ICNP を中心とする分類体系とは部分的に対立する。SeqCode Initiative 発足の端緒は、原核微生物分類の基準をゲノム情報とし、未培養微生物まで拡大することを目指す提案（2016 年）が、2020 年に ICNP において否決されたことにある。この 2016 年の提案、あるいはその後の議論は、微生物生態研究に携わる欧米豪の研究者を中心に進められており、SeqCode Initiative が International Society for Microbial Ecology (ISME) の元にある組織体系とも密接に関わっている。逆に言えば、SeqCode 発足に至る議論には、病原微生物も含め、ISME と関係の薄い研究者の関与は限られていた。更に、ISME に関係の深い研究領域まで含めても、一連の議論において日本の研究者からの貢献は極めて限られていた。一方で、群集を含むゲノム解析が微生物研究の多くの分野において基盤的な存在となった現在において、広範な研究者にとって、Genome Taxonomy Database (GTDB)等、ゲノムに基づく分類ツールが不可欠になりつつある。本発表では、SeqCode 発足前後の議論、それに伴う様々な事象について紹介する。

S3-5

カルチャーコレクションと ICSP & SeqCode

○坂本 光央（理研・バイオリソース・微生物材料）

Culture Collections and ICSP & SeqCode

○Mitsuo Sakamoto (RIKEN BRC-JCM)

カルチャーコレクション (CC) は保有している菌株を研究者へ提供し、また、研究者からの菌株の寄託を受け付けている。一連の作業でオンラインカタログ上に学名と菌株情報が紐づく。学名は、国際原核生物分類命名委員会 (ICSP) が発行する国際原核生物命名規約 (ICNP) の下で管理されている。原核生物の名称は、学術雑誌 IJSEM に掲載されることによって ICNP の下で承認される。IJSEM への掲載は、通常の研究論文とともに Validation List も含まれる。ICSP は ICNP を発行しており、ICNP は命名を規定しているが、分類や同定は規定していない。我々 CC は、新種発表や種・属の統廃合のような再分類などにともなって、日々学名の更新・修正を行ない、ユーザーの利便性向上を図っている。2024 年初頭、ICSP は原核生物の命名の変更を緩和するための特別委員会を設立している。特別委員会は、医学微生物学に特化した学術雑誌の編集者およびデータベースのキュレーターに対して、ある原核生物分類群のいくつかの同型同義語の中で、最後に有効かつ正当に発表された名称が、自動的に正しい名称として扱われる必要はないことを明確にするための措置を講じるように依頼している。しかし多くの CC が最後に発表された名称をカタログに掲載している。現在、未培養分類群を Candidatus 分類群として、ICNP の規則へ組み込むことが提案されている。原核生物の命名のための基準となる材料として、遺伝子配列データの使用を許可するという提案は、2020 年に ICSP によって却下されているが、最近になって同様の提案が発表された背景には SeqCode による影響が大きい。本シンポジウムでは、SeqCode が CC に与える影響などについても議論したい。

S4

ユビキチンを介した宿主-病原体の攻防戦

コンビーナー：新崎 恒平（東京薬科大学）
久堀 智子（岐阜大学）

Host-pathogen interplay mediated by ubiquitin

Conveners: Kohei Arasaki (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)
Tomoko Kubori (Gifu University)

真核細胞に普遍的に存在するユビキチン修飾系は細胞機能の維持や調節の中核システムである。病原体感染におけるユビキチン系の役割は炎症シグナル経路やファゴサイトーシス、オートファジーによる病原体排除を含めた多岐にわたる免疫系駆動であり、近年ではタンパク質のみならず脂質や糖鎖を標的とするユビキチン修飾も明らかになっている。一方、ある種の病原菌は細菌エフェクターを用いてユビキチン系を操作することで宿主免疫を逃れることが知られている。さらに、これらエフェクターの機能解析はユビキチン修飾に対する数多くの新規ケミストリーの発見をもたらし、学問分野の垣根を超えた新たな研究潮流を生み出している。本シンポジウムでは、ユビキチンを介した病原体排除機構から病原細菌によるユビキチン系操作機構に至る幅広い視点からの最先端の研究を取り上げ、「ユビキチン」を介して細胞内で繰り広げられる宿主細胞と病原体との攻防を紐解く。

S4-1

Subversion of the host endocytic pathway by *Legionella pneumophila*-mediated ubiquitination of Rab5

○新崎 恒平¹, 田中 詩乃¹, 生出 紘夢¹, 久堀 智子², 永井 宏樹^{2,3} (¹東京薬大・生命, ²岐阜大・医・病原体制御, ³岐阜大高等研究院・One Medicine トランスレーショナルリサーチセンター)

○Kohei Arasaki¹, Shino Tanaka¹, Hiromu Oide¹, Tomoko Kubori², Hiroki Nagai^{2,3} (¹Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. and Life Sci., ²Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., ³COMIT, Gifu Univ.)

Legionella pneumophila is an intracellular bacterial pathogen that modulates membrane trafficking to survive and proliferate within host cells. After phagocytosis, the *L. pneumophila*-containing vacuole evades the endocytic pathway by excluding the host GTPase Rab5, a crucial regulator of phagosomal maturation. In this study, we show that the evolutionarily conserved lysine residue K134 of Rab5 undergoes ubiquitination during infection. This modification depends on Lpg2525, an F-box protein from *L. pneumophila* that acts as a component of the SKP-Cullin-F-box complex. We further demonstrate that Rab5 ubiquitination facilitates the recruitment of RabGAP-5, a Rab5-specific GAP, leading to Rab5 inactivation and subsequent release from the bacterial vacuole. Importantly, the K134 Rab5 mutant limits *L. pneumophila* replication within host cells. These findings reveal that Lpg2525-mediated Rab5 ubiquitination is a key survival strategy employed by *L. pneumophila* in infected host cells.

S4-2

Characterization and Functional Insights into the Deamidase Family in *Legionella*

○Minsoo Kim¹, 手塚 徹¹, 水島 恒裕² (¹京都大・医, ²兵庫県立大・理)

○Minsoo Kim¹, Tohru Tezuka¹, Tsunehiro Mizushima² (¹Lab. Integrative Molecular Medicine, Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., ²Dept. Science, Grad. Sch. Sci., Univ. Hyogo)

Gram-negative pathogenic bacteria utilize a diverse repertoire of virulence factors, including effector proteins, to facilitate host cell infection. These effectors regulate host tissue invasion, host defenses evasion, and bacterial survival. The *Legionella* is known to possess an extensive repertoire of more than 300 effector proteins that are known to contribute to its potent virulence, but not all of them are fully understood. In this study, we report on the identification and characterization of a novel *Legionella* effector protein. Structural analysis revealed that it is a homolog of typical bacterial deamidase. We determined the full-length crystal structure, which shows the presence of a conserved catalytic triad composed of Cysteine, Histidine, and Glutamine, confirming its function as a deamidase. We will discuss its role in modulating the host ubiquitin system during *Legionella* infection.

S4-3

Bacterial escape from host defense mediated by the interferon-inducible ubiquitin E3 ligase RNF213

○Jörn Coers (Duke Univ. Sch. Medicine)

A key signal that coordinates the host's defense against a wide range of infections is the lymphocyte-derived cytokine interferon-gamma (IFN γ). The IFN γ receptor is found on most human cells, and its activation triggers the expression of antimicrobial proteins that initiate various cell-autonomous immune responses. One such immune response involves the detection, ubiquitylation, and degradation of intracellular pathogens. Recently, the IFN γ -inducible ubiquitin E3 ligase RNF213 was identified as a crucial mediator in this defense pathway. RNF213 plays a protective role against viral, protozoan, and bacterial infections. Intracellular bacterial pathogens such as *Chlamydia*, *Burkholderia*, and *Shigella* evolved diverse strategies to counteract the RNF213-mediated immune response. This presentation will summarize our current understanding of the antibacterial activities of human RNF213 and describe the mechanisms by which intracellular bacterial pathogens blunt the effectiveness of RNF213-executed cell-autonomous immunity.

S4-4

Multi-tired regulation of host ubiquitin system by *Legionella pneumophila*

○久堀 智子¹, 新崎 恒平², 永井 宏樹¹ (¹岐阜大・医・病原体制御, ²東京薬大・生命)

○Tomoko Kubori¹, Kohei Arasaki², Hiroki Nagai¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Gifu Univ., ²Sch. Life Sci, Tokyo Univ. Pharm Life Sci.)

Legionella pneumophila is an opportunistic intracellular bacterial pathogen that hijacks host cellular membrane-traffic to establish a replicative niche. The successful intracellular colonization is central to its virulence. The underlying modulation of the host factors is achieved by intricate actions of bacterially delivered effector proteins. *L. pneumophila* recruits many Rab GTPases to its vacuole and exploits their activities. Here, we found that infection-associated regulation of Rab10 dynamics involves ubiquitin signaling cascades mediated by the SidE and SidC families of *Legionella* ubiquitin ligases. Phosphoribosyl-ubiquitination of Rab10 catalyzed by the SidE ligases is crucial for its recruitment to the bacterial vacuole. SdcB, the previously uncharacterized SidC family effector, resides on the vacuole and contributes to retention of Rab10 at the late stages of infection. We further identified MavC as a negative regulator of SdcB. By the transglutaminase activity, MavC crosslinks ubiquitin to SdcB and suppresses its function, resulting in elimination of Rab10 from the vacuole. These results demonstrate that the orchestrated actions of many *L. pneumophila* effectors fine-tune the dynamics of Rab10 during infection.

S4-5

Bacterial manipulation of host ubiquitin signaling

○Jonathan Pruneda (Dept. Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health & Science Univ.)

A healthy immune response to infection requires rapid and robust post-translational signaling following pathogen detection. At the heart of many immune signaling pathways is the essential regulatory modifier ubiquitin, which can signal for many different cellular outcomes including protein degradation or kinase activation. Some bacterial detection pathways even require three or four discrete types of ubiquitin modifications for proper signaling. Unfortunately, pathogenic bacteria have evolved secreted effector proteins that redirect, inhibit, or eliminate host ubiquitin signaling events in order to facilitate invasion, replication, and persistence. Although some families of these ubiquitin-targeted effectors are eukaryote-like in structure and mechanism, others are entirely distinct and likely reflect a strong evolutionary pressure that has led to convergence of function. Our research aims at identifying novel ubiquitin-targeted effectors among human pathogens, characterizing their target specificity and mechanism of action, and evaluating their contribution to infection and disease. I will present our latest findings that demonstrate the remarkable strategies employed by bacteria to subvert host signaling, and highlight how studying these effectors can shed light on both host and microbe biology.

S4-6

Modulation of Bacterial Infection by Ubiquitination

○中川 一路 (京都大・医・微生物感染症学)

○Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Sch. Med., Kyoto Univ.)

Ubiquitin plays critical roles in various cellular processes. Beyond these functions, ubiquitination is pivotal in host defense, enabling the detection and labeling of invading pathogens and triggering xenophagy. However, the specific bacterial components targeted by ubiquitination and the enzymes involved remain insufficiently understood due to the diversity of ubiquitinating enzymes and bacterial structures. Using Group A *Streptococcus* (GAS) as a model, our research has illuminated ubiquitination pathways that drive xenophagy. We demonstrated that FBXO2, a glycoprotein-specific substrate receptor within the SCF ubiquitin ligase complex, recognizes GlcNAc moieties on GAS surface carbohydrates, facilitating ubiquitin-mediated xenophagy. Additionally, we identified that the E3 ubiquitin ligase SIAH1 is crucial for recognizing and ubiquitinating SLO. SIAH1-mediated ubiquitination enhances autophagosome formation and maturation, bolstering the degradation of intracellular GAS. These findings reveal that ubiquitination targets not only bacterial surface proteins but also glycans and secreted toxins, highlighting the adaptability of host ubiquitination systems. This versatility enables precise recognition and neutralization of pathogens, regulating bacterial invasion and pathogenicity.

S5

微生物モニタリングの現状と今後の課題

コンピーナー：丸山 史人（広島大学）
河原 隆二（大阪健康安全基盤研究所）

Current Status and Future Challenges of Microbial Monitoring

Conveners: Fumito Maruyama (Hiroshima University)
Ryuji Kawahara (Osaka Institute of Public Health)

SARS-CoV-2 が問題となった初期のころから下水モニタリングの有用性が指摘されている。特に下水モニタリングは蔓延する可能性のある感染症の病原体をいち早く捉えることができるので、次のパンデミックに備える上でも重要である。一方、大気や海洋の微生物に関する知見は、いまだ十分とは言えない。本シンポジウムでは、我が国における大気、河川、海洋、下水などのモニタリングの取り組みと AMR モニタリングの現状と今後の展望について議論する。

共催：島津製作所
Co-sponsorship by Shimadzu Coporation

S5-1

都市下水サーベイランスによる薬剤耐性菌モニタリングの可能性と課題

○河原 隆二（大阪健康安全基盤研究所）

Potential and challenges of monitoring drug-resistant bacteria through urban wastewater surveillance

○Ryuji Kawahara (Osaka Inst. Public Health)

新型コロナウイルスの大流行を受け欧米を中心に都市における下水サーベイランスが導入され、主にウイルス性感染症の流行状況を把握する新たなツールとして普及しつつある。現在、この下水サーベイランスの対象を病原細菌にも拡張しようとする試みや議論が行われているが、何を対象とするのか、サンプリングや前処理、検出の方法の選択と至適化、データの解釈と活用など、様々な課題があることが指摘されており、さらなる研究が求められている状況にある。薬剤耐性菌は下水サーベイランスの最も有望なターゲットの一つとされており、特に患者に限らず健康保菌者も含めた社会全体のモニタリングが可能となることが期待されている。そこで我々は、薬剤耐性菌のうち、特にカルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)をターゲットとし、培養法に基づいた大都市の下水処理場の流入水における実態調査を行なった。その結果、国内で稀な NDM 型や KPC 型 CRE が多く検出された一方で、地域の医療機関でよく報告される IMP 型 CRE の検出は少なかった。これをどのように解釈するべきか、また何らかの公衆衛生的対策を検討するべきなのか、下水サーベイランスの「課題」が浮かび上がる結果となった。今後、分離した CRE 菌株のゲノム解析や下水サンプルから qPCR/dPCR によるカルバペネマーゼ遺伝子の検出などを予定しており、本発表ではそれらの結果も加味した上で、都市下水サーベイランスの実例と課題について紹介したい。

S5-2

食品及び河川水における基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の解析

○西野 由香里、尾畑 浩魅、市川 めぐみ、三橋 華子、黒田 寿美代、山崎 華恵子、横山 敬子、三宅 啓文、貞升 健志（東京都健康安全研・微生物部）

Investigation of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail food and river water in Tokyo

○Yukari Nishino, Hiromi Obata, Megumi Ichikawa, Hanako Mitsuhashi, Sumiyo Kuroda, Kaeko Yamazaki, Keiko Yokoyama, Hirofumi Miyake, Kenji Sadamasu (Dept. Microbiol., Tokyo Met. Inst. Pub HLTH.)

薬剤耐性菌の増加が国際的な課題となっており、ヒト、動物、食品及び環境に由来する薬剤耐性菌について、分野横断的な取組が必要とされている。薬剤耐性菌の拡大を抑制するためには、各分野でのモニタリングが重要となるが、食品や環境分野における薬剤耐性菌の動向の把握は十分とは言えない。第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示すため、ヒト臨床において重要な薬剤耐性菌である基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生大腸菌は、臨床のほか、健康者、食品や河川水等の環境からの分離も報告されている。ヒトでの ESBL 産生大腸菌による感染症では、フルオロキノロン耐性・系統発生群 B2-血清型 O25-ST131 クローン (ST131 株) が流行しており、ST131 株が保有する主な ESBL 遺伝子として、*bla*_{CTX-M-15} や *bla*_{CTX-M-27} が報告されている。一方、食品や環境中の ESBL 産生大腸菌については報告が少なく、その実態把握が求められている。我々は、薬剤耐性モニタリングの指標菌として扱われている大腸菌を対象に、食品及び河川水由来株の薬剤耐性について調査を行った。分離された食品及び河川水由来大腸菌株において、割合は低いが ESBL 産生株が検出された。ESBL 産生株について解析し、食品由来株と河川水由来株の比較を行ったところ、系統発生群や薬剤感受性、ESBL 遺伝子の特徴に違いがみられた。今回、食品及び河川水から分離された ESBL 産生大腸菌における ST131 株の検出状況や ESBL 遺伝子の特徴等について紹介する。

S5-3

下水疫学：ポストコロナ時代における新たな研究展開

○北島 正章（東京大・工・水環境工学）

Wastewater-based Epidemiology: New Research Developments in the Post-COVID Era

○Masaaki Kitajima (RECWET, Sch. Eng., Univ. Tokyo)

下水疫学調査（下水サーベイランス）は、患者の検体に依存せず、効率的かつ非侵襲的に、集団レベルでの感染流行状況を客観的に把握できるツールとして期待を集めている。具体的には、下水には排泄物や分泌物とともに、あらゆる感染者から排出された病原体が含まれているため、症状の有無や受診行動、検査体制に左右されることなく、バイアスのない連続的なデータを取得できるという利点がある。我々の研究グループは、下水中ウイルスの高感度検出技術を開発し、自治体などでの実装を通じて COVID-19 の感染対策に貢献してきた。現在では、SARS-CoV-2 に加え、インフルエンザウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルスといった他の呼吸器系ウイルスや、薬剤耐性菌を含む病原細菌も当該技術によって下水から高感度に検出できることが確認されている。また、下水中の病原体のゲノム解析により、変異株の検出も可能である。さらに、海外からの感染症流入を監視する目的で、国際空港における航空機排水や空港ターミナルの下水を対象に、病原体検出調査を実施している。下水疫学調査は、COVID-19 のパンデミックを教訓に、今後構築すべき重層的かつ多面的な感染症監視体制の一要素として、また国家安全保障の観点からも公衆衛生上の危機に対抗する上で重要な手段と位置付けられつつある。技術的には既に実用化が進んでおり、有事だけでなく平時においても公衆衛生上の有用な情報を提供できることを実証するデータも蓄積されている。本講演では、下水疫学に関する技術開発と社会実装の現状、およびポストコロナ社会における新たな研究展開について、我々の研究グループの成果を中心に話題を提供したい。

S5-4

eDNA Sampler and In situ Gene Analyzer : Potential Applications in Microbiology

○福岡 辰洋^{1,2} (¹海洋研究開発機構, ²東大生産研)

○Tatsuhiko Fukuba^{1,2} (¹JAMSTEC, ²IIS, Univ. Tokyo)

We have been developing and improving a fully automated environmental DNA (eDNA) sampler with the aim of contributing to the expansion of eDNA sampling networks by automating the collection and preservation of eDNA samples in marine, lacustrine, riverine, and other aquatic environments. The standard floating buoy model is capable of automatically filtering and collecting up to 12 samples on disposable filter units according to the pre-set schedule and supplying DNA preservation reagents such as RNAlater. To meet a variety of scientific needs, several derivative models, such as a deep-sea model and a miniature model, have also been developed and evaluated. In addition, we are striving to enable automated genetic analysis in marine environments by integrating in situ PCR functionality. Our efforts in Lab-on-a-Chip (LOC) technology have already resulted in a miniaturized device that successfully conducted bacterial gene detection using PCR in the deep sea. Furthermore, to detect fish eDNA from larger volumes of samples, we are advancing the integration of LOC technology with the eDNA sampler. These technologies are applicable not only to environmental DNA research on organisms such as fish but also to the field of microbial research.

S5-5

Challenges for Quantitative Analysis of Airborne Microorganisms

○藤吉 奏, 丸山 史人 (広島大・IDEC・PHIS)

○So Fujiyoshi, Fumito Maruyama (PHIS, IDEC, Hiroshima Univ.)

Bioaerosol monitoring faces challenges due to lower microbial densities in atmospheric samples (10^3 - 10^7 cells m^{-3}) compared to soil ($> 10^8$ cells g^{-1}) and aquatic environments ($> 10^5$ cells mL^{-1}). Our research trials reveal critical aspects of bioaerosol quantification and real-time analysis. Particle size significantly influences microbial dispersion, for example: while *Legionella* are detected in particles $> 2.1 \mu m$, PM1 ($< 1 \mu m$) is crucial for microbial dispersal. Methodological biases affect quantification: sampler orientation impacts collection efficiency, and DNA extraction from glass fiber filters shows high variability between extraction procedures due to the DNA adsorption. The choice of DNA extraction kit also influences community composition results. The challenges include the lack of standardized operation procedure for sampling low-density atmospheric microorganisms and difficulties in high-altitude air sampling, for example, by airplane due to near-surface contamination. While genomics and metagenomics have advanced our understanding of atmospheric microbial diversity, the accurate quantification remains problematic. This presentation will address these challenges and possible solutions for improving the quantitation accuracy in bioaerosol monitoring, emphasizing the consideration of particle size-dependent distribution patterns.

S6

皮膚侵害性微生物の戦略

コンピーナー：豊留 孝仁 (国際医療福祉大学)
相川 知宏 (帯広畜産大学)

The Strategies of Skin Damaging Pathogens

Conveners: Takahito Toyotome (International University of Health and Welfare)
Chihiro Aikawa (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

皮膚は感染巣や病変が目で見えてわかることやかゆみ・痛みに対して手を使ってアプローチできることから我々にとって非常に身近な器官である。病原体との戦いのフロントラインであるが、皮膚に感染する病原体や皮膚の炎症や創傷感染での詳細なメカニズムは意外と知らないことが多い。外界との最初のバリアーとなる皮膚には、固有の微生物叢が存在し、定着して生体防御の役割を果たしている一方、このバランスの崩れや皮膚の損傷、それらに伴う宿主との攻防による炎症が様々な病態につながると考えられている。本セッションでは、皮膚に感染して傷害をおこす細菌や真菌の戦略に関する知見を発表頂き、その理解を深めたいと考えている。

S6-1

黄色ブドウ球菌の免疫誘導に影響する細菌の同定

○松本 靖彦, 杉田 隆 (明薬大・薬・微生物学)

Identification of bacteria affecting the immune activation by *Staphylococcus aureus*

○Yasuhiko Matsumoto, Takashi Sugita (Dept. Microbiol., Meiji Pharm. Univ.)

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は、ヒトの皮膚や鼻腔内に存在する細菌であり、アトピー性皮膚炎の増悪に関与する。黄色ブドウ球菌の菌体成分がケラチノサイトや免疫細胞に認識されて炎症が誘導される。よって、黄色ブドウ球菌による免疫誘導機構の理解は、アトピー性皮膚炎などの炎症性疾患の予防法の開発に貢献すると考えられる。黄色ブドウ球菌は、皮膚で皮脂などの宿主因子だけではなく多くの微生物と相互作用している。これまでに、コアグラゼ陰性のブドウ球菌が黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する要因として考えられている。特に、コアグラゼ陰性のブドウ球菌である表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌の存在比率が変化して黄色ブドウ球菌の存在比率が高くなるとアトピー性皮膚炎の増悪に関与することが知られている。よって、黄色ブドウ球菌と相互作用する皮膚微生物の中に黄色ブドウ球菌による免疫誘導に影響を与える要因があると考えられる。本研究では、黄色ブドウ球菌による免疫誘導を促進する可能性のある細菌として *Delftia acidovorans*, *Citrobacter koseri*, アクネ菌(*Cutibacterium acnes*)を同定した。*D. acidovorans* と *C. koseri* は、黄色ブドウ球菌の増殖を抑制しないが表皮ブドウ球菌の増殖を抑制した。アクネ菌が産生する分子が黄色ブドウ球菌の免疫誘導活性を上昇させた。これらの微生物の制御が黄色ブドウ球菌による炎症性疾患の予防に有用になり得る可能性を私は考えている。

S6-2

皮膚細菌叢の最新研究や医療応用を目指した取り組み

○林 直樹 (マルホ株式会社)

The skin microbiome: research and future in medicine

○Hayashi Naoki (Maruho Co., Ltd.)

ヒトの体表面全体を覆う皮膚は生体が外界に接する最外層の臓器であり、水分の蒸散防止、皮脂・汗の分泌などの生体恒常性の維持と、外界からの異物（アレルゲン・病原体など）の侵入を防御するバリアとしての役割を担っている。これまで皮膚では単一の細菌種に着目した感染症研究が主流であったが、この10年間で腸内細菌叢に次いでヒトと皮膚細菌叢の共生が明らかとされ、我々の健康における皮膚細菌叢の重要性やその医療応用への可能性が着目され始めている。

皮膚は成人で1.6 m²であり、これら皮膚表面や付属器官には約40菌種、計10¹⁰~10¹¹個の細菌が生息しており、皮膚細菌叢の構成比率は皮膚部位ごとの環境に応じて大きく異なる。すなわち、好気性の体表面の湿潤部位では *Staphylococcus* 属が、脂腺や体表面の脂質が多い部位では *Cutibacterium* 属細菌や *Corynebacterium* 属が優占菌種である。近年、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、尋常性ざ瘡（ニキビ）など様々な皮膚疾患で、皮膚細菌叢の構成比率が乱れていること（ディスバイオーシス）が明らかとなり、ディスバイオーシスが疾患の原因か結果であるかの議論はあるものの医療応用に向け、皮膚細菌叢の研究領域が着目されている。また、皮膚細菌の機能を利用した創薬では従来の低分子に加え、生菌製剤（Live biotherapeutic products）などの新たな創薬モダリティの開発が進んでいる。

本講演では、皮膚細菌叢と疾患の最新知見に加え、新たな創薬モダリティのグローバルな業界動向、これに対する弊社の最近の取り組みを紹介する。

S6-3

皮膚糸状菌の細胞形態形成の分子機構

○石井 雅樹 (武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Molecular mechanisms of cell morphogenesis in dermatophytes

○Masaki Ishii (Research Inst. Pharmaceutical Sciences, Fac. Pharmacy, Musashino Univ.)

皮膚糸状菌症の主要な病原体であり、主にヒトの表皮組織に存在する白癬菌 *Trichophyton rubrum* の感染において、細胞形態形成は感染に不可欠なプロセスである。*T. rubrum* は、菌糸として知られる高度に極性化した細胞からなる糸状構造の伸長によって増殖する。一方で、独立した細胞からなる微小胞子と呼ばれる無性胞子を環境刺激に応答して形成する。さらには、ヒトの爪や髪の毛などの過度なストレス環境においては、分節分生子と呼ばれるストレス耐性の細胞形態を形成する。このようなダイナミックな形態変化は、*T. rubrum* の増殖と環境適応において重要な役割を担っているにもかかわらず、その根底にある分子メカニズムは不明なままである。本発表では、近年蓄積し始めた白癬菌の遺伝学的手法により明らかになった知見の中から、環境応答の結果として見られる細胞形態形成制御機構について、特に菌糸形態形成に着目し概説する。さらに、白癬菌の細胞形態形成を担う分子を標的とした抗真菌化合物の探索に関して、最近の進捗を紹介する。また、病原体として動物の表皮組織という特殊な環境に生息する白癬菌の環境因子に依存した細胞応答に関しても細胞形態形成という視点で再検討する。白癬菌の宿主環境における応答機構や病原因子に関してはいまだにほとんど解明されていない。表皮組織に感染する主要な病原体である白癬菌と宿主であるヒトとの相互作用に関して、病原体の側からどのように研究を進展させていくか、その展望についても議論したい。

S6-4

Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in dermatophytes

○山田 剛^{1,2} (¹帝京大・真菌センター、²帝京大・アジア国際感染症制御研)

○Tsuyoshi Yamada^{1,2} (¹Inst. Med Mycol., Teikyo Univ., ²Asia Intl. Inst. Infect. Dis. Ctrl., Teikyo Univ.)

Superficial fungal infections of the skin, hair, and nails affect 20-25% of the world population and rank as the fourth most common human disease. Dermatophytes are fungal pathogens that have a high affinity for the keratinized structures present in nails, skin, and hair, causing superficial infections known as dermatophytosis. Tinea pedis and tinea unguium are primarily caused by two major anthropophilic dermatophytes, *Trichophyton rubrum* and *T. interdigitale*. The acquisition of drug resistance by the causative agents of microbial infections poses serious threats not only to the patients but also to society as a whole. Currently, the development of new antimicrobial agents is declining, and drug resistance in microbial pathogens is increasingly recognized worldwide as a major health threat. While antifungal drug resistance has often been a concern for fungal pathogens causing life-threatening deep-seated mycoses, like *Candida albicans*, *C. auris* and *Aspergillus fumigatus*, it was considered exceptionally rare in dermatophytes until the mid-2010s. However, since around 2017, dermatophytes showing antifungal drug resistance have been isolated in various countries, becoming a significant problem. In this symposium, we will discuss the mechanisms of resistance to terbinafine, an allylamine compound, and azole compounds such as itraconazole in dermatophytes.

S6-5

The critical role of vascular permeability and chemotaxis in *Vibrio vulnificus* pathogenesis

○山崎 浩平¹, 大森 麦穂¹, 瀧本 みのり¹, 石田 快², 下畑 隆明³, 吉岡 一機⁴, 柏本 孝茂¹ (¹北里大・獣医・獣医公衆衛生、²京都府立医大・医・感染病態、³福井県立大・海洋生物資源、⁴北里大・獣医・獣医解剖)

○Kohei Yamazaki¹, Mugiho Omori¹, Minori Takimoto¹, Kai Ishida², Takaaki Shimohata³, Kazuki Yoshioka⁴, Takashige Kashimoto¹ (¹Lab. Vet. Public Health, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., ²Dept. Infect. Dis., Kyoto Pref. Med. Univ., ³Dept. Mar. Sci. Tec., Fukui Pref. Univ., ⁴Lab. Vet. Anatomy, Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

Vibrio vulnificus is a gram-negative bacterium causing necrotizing soft tissue infections, often called flesh-eating bacteria. Infections occur through raw seafood consumption or wound exposure to contaminated water. Our study highlights the role of increased vascular permeability in *V. vulnificus* pathogenesis. Subcutaneous inoculation in mice caused rapid swelling. Vascular permeability increased in skin and subcutaneous tissue, later extending to muscle, correlating with bacterial growth and tissue necrosis.

Motility and chemotaxis of *V. vulnificus* were essential for tissue invasion, as demonstrated with non-motile and non-chemotactic mutants. Wild-type spread efficiently in skin and soft tissues, invaded muscle, and caused deep necrosis and high lethality. Mutants exhibited reduced spread, remained localized, and caused less necrosis.

Further screening identified a chemoreceptor, which is critical for muscle invasion. The mutant deficient in this receptor failed to invade muscle with limited necrosis. Although the ligands of the receptor remain unknown, metabolomics analysis revealed depleted metabolites, potentially acting as chemoattractants for bacterial spread. Identifying the ligands could lead to therapies targeting chemotaxis, reducing infection severity. Future research will focus on elucidating these ligands and advancing therapeutic strategies.

S6-6

Visualization of antimicrobial treatment efficacy in cutaneous infections of *Mycobacterium marinum*

○山本 健太郎¹, 鳥越 祥太^{1,2}, 辻村 祐佑¹, 浅賀 正充¹, 奥村 香世², 阿戸 学¹ (¹国立感染症研・感染制御, ²国立感染症研・安管)

○Kentarō Yamamoto¹, Shota Torigoe^{1,2}, Yusuke Tsujimura¹, Masamitsu Asaka¹, Kayo Okumura², Manabu Ato¹ (¹Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, ²Biosafety. Res. Ctr., Lab. Anim., and Pathog. Bank, NIID)

Mycobacterium marinum (*M. marinum*) is the primary bacterium responsible for cutaneous non-tuberculous mycobacterial (NTM) infections, including fish tank granuloma. Treating *M. marinum*-caused infection generally requires a longer duration compared to other NTM diseases because *M. marinum* is less susceptible to antimicrobial agents. Currently, a standard treatment protocol for *M. marinum* infection has not been established, and there have been few in vivo studies conducted in mammals to assess the bactericidal properties of antimicrobials. In this study, we utilized a non-invasive in vivo imaging technique to demonstrate that a combination of clarithromycin, rifampicin, ethambutol, and minocycline successfully cleared *M. marinum* from the footpad. Granulomas with necrotic abscesses formed on the footpad of *M. marinum*-infected mice, primarily due to neutrophils involved in the host's cell-mediated immune response. Interestingly, immune mediators and cells activated by the *M. marinum* infection in the footpad were significant contributors to hypersensitivity and granuloma formation, as seen in pulmonary tuberculosis. This novel imaging analysis could serve as a valuable tool for the study of mycobacterial and various bacterial infections.

S7

海外の一流 PI から学ぶ研究留学のすすめ

コンピーナー：日吉 大貴（長崎大学）
原 英樹（旭川医科大学）

Recommendations for Research Abroad: Take Lessons from International Eminent Principal Investigators

Conveners: Hirotaka Hiyoshi (Nagasaki University)
Hideki Hara (Asahikawa Med University)

海外の長期留学者数は、2000年初頭をピークに半減したとのデータがある。これは新型コロナウイルス感染症の影響も大きいですが、それ以前から研究留学を進路に選択する若手研究者が少なくなったことが実感できる。研究留学とは、言葉や文化が違う中で新たな生活を築き、海外で自身の研究を発展させるためのシンプルな挑戦になるが、世界中の研究仲間との輪を広げ、後の研究生生活を円滑に進めるためのチャンスでもある。本シンポジウムにおいて、これまで日本人を受け入れ、インパクトのある研究を行なわれた4人の一流PIを海外からお招きし、それぞれ最新の研究結果や日本人研究者との思い出などを講演いただくことで、海外留学に興味を持つ若手研究者を鼓舞し、挑戦の後押しに繋がることを期待している。

S7-1

Microbiota-Host Interactions in Health and Disease

○Gabriel Nunez (Univ. Michigan)

The intestinal tract of mammals is colonized by a large number of microorganisms that are referred to collectively as the gut microbiota. The microbiota provide beneficial functions to the host, but also can promote disease. The presentation will focus on research performed in our laboratory using animal models that aims to understand the mechanisms by which members of the microbiota promote inflammatory intestinal disease in genetically susceptible individuals or in cancer patients after immune checkpoint blockade.

Kim et al. ...Núñez, G. (2017). Neonatal Acquisition of Clostridia Species Protects Against Colonization by Bacterial Pathogens. *Science* 356:315-319.

Kuffa et al. ... Núñez G, Caruso R (2023). Fiber-deficient diet inhibits colitis through the regulation of the niche and metabolism of a gut pathobiont. *Cell Host Microbe* 31:2007-2022

Lo et al... Núñez, G. (2024). Microbiota-dependent activation of CD4+ T cells induces CTLA-4 blockade-associated colitis via Fc receptors. *Science* 383:62-70.

S7-2

Autophagy and antimicrobial defense

○Ken Cadwell (Div. Gastroenterology and Hepatology, Dept. Medicine, Univ. Pennsylvania Perelman Sch. Medicine)

Autophagy is one of the main pathways by which eukaryotic cells degrade and recycle intracellular material. The coordinated action of autophagy-related proteins (ATGs) attaches the ubiquitin-like molecule ATG8 (LC3) to membranes that expand around substrates in the cytosol and trap them in the characteristic double-membrane vesicle termed the autophagosome, which can fuse with endolysosomes to mediate degradation and recycling of the contents. A genetic variant of ATG16L1, a core ATG, increases the risk of developing inflammatory bowel disease, suggesting an important function for autophagy in gut immunity. Among the first immune functions identified for autophagy is the sequestration of invasive microbes in autophagosomes. More recently, we and others have shown that ATG16L1 has innate immune functions beyond autophagosome formation, including secretion of extracellular vesicles (defensosomes) that neutralize bacterial toxins and mediating trafficking of phagosomes. Here, we will discuss our progress in characterizing novel mechanisms by which ATG16L1 participates in autophagy and related pathways to regulate defense against bacterial pathogens.

S7-4

African *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ST313 Isolates Prevent Reactive Oxygen Species Production by Human Neutrophils via Elevated PgtE Expression

○Renee Tsolis¹, Annica Stull-Lane¹, Lizbeth Camacho¹, Hirotaka Hiyoshi²
(¹Dept. Medical Microbiology and Immunology, Univ. California at Davis,
²Dept. Bacteriology, Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ.)

A recently emerged *Salmonella enterica* serotype Typhimurium variant, ST313, is a frequent cause of bloodstream infections are associated with high mortality rates in sub-Saharan Africa. While the interaction of ST313 strains with macrophages has been studied extensively, interactions with other innate immune effectors such as neutrophils have been largely ignored. We found that a subset of ST313 strains induces an attenuated neutrophil oxidative burst, which can facilitate increased bacterial survival within human neutrophils. The ST313 isolates that avoid triggering potent reactive oxygen species production by neutrophils express elevated levels of the protease PgtE. Increased *pgtE* expression promotes decreased complement deposition on *S. Typhimurium* and a concomitant increase in disseminated infection in mice. Our results show that high-level PgtE expression contributes to evasion of the neutrophil oxidative burst by *S. Typhimurium*, suggesting a possible mechanism contributing to invasive *S. Typhimurium* disease.

S7-3

Investigating host-pathogen interactions using animal models of disease

Matthew K. Waldor (Mass General Brigham, Harvard Medical School)

My laboratory creates and applies approaches to define the genes, proteins, and metabolites that mediate interactions between enteric bacterial pathogens and their hosts. By integrating pathogen- and host-directed profiling methods, our work has advanced understanding of the principles that govern their interactions, provided fundamental insights into pathogen and host cell biology, and guided therapeutic development. In my talk, I will illustrate a few of the projects that have been carried out in the lab by the exceptionally talented Japanese post-doctoral fellows that I have had the good fortune to be a part of my group over the past decade. In particular, I will discuss the 1) the contributions of microbial tRNA modification to pathogen virulence; and 2) the use of single cell RNA sequencing to understand host responses in experimental cholera.

薬剤耐性菌に待ったなし、感染症薬に王道なし

コンピーナー：知花 博治（千葉大学真菌センター）
鹿山 鎮男（国立感染症研究所）

Antibiotic-resistant bacteria do not wait for serious situations, and there is no silver bullet for infectious diseases

Conveners: Hiroji Chibana (Medical Mycology Research Center, Chiba University)
Shizuo Kayama (National Institute of Infectious Diseases)

ワンヘルスの視点から薬剤耐性菌の疫学を多角的に探り、細菌ゲノム解析を通じて人、家畜、食品、環境における薬剤耐性因子の相関を示す。また、2016年のAMR対策アクションプランに続き、2023年の新たなアクションプランを踏まえ、日本および世界の薬剤耐性菌の動向を報告する。これらの現状を踏まえた上で、感染症薬の開発における革新的なアプローチを模索し、次世代の治療戦略に役立つ情報を共有する。

S8-1

サーベイランスデータから見る薬剤耐性対策の現状と展望

○平林 亜希, 矢原 耕史, 川上 小夜子, 梶原 俊毅, 阪原 由美子, 矢野 大和, 北村 徳一, 菅井 基行（感染研・AMR）

Current status and future perspectives on AMR strategies based on surveillance data

○Aki Hirabayashi, Koji Yahara, Sayoko Kawakami, Toshiki Kajihara, Yumiko Hosaka, Hirokazu Yano, Norikazu Kitamura, Motoyuki Sugai (AMR Res. Ctr., NIID)

薬剤耐性の問題に対応するため、わが国では「ワンヘルス」の視点から、政策面や現場において様々な取り組みがなされてきた。特に「ヒト」分野における対策の一つとして、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）は2000年より院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況、さらに薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査し、我が国における院内感染の概況を把握するとともに、医療現場への院内感染対策に役立つ情報の還元を行ってきた（<https://janis.mhlw.go.jp>）。JANISは現在、全国で3000以上の病院をカバーし、特に一般細菌検査データを全て収集している点で、世界で最も包括的な薬剤耐性サーベイランスの一つである。JANISのデータは我が国の薬剤耐性対策アクションプランの基盤となり、またWHOの薬剤耐性サーベイランスにも提供されている。一方、JANISでは菌株や遺伝子の情報を収集していない点を補完するため、JANISとリンクして特定の薬剤耐性菌株を全国から収集し、ゲノム解析を行って耐性遺伝子や病原性遺伝子を網羅的に検出し、菌株の型別を行った結果を参加医療機関に還元しながら、日本全国の主要な薬剤耐性菌の動向をゲノムおよび遺伝子レベルで監視するサーベイランス「JARBS」（<https://jarbs.net>）も、AMEDの支援を受けて2019年から発展を遂げている。本シンポジウムでは、JANISやJARBS等のナショナルサーベイランスから得られた薬剤耐性菌の動向や調査結果を紹介し、さらに今後の対策の方向性や国際機関との連携についても言及し、薬剤耐性に対する新たな解決策に向けた情報を共有する。

S8-2

JARBS-GNRで収集されたカルバペネマーゼ産生グラム陰性菌に対するCefiderocolの抗菌活性

○鹿山 鎮男, 川上 小夜子, 青木 貞男, 奥田 幹久, 于 連升, 林 航, 菅原 庸, 矢原 耕史, 菅井 基行（感染研・薬剤耐性）

In vitro activity of cefiderocol against carbapenemase-producing Gram-negative bacteria (JARBS-GNR)

○Shizuo Kayama, Sayoko Kawakami, Aoki Sadao, Mikiyoshi Okuda, Liansheng Yu, Wataru Hayashi, Yo Sugawara, Koji Yahara, Motoyuki Sugai (Antimicro. Resist. Res., NIID)

【背景】カルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌への対応として新規抗菌薬の適用が挙げられる。薬剤ごとの感受性率のばらつきは各地域で優勢なβ-ラクタマーゼの種類に影響される可能性があるため、新規抗菌薬の導入効果を事前に予測するには、単に海外からの報告を取り入れるだけでは十分ではない。2023年、新規シデロフォアセファロスポリン系抗菌薬であるCefiderocol（CFDC）の製造販売承認が下りた。そこで、日本で実施された薬剤耐性菌サーベイランス JARBS（Japan Antimicrobial Resistant Bacterial Surveillance）で2019、2020年に収集されたカルバペネマーゼ産生菌を対象にCFDCのin vitro活性を評価した。【方法】カルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌307株および非発酵菌（緑膿菌18株、アシネトバクター57株）に対するCFDC、ceftolozane-tazobactam, imipenem-relebactam, ceftazidime-avibactamのMICを微量液体希釈法にて測定した。【結果】腸内細菌目の97.7%（300/307株）はCFDCに感性を示し、今回検討した他の薬剤よりも優れた抗菌活性を示した。CFDCはカルバペネマーゼのクラス（A, B, D）に関わらず高い効果を示したがNDM保有株のMIC値は他のカルバペネマーゼ保有株に比べてやや高い傾向にあった。また、IMP保有株はCFDCに耐性を示さなかった。CFDC耐性腸内細菌目細菌にはミノサイクリンが最も高い活性を示した。【考察】CFDCは、IMPのような国内特有のカルバペネマーゼ保有株に対して高い活性を示した。

S8-3

Candida glabrata全遺伝子組換え体プラットフォームを活用した新規薬剤開発

○知花 博治（千葉大・真菌・病原機能）

Development of antifungal drugs using a genome-wide mutant platform in Candida glabrata

○Hiroji Chibana (Med. Mycol. Ctr., Chiba. Univ.)

抗真菌薬に対する耐性化問題は、特に *Candida auris* や *C. glabrata* をはじめとする non-*albicans* *Candida* 種において増加しており、感染症治療において脅威となっている。また、農業には抗真菌薬と同系統の化合物が使用されており、このことが医療現場と環境の双方で薬剤耐性化の進行をさらに複雑化させている。こうした背景のもと、研究室では *C. glabrata* をモデル生物とし、全ゲノムスケールでの遺伝子機能解析を可能にする独自の組換え体プラットフォームを開発した。このプラットフォームは、すべての遺伝子を網羅的に解析することで、薬剤標的候補を効率的かつ包括的に選定することができる革新的なツールである。このプラットフォームを活用し、特に殺菌的作用が期待される薬剤標的の同定に成功し、得られた知見を基に、薬剤耐性菌に対抗する包括的な治療戦略の構築を目指している。本発表では、このプラットフォームの開発背景、機能、および応用例を紹介するとともに、薬剤耐性化問題に対する新たな治療法の可能性と将来的な薬剤開発の展望について議論を行う。

S8-4

新規作用機序を示す抗菌治療薬の開発の課題と展望

○浜本 洋 (山形大・医・感染症)

Challenges and Prospects for the Development of Antimicrobial Agents with Novel Mechanisms of Action

○Hiroshi Hamamoto (Dept. Infect. Dis., Yamagata Univ. Fac. Med.)

薬剤耐性菌に対抗するためには、新規作用機序を示す化合物の開発が必要不可欠である。一方、新しい抗菌薬の開発は近年困難となってきた。科学的な問題として、天然物からの新規化合物の発見が探索の飽和により難しくなっている。また、化合物が治療効果を示すこと自体が稀である。さらに、薬剤耐性菌が問題となっているグラム陰性の腸内細菌目の細菌は、そもそも抗菌活性を示す化合物を見出すことが難しい。一方、産業的な観点からは、新しい抗菌薬を開発したとしても、それが薬剤耐性菌専用の薬となるため、処方されにくく、マーケットサイズが小さいという問題がある。このため、製薬会社が手掛けにくい分野となってしまっている。最近、開発を促進するためのインセンティブも付与されつつあるが、新しい治療薬を開発するのは非常にチャレンジングな課題であり、公的セクターを担うアカデミアの責務と言えるだろう。私たちは、治療効果を示す治療薬を簡便に探索するための評価系として、カイコを用いた各種細菌・真菌の感染モデルを確立した。これまでに、そのカイコモデルを用いて、黄色ブドウ球菌に有効な新規メカニズムを持つ新規抗生物質ライソシン E を同定した。ライソシン E は既存の抗菌薬と比較して殺菌力が非常に強く、形成されたバイオフィilmをも破壊できる活性を有する。このため、既存の治療薬が無効な難治性の黄色ブドウ球菌感染症の治療薬としての開発が進められている。本シンポジウムでは、我々の抗菌薬開発の取り組みを通じて得られた経験を基に、抗菌薬の開発の現状とその課題について議論したい。

S9

微生物学はマイクロナノ理工学とマッチングできるのか？

コンピーナー：中根 大介 (電気通信大学)
塚本 健太郎 (大阪大学)

Microbiology meets micro-nano engineering

Conveners: Daisuke Nakane (UEC)
Kentaro Tsukamoto (Osaka University)

近年、微小流体デバイスを活用して、組織・臓器を形成する「Organ-on-a-chip」技術が大きな注目を集めており、感染現象の解明にも応用されつつある。このような生体組織を模倣するというアプローチは、感染症における病原体と宿主の相互作用を理解する上で重要な技術的ツールとなる。このセッションでは、微生物学とマイクロ・ナノエンジニアリングの交差点で生まれる革新的な研究や技術の展望を紹介する。最新の研究成果を共有するとともに、理工学との融合的な研究の有用性と感染症研究への限界と可能性について議論したい。

共催：学術変革 B「微生物が動く意味」
Co-sponsorship by JSPS Grant-in-Aid for Transformative
Research Areas (B) The reason why microbes are moving

後援：AMED
Supported by AMED

S9-1

What happens when bacteria go out into the wild?

○中根 大介 (電通大・基盤理工)

○Daisuke Nakane (Dept. Eng. Sci., UEC)

Behavioral exhibits have gained significant popularity in modern zoos, where wild-like environments are recreated to allow visitors to observe the natural behaviors of animals. Could a similar concept be applied to bacteria? Research on micro-nano scale organisms, such as bacteria, has traditionally focused on their responses to chemical stimuli. However, their reactions to mechanical stimuli, as seen in those observed in eukaryotic cells, remain poorly understood. In this presentation, I will share findings from experiments visualizing bacterial behavior under physical stimuli common in natural environments, such as water flow and spatial constraints, reproduced in a laboratory setting. Through videos, we will demonstrate bacteria employing unique motility mechanisms, including "flagellar wrapping," where helical filaments wrap around their bodies, and Spiderman-like movement driven by the extension and retraction of type IV pili. I will discuss the functional significance of these distinctive movements in bacterial behavior and adaptation.

S9-2

Microvessel-on-a-chip: A novel platform for evaluating host-pathogen interactions in *Bartonella*

○塚本 健太郎 (大阪大・微研・人獣共通細菌)

○Kentaro Tsukamoto (Lab. Bacterial Zoonoses., RIMD, Osaka Univ.)

Bartonella henselae, a zoonotic pathogen causing cat-scratch disease and other atypical symptoms including endocarditis, encephalitis, and bacillary angiomatosis, exhibits the unique property of inducing neovascular formation (angiogenesis) during infection. Although this “pro-angiogenic property” is believed crucial for bacterial infectivity and pathogenicity, its contribution to human infection remains unclear due to the lack of appropriate infection models. This study aims to establish a novel *Bartonella* infection model using the microvessel-on-a-chip (MV chip) platform that mimics the human vascular environment. The MV chip has been developed by culturing human umbilical vein endothelial cells within a collagen gel on a polydimethylsiloxane substrate, enabling evaluation of both angiogenesis and vascular permeability, thus proving valuable for understanding human vascular responses (Pauty et al., Nanotheranostics, 2017). When MV chips were infected with *B. henselae* isolates exhibiting different properties towards vascular endothelial cells, significant variations in their pro-angiogenic abilities were observed. This model allows simultaneous visualization of *Bartonella* infection and resultant angiogenesis, offering insights into the dynamics and effects of this microorganism within the blood vessel microenvironment.

S9-3

In vitro tube-shaped intestinal model with crypt-like inner surface for bacterial co-culture

○尾上 弘晃 (慶大・理工・機械工学科)

○Hiroaki Onoe (Dept. Mech. Eng., Faculty of Sci. and Tech., Keio Univ.)

The human intestinal microbiome is crucial for food digestion and host immunity, with disruptions linked to digestive and chronic diseases. Understanding the interaction between intestinal cells and the microbiome requires artificial models, especially those mimicking crypt-villus structures, which are key to intestinal homeostasis. While methods like laser ablation and elastomeric stamps have been used to create crypt-like structures, they often lack biomimicry due to planar designs and require expensive equipment and lengthy processing times. To overcome these issues, we developed an artificial intestinal tube with a textured inner surface using microbubbles generated by electrolysis. The device features collagen hydrogels with 3D crypt-shaped cavities that mimic in vivo structures and can be fabricated quickly using a standard waveform generator. It also supports perfusion culture via an external pump system. This study highlights the optimization of voltage application and electrode wetting for microbubble control and discusses co-culturing intestinal tissue with bifidobacteria.

S9-4

マラリア原虫スポロゾイトの肝臓洞通過と肝細胞寄生を再現する仮想肝臓チップの開発とその応用

○新澤 直明¹, 馬場 みなみ¹, 岡田 玲那¹, 出口 清香², 高山 和雄², 石野 智子¹ (¹東京科学大・院医歯学総合・寄生虫学・熱帯医学分野, ²京大・iPS研)

Development a of a liver-on-a-chip for the liver invasion by malaria parasites

○Naoki Shinzawa¹, Minami Baba¹, Reina Okada¹, Sayaka Deguchi², Kazuo Takayama², Tomoko Ishino¹ (¹Dept. Parasitol. Trop. Med., Grad. Sch. Med. Dent., Ins. Sci. Tokyo, ²CiRA, Kyoto Univ.)

マラリア原虫は、媒介蚊の吸血により皮膚内に侵入したスポロゾイトが血管を通じて肝臓に到達、肝臓洞壁を通り肝細胞に感染することでヒトへの感染が成立する。肝細胞内で増殖・分化したメロゾイトが血中に放出され、赤血球への感染を繰り返すことで高熱や脳症状を引き起こす。この肝細胞への寄生成立プロセスは予防ワクチンの重要な標的とされてきた。現在唯一のマラリアワクチン RTS,S はスポロゾイト表面タンパク質 CSP を標的としているが、その効果は限定的であり、改良が求められている。これまで齧歯類モデルを用いた研究で、CSP 抗体がスポロゾイトの肝細胞到達を阻害することが示されてきた。本研究では、抗体によるスポロゾイトの肝細胞感染阻害効果を簡便に評価するため、マイクロデバイスを構築した。このデバイスは、直径 3μm の穴が空いた PET 膜で仕切られた上下の流路を持ち、膜の下側に肝臓由来血管内皮細胞、上側に肝細胞を播種する構造である。感染ハマダラの唾液腺から回収したスポロゾイトをデバイスに添加し、培養することで、スポロゾイトが血管内皮細胞を通過し肝細胞に感染する様子を再現した。さらに、スポロゾイトを抗 CSP 抗体と混合すると、抗体濃度依存的に肝細胞感染が抑制されることを確認した。また、ヒト熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の CSP (PfCSP) を持つキメラスポロゾイトを用い、肝臓チップを活用して PfCSP 抗体の阻害効果を評価する系を確立した。本発表では、肝臓チップによるマラリア原虫肝臓感染系の有用性や予防抗体スクリーニングに向けた今後の展開についても議論を行いたい。

S9-5

原子間力顕微鏡による微生物の細胞表面構造・力学特性解析

○宮澤 佳甫^{1,2}, 福岡 剛士^{1,2} (¹金沢大・理工研究域フロンティア工学系, ²金沢大・ナノ生命科学研究所)

Surface and mechanical property measurements of microbial cells using atomic force microscopy

○Keisuke Miyazawa^{1,2}, Takeshi Fukuma^{1,2} (¹Faculty of Frontier Engineering, Inst. of Sci. and Eng., Kanazawa Univ., ²WPI-NanoLSI, Kanazawa Univ.)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中環境下で試料表面の微細構造や力学特性を非染色・未固定で観察できる計測手法であり、近年は分子から細胞・組織まで様々な生体試料の構造解析にも用いられるようになってきた。一方で、AFM を用いた微生物の応用計測は動物細胞と比べてやや遅れている状況である。これは、一般的に細胞計測用の AFM は光学顕微鏡と組み合わせて用いられることが多いが、微生物は光学顕微鏡にとっては小さく、AFM にとっては大きなサイズであり、AFM 計測自体が技術的に困難であることが一つの要因である。しかしながら、最近では Bruker 社を始めとする市販の AFM で比較的簡単に微生物細胞表面上における AFM 計測ができるようになり、グラム陽性菌のペプチドグリカン層 (Nature, 2020) やグラム陰性菌の外膜 (PNAS, 2021) など、微生物表面を 10-30 nm 程度の空間分解能で可視化した例が報告されてきた。このように、現在 AFM を用いた微生物表面構造解析が注目されている状況である。一方で、AFM は本来原子スケールの空間分解能を有するが、微生物表面における原子レベル AFM 構造観察は達成されていない。そこで、我々は AFM を用いた微生物の細胞壁の原子スケール構造解析手法の開発を目指している。本講演では、まずは AFM の基本原理を説明し、その後に細菌から真菌まで我々が AFM の応用計測のモデル系として取り扱っている微生物の計測事例を広く紹介する。細胞壁表面の糖鎖・タンパクや細胞内部の細胞膜の高分解能構造計測、細胞表面の力学特性計測 (弾性率、吸着力など) について最新の計測結果を紹介し、AFM で得られる結果から微生物が有する機能をどのように説明できるのか解説する。

S10

細菌と自己指向性免疫の新たな相互作用研究

コンビーナー：平安 恒幸（金沢大学）
柴田 健輔（九州大学）

Emerging interactions between bacteria and self-referential immunity

Conveners: Kouyuki Hirayasu (Kanazawa University)
Kensuke Shibata (Kyushu University)

免疫系は、病原細菌などの病原体を認識し排除することに特化したシステムであり、従来は専ら「外」からの侵入を監視するものと考えられてきた。しかし近年、自然免疫（先天性免疫）および獲得免疫（適応免疫）を担う多くの免疫センサーが「内」なる自己由来分子を認識することが明らかとなった。これにより、自己分子（タンパク質、核酸、脂質、糖鎖、代謝産物等）の量的・質的変動を感知することで恒常性を維持する役割を有することが判明した。また、自己分子は従来の宿主由来の分子に加え、共生細菌も自己の一部として認識されることがわかってきた。本シンポジウムでは、学術変革領域研究の概念である自己指向性免疫学を通して、自己・非自己になりうる細菌と宿主の関係にフォーカスして議論したい。

共催：学術変革領域研究・自己指向性免疫学
Co-sponsorship by Self-referential immune perception

S10-1

Phylogenetic and structural insights into the evolution of a mycobacterial sensor Mincle

○伊藤 泰紀^{1,2}, Carla Guenther^{1,2}, 石川 絵里^{1,2}, 矢吹 貴恵^{1,2}, 長江 雅倫^{1,2}, 山崎 晶^{1,2,3} (¹阪大・微研・分子免疫, ²阪大・IFReC・分子免疫, ³阪大・CiDER)

○Taiki Ito^{1,2}, Carla Guenther^{1,2}, Eri Ishikawa^{1,2}, Takae Yabuki^{1,2}, Masamichi Nagae^{1,2}, Sho Yamasaki^{1,2,3} (¹Dept. Mol. Immunol., RIMD, Osaka Univ., ²Lab. Mol. Immunol., IFReC, Osaka Univ., ³CiDER, Osaka Univ.)

Our bodies are constantly exposed to various pathogens, including bacteria. Innate immune receptors, such as the C-type lectin receptors (CLRs), sense pathogens and immediately induce immune responses. CLRs are known to recognize glycolipids derived from pathogens such as mycobacteria. Among the CLRs, Mincle is expressed on myeloid cells, known to recognize trehalose dimycolate (TDM), a mycobacterial glycolipid. Our group recently found that Mincle can also recognize β -glucosylceramide, a glycolipid derived from damaged-self. While Mincle is capable of recognizing both exogenous and endogenous molecules, its original ligand specificity remains unclear. Mincle is well conserved among mammals. However, conservation of Mincle in other vertebrates is understudied. Based on the amino acid sequence homology, we found that molecules homologous to mammalian Mincle are conserved among vertebrates, including fish. Structural analysis of fish Mincle suggested the high overall similarity with mammalian Mincle. However, fish Mincle seems incapable of accommodating disaccharide ligands such as TDM due to the narrow sugar binding pocket. Therefore, we speculated that Mincle was originally a receptor for a monosaccharide bearing molecules typically of endogenous origin. In this symposium, we would like to discuss the evolutionary transition of the ligand specificity of Mincle.

S10-2

Self and Non-Self Recognition Mediated by the Leukocyte Receptor Complex

○平安 恒幸（金沢大・先進）

○Kouyuki Hirayasu (Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ.)

The leukocyte receptor complex (LRC), located on human chromosome 19q13.4, encompasses numerous immune receptors, predominantly the genetically and functionally diverse multigene families of LILR and KIR. This remarkable diversity is thought to be driven by potent selective pressures, including infectious diseases, thereby highlighting the LRC as a crucial immune gene cluster. Inhibitory receptors within this complex are primarily known for their recognition of self-molecules such as HLA class I, which play a significant role in establishing self-tolerance. However, these inhibitory receptors are also susceptible to immune evasion strategies employed by pathogens. Conversely, the functional roles of activating receptors have remained largely unclear. We have previously identified bacterially cleaved immunoglobulin as a non-self-ligand for LILRA2, suggesting that activating receptors play a significant role in host defense. Furthermore, our recent findings suggest that activating receptors contribute not only to the direct recognition of bacteria but also to the detection of self-molecules, such as fibrinogen. Consequently, the immune receptors within the LRC exhibit a dual capability to recognize both self and non-self molecules. This symposium will introduce the self and non-self recognition through the LRC to discuss the concept of self-referential immune perception.

S10-3

Sterile induction of innate immunity in Drosophila larvae

○倉石 貴透（金沢大・薬）

○Takayuki Kuraishi (Fac. Pharm., Kanazawa Univ.)

Drosophila melanogaster has been widely utilized as a genetically tractable model organism to decipher the molecular mechanisms of innate immune responses. We serendipitously found that *Drosophila* larvae were sensitive to mechanical stimuli, leading to the activation of a sterile humoral response. Specifically, pinching by forceps to a degree that caused minor damage to larval tissues induced the expression of the antifungal peptide gene *Drosomycin*. Notably, this induction was only partially dependent on the Toll pathway. Based on these findings, *Drosophila* larvae may serve as a useful model system to analyze non-infectious inflammation that underlies various inflammatory diseases.

S10-4

Peyer's patch M-cell-dependent commensal uptake confers encephalitogenic phenotypes on $\gamma\delta$ T17 cells

○高橋 大輔, 込山 星河, 古平 陽太郎, 長谷 耕二 (慶應義塾大・薬)

○Daisuke Takahashi, Seiga Komiyama, Yotaro Kodaira, Koji Hase (Dept. Pharm. Sci., Fac. Pharm, Keio Univ.)

Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta$ T17 cells) exhibit a dual nature, acting as protectors in various tissues while also driving inflammation in autoimmune diseases like experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model for multiple sclerosis. This study reveals that the encephalitogenicity of $\gamma\delta$ T17 cells is conferred through M-cell-dependent uptake of commensal bacteria in Peyer's patches. Specifically, CXCR6⁺V γ 6⁺V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T17 cells are activated by commensal bacteria, including *Lactobacillus* spp., and *F. rodentium*. Under steady-state conditions, these cells migrate to the intestinal lamina propria. However, during EAE, they infiltrate the central nervous system via the CXCL16-CXCR6 axis, triggering a type 17 inflammatory response. Our findings highlight the role of Peyer's patch M cells as a critical link between commensal bacteria and the onset of CNS inflammation.

S10-5

細菌由来代謝産物の眼恒常性維持における役割の解明

○柴田 健輔^{1,2,3} (¹山口大・医・微生物, ²九州大・医・眼病態イメージング, ³大阪大・微研・分子免疫制御)

Elucidation of the mechanism regulated by bacterial metabolites in ocular homeostasis

○Kensuke Shibata^{1,2,3} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Yamaguchi Univ., ²Dept. Ocular Pathology and Imaging Science, Sch. Med., Kyushu Univ., ³Dept. Mol. Immunol., RIMD, Osaka Univ.)

高等脊椎動物は、進化の過程で病原性細菌は排除する免疫システムを発達させてきた。一方、腸管等では細菌と共生する戦略をとってきたが、その生体における役割は不明な点が多い。これまで我々は、高等脊椎動物が認識する細菌由来代謝産物に着目し、研究を行ってきた。Mucosal associated invariant T (MAIT)細胞は、高等脊椎動物に高度に保存されたT細胞サブセットで、多くの細菌が有するビタミンB2合成経路由来の代謝産物5-OP-RUを認識する。先に我々は、自己免疫性ぶどう膜炎マウスモデルを用いた解析で、5-OP-RUの認識を介したMAIT細胞の活性化が、視機能保護を誘導し眼恒常性維持に関わることを明らかにした。さらに、MAIT細胞が、どこで、どの細胞と相互作用し、視機能保護を誘導するのかを明らかにするため、空間トランスクリプトームおよびシングルセル解析を行った。その結果、MAIT細胞依存性に発現し、視神経の再生や組織修復に関わる可能性を有する遺伝子を同定している。そこで今回の発表では、細菌由来代謝産物に関わる眼恒常性維持における役割について、最新の知見を含めて議論させていただきたい。

S11

Beyond Borders: Challenges for International Students and Postdocs

コンビーナー：佐藤 豊孝 (北海道大学)
藤木 純平 (酪農学園大学)

Conveners: Toyotaka Sato (Hokkaido University)
Jumpei Fujiki (Rakuno Gakuen University)

本シンポジウムは、日本で働く留学生やポストドクに英語で先駆的な細菌学研究を紹介する場を提供します。多様な研究者グループを結集することで、アイデアの交換・共有を促し、細菌学の進歩と発展に貢献することを目的とします。発表者はポスター発表と同時にこのワークショップに応募することができます。応募者多数の場合は留学生を優先させていただきます。上位数名の発表者には、ASM Young Ambassador of Science および ASM Country Ambassador of Science からベストプレゼンテーション賞が授与されます。

後援：米国微生物学会
Supported by American Society for Microbiology (ASM)

S11-1

Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* in Thai canal water from 2016 to 2020

○Jirachaya Toyting^{1,2}, 佐藤 豊孝^{2,3}, Neunghatai Supha⁴, Yuwanda Thongpanich⁴, Motohiro Horiuchi^{2,3}, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima¹, Fuangfa Utrachakij⁴ (¹北海道大・人獣共通感染症国際共同研究所・バイオリソース部門, ²北海道大・院獣医学・衛生学分野・獣医衛生学教室, ³北海道大・One Health リサーチセンター, ⁴Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health, Mahidol Univ., ⁵北海道大・ワクチン研究開発拠点・研究支援部門)

○Jirachaya Toyting^{1,2}, Toyotaka Sato^{2,3}, Neunghatai Supha⁴, Yuwanda Thongpanich⁴, Motohiro Horiuchi^{2,3}, Jeewan Thapa¹, Chie Nakajima¹, Yasuhiko Suzuki^{1,5}, Fuangfa Utrachakij⁴ (¹Div. Biores., Hokkaido Univ. Int. Inst. Zoonosi. Contr., ²Lab. Vet. Hyg., Fac. Vet. Med., Hokkaido Univ., ³One Health Res. Cent. Hokkaido Univ., ⁴Dept. Microbiol., Fac. Publ. Health, Mahidol Univ., ⁵Div. Res. Sup., Int. Vac. Res. Dev., Hokkaido Univ.)

Antimicrobial-resistant *Salmonella* poses a major public health concern. Canals in Bangkok, Thailand, are vital as daily water and agricultural sources. In this study, we used whole genome sequencing to analyze 351 *Salmonella* genomes isolated between 2016 and 2020 to understand the characteristics and antimicrobial resistance properties of *Salmonella* found in Bangkok canals. *S. Agona* was the dominant serotype, while *S. Typhimurium* and its monophasic variant were occasionally found. Seven new sequence types (STs) were identified, including STs11346, 11347, 11348, 11349, 11350, 11351, and 11352. The three most common resistance genes were *tet(A)*, *bla_{TEM-1B}*, and *qnrS1*. *tet(X4)* was first detected in the *Salmonella* population in Thailand, and *mcr-3.1* was also found. In total, 39.0% of the strains were potentially multidrug-resistant. The strains contained dual amino acid substitutions in GyrA and ParC, and a strain with GyrA substitutions and *qnrS1* displayed the highest resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin. Most of ceftazidime, ceftriaxone, and cefotaxime-resistant strains carried *bla_{CTX-M-55}*. Phylogenetic analysis of *Salmonella* STs34 and 213 showed the possible circulation between canal water and human strains intra and internationally. These findings support the inclusion of environmental sampling in One Health AMR surveillance programs.

S11-2

SAA1 from host facilitates *S. pneumoniae* adaption to acidic stress induced by anaerobic metabolism

○Weichen Gong¹, 大野 誠之¹, 住友 倫子², 小林 桃子¹, 広瀬 雄二郎¹, 川端 重忠¹ (¹東北大院・農・動物食品機能, ²徳島大・菌・微生物)

○Weichen Gong¹, Masayuki Ono¹, Tomoko Sumitomo², Momoko Kobayashi¹, Yuijiro Hirose¹, Shigetada Kawabata¹ (¹Dept. Animal Food Function, Grad. Sch. Agricultural Science, Tohoku Univ., ²Dept. Oral Microbiol., Sch. Bio. Sci., Tokushima Univ.)

Streptococcus pneumoniae is the most common pathogen responsible for community-acquired pneumonia, bacteremia, and sepsis. *S. pneumoniae* anaerobically produces formic acid, which poses a particular challenge to itself. In this study, We found that *S. pneumoniae* has evolved a unique strategy to cope with the formic acid challenge, which is the uptake of host-derived serum amyloid A1 (SAA1). It is widely known that SAA1 is secreted in the acute-phase infection, but its role during pneumococcal infections remains unclear. In our study, we found that SAA1 exhibits a decreased level in BALF following nasal *S. pneumoniae* infections. When mixing serum and *S. pneumoniae*, SAA1 concentration decreased in serum, which was independent of protease activity. By using AF488-conjugated recombinant SAA1, we observed that *S. pneumoniae* uptakes SAA1. In addition, we proved that the uptake of SAA1 appeared to improve the resistance of *S. pneumoniae* against formic acid, a key metabolite of its anaerobic metabolism. By utilizing SAA1, *S. pneumoniae* seems to gain an advantage in acidic environments, enhancing its fitness during infection and evading metabolic stress. This is the first study to reveal the relationship between SAA1 and a gram-positive bacterium. We demonstrate that *S. pneumoniae* exploits host acute-phase proteins to enhance its survival in formic acid environments.

S11-3

Pathogenic and Antibiotic Resistance Genes in EPEC E. coli from Chicken Meat in Vietnam and Japan

○Yen Le¹, 水野 卓也², 田中 香お里¹, 山本 容正¹ (¹岐阜大院・連合創薬, ²岐阜県・保健環境研・保健科学)

○Yen Le¹, Takuya Mizuno², Kaori Tanaka¹, Yoshimasa Yamamoto¹ (¹UGS-DDMIS, Gifu Univ., ²Dept. Public Health Sciences, Gifu PHEI)

The emergence of pathogenic and antimicrobial-resistant *E. coli* in food poses a significant public health concern. This study compared the prevalence of virulence and antibiotic resistance genes in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from chicken meat in Vietnam and Japan. A total of 113 chicken meats were collected from both countries and screened for key virulence genes (*eaeA*, *elt*, *aggR*, *ipaH*, *stx1/2*) by real-time PCR. The study revealed that virulence gene profiling identified *eaeA* as the predominant marker with higher prevalence in Vietnam (79.6%) than in Japan (46.7%). Antimicrobial susceptibility of EPEC isolates highlighted notable resistance patterns in Vietnamese isolates. Conversely, Japanese isolates exhibited lower resistance profiles. Plasmid analysis identified IncHI2 was dominant among isolates carried ESBL genes of Vietnamese isolates than Japan, underscores the potential risk these strains pose in spreading antimicrobial resistance. Virulence gene analysis identified conserved *eaeA* gene alongside other effector key genes associated with the LEE. In addition, MLST showed that isolates belonged primarily to ST752 and ST40 for Vietnamese and Japanese isolates, respectively, suggesting genetic clustering by geographic origin. These findings highlight regional differences in the genomic structure and resistance profiles between EPEC isolates from Vietnam and Japan.

S11-4

Development of an Antibacterial Phage Capsid for selective removal of target bacteria from the gut

○Mahmoud Arbaah, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, Thuy Nguyen, Md Razib Hossain, 宮永 一彦, XinEe Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌)

○Mahmoud Arbaah, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Thuy Nguyen, Md Razib Hossain, Kazuhiko Miyanaga, XinEe Tan, Teppei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The gut microbiota plays a pivotal role in human health, contributing to the onset of various diseases. *Bacteroides fragilis*, a prominent member of the gut bacteria, is divided into two subgroups based on the production of BFT toxin: Enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) and Nontoxigenic *B. fragilis* (NTBF). The pathogenicity of ETBF is attributed to the BFT toxin, which has been implicated in the development of inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. Currently, there is no efficient method to selectively target harmful bacteria in the gut without affecting beneficial ones. Our laboratory has developed a system that utilizes the CRISPR-Cas13a system loaded into phage capsid to selectively kill target bacteria. This study aims to establish a system for eliminating ETBF from the gut. We collected 314 strains of *B. fragilis*, of which 42 were confirmed to be ETBF. Subsequently, we isolated 10 *B. fragilis* phages by inducing prophages from 119 *B. fragilis* strains. The host infection ranges of these phages were 5-17% when tested against 42 ETBF strains. These phages were further characterized through whole-genome sequencing. A phagemid was generated by cloning phage-22 packaging region into a plasmid, and its packaging into a phage capsid was confirmed. Finally, we constructed the AB capsid by integrating Cas13a into the phagemid and tested its killing activity against ETBF strains.

S11-5

Preparation of a Phage Cocktail against Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* Complex Strains

○Matthew Imanaka^{1,2}, 常田 聡², 氣賀 恒太郎^{1,3} (¹国立感染研・治ワク, ²早大・先進理工学・生命医科, ³自治医科大・医学・細菌)

○Matthew Imanaka^{1,2}, Satoshi Tsuneda², Kotaro Kiga^{1,3} (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Dept. of Life Sci and Med. Biosci., ³Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

As the spread of antimicrobial resistance (AMR) is a threat that traditional antimicrobials struggle to address, there has been a growing interest in phage therapy. Phage therapy utilizes bacteriophages (phages) to selectively infect and kill the pathogenic bacteria. This study investigated the efficacy of a phage cocktail targeting carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex (ECC) species, a World Health Organization critical priority pathogen. ECC species commonly cause hospital-acquired pneumonia, sepsis, and urinary tract infection outbreaks in intensive care units and neonatal units. Despite the global prevalence, treatment options are limited due to the intrinsic resistances and the easily transferable resistance genes. The development of a phage cocktail capable of overcoming the genetic diversity and resistance mechanisms within ECC is essential to addressing the global threat of this pathogen. We set out to create such a cocktail against carbapenem-resistant ECC clinical samples. We initially isolated three phages that provided 70% coverage of the collection. To improve the initial selection, additional phages were isolated for resistant sequence types (STs). Furthermore, phage training was employed to improve the performance of the phages. Currently, we are evaluating the first-generation cocktail in vitro and will evaluate the in vivo performance in the future.

S11-6

TBC1D9 regulates IL-6 production via ARID5A-mediated mRNA stabilization in Innate Immune Responses

○胡 馨, 野澤 孝志, 野澤 敦子, 村瀬 一典, 中川 一路 (京大院・医・微生物)

○Xin Hu, Takashi Nozawa, Atsuko Nozawa, Kazunori Murase, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. of Med., Kyoto Univ.)

Dysregulated cytokine production, particularly of IL-6, contributes to the pathogenesis of bacterial infection, inflammatory, and autoimmune diseases. IL-6 plays a pivotal role in the innate immune response, and its aberrant expression is often linked to chronic inflammation. Here, we investigate TBC1D9, a TBC domain family member with known regulatory functions in membrane trafficking, for its potential influence on cytokines production. Knockout of TBC1D9 reduced activation of IL-6 but not IFN- β , IL-1, and IL-18 upon DNA or bacterial stimulation, suggesting a role in modulating IL-6 signaling. In addition, TBC1D9 was suggested to be required for the expression of ARID5A, an RNA-binding protein that stabilizes IL-6 mRNA. These findings uncover a potential TBC1D9-ARID5A regulatory mechanism that positions TBC1D9 as a novel mediator of IL-6 levels, offering insights into its role in inflammation and innate immunity.

S11-8

Distinct BafA Secretion in *Bartonella henselae* Strains: Implication for BafA Secretion Mechanism

○Xingyan Ma, 塚本 健太郎 (阪大微研・分子細菌学・人獣共通細菌感染症研究グループ)

○Xingyan Ma, Kentaro Tsukamoto (Dept. Bact. Zoon., RIMD, Osaka Univ.)

Bartonella henselae, a Gram-negative bacterium, infects humans via cat scratches or bites, causing cat scratch disease (CSD). CSD symptoms can range from fever and lymphadenopathy to severe complications like endocarditis. As a facultative intracellular organism, *B. henselae* evades immune responses and manipulates host cells, especially vascular endothelial cells, promoting cell proliferation and angiogenesis. Previously, we identified the autotransporter BafA, which enhances endothelial cell proliferation and angiogenesis. However, the regulation and secretion mechanisms of BafA remain unclear. Here, we tried to reveal the regulation and secretion of BafA by comparing two groups of *B. henselae* isolates with different abilities in promoting cell proliferation and BafA secretion. Group A isolates secreted BafA and enhanced cell proliferation, whereas Group B did not. Differences in BafA expression levels between the two groups suggests the regulation of BafA by unknown factors. The cleavage of passenger domain of BafA from its full-length form was observed in Group A, but not in Group B, indicating that BafA cleavage is essential for its secretion. Amino acid sequence analysis identified a cleavage site for protease X. Subsequent experiments validated the cleavage of BafA by protease X. We are currently investigating the factors involved in the secretion and regulation of BafA.

S11-7

Regulatory role of a PAI-encoded c-di-GMP phosphodiesterase in *Vibrio parahaemolyticus*

○Andre Pratama¹, 石井 英治¹, 児玉 年央², 飯田 哲也¹, 松田 重輝¹ (阪大・微研・細菌感染, ²長崎大・熱研・細菌学)

○Andre Pratama¹, Eiji Ishii¹, Toshio Kodama², Tetsuya Iida¹, Shigeaki Matsuda¹ (¹Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ., ²Dept. Bacteriol., Nekken, Nagasaki Univ.)

A seafood-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* utilizes a syringe-like apparatus called type 3 secretion system 2 (T3SS2) to deliver toxins into human cells, causing gastroenteritis. The T3SS2 gene cluster is encoded on an ~80 kb pathogenicity island, Vp-PAI. Besides the T3SS2 gene cluster, this genomic island also encodes exotoxin, CRISPR-Tn7, and hypothetical proteins whose functions deserve further exploration. In this study, we found that the activation of Vp-PAI in response to the host signal, bile acids, modulates the biofilm formation beyond T3SS2 gene expression, which is mediated by an EVL domain phosphodiesterase VcpD encoded on Vp-PAI. The enzyme specifically linearizes the nucleotide-based second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) to 5'-phosphoguanylyl-(3',5')-guanosine (pGpG). We also demonstrated that c-di-GMP levels inside the bacterial cells were lower during Vp-PAI activation and the deletion of the enzyme gene restored its levels, indicating that the modulation of biofilm formation and low c-di-GMP levels are linked to the enzyme. Thus, our study implicates the role of VcpD in mediating the lifestyle transition in the host and thereby sheds light on the regulatory role of Vp-PAI beyond T3SS genes, providing new insight into the complex regulatory network in this pathogenic bacterium for virulence.

S11-9

A mouse model for human typhoid fever

○T Hoan Pham¹, Kohei Yamazaki^{2,3}, Andreas J. Baumler³, Toshio Kodama¹, Hirotaka Hiyoshi^{1,3} (¹Dept. Bacteriol., Ins. Trop. Med., Nagasaki Univ., ²Labo. Vete. Publ. Heal., Sch. Vete Med., Kitasato Univ., ³Dept. Med. Microbiol. Immunol., Sch. Med., California at Davis Univ., USA)

Typhoid fever, caused by *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi), a strictly human-adapted pathogen, remains a global health burden, with research hindered by the lack of suitable animal models. Here, we developed a mouse infection model using S. Paratyphi C, another typhoidal serovar expressing the Vi capsular polysaccharide (Vi-antigen), which is 99.99% structurally identical to that of S. Typhi. To imitate the wild-type S. Typhi outer membrane, the *fepE* gene was deleted in S. Paratyphi C. Mice infected with this mutant exhibited prolonged incubation periods similar to human typhoid fever and systemic infection with high bacterial loads in the spleen and liver up to 14 days post-infection (p.i.). Splenomegaly, which has been observed in some patients with typhoid fever, was also noted. Furthermore, a *viaB* locus-knockout (*fepE tviB-vexE*) strain showed significantly reduced bacterial loads, confirming the critical role of the Vi-antigen in immune evasion, particularly in early systemic dissemination (by 2 days p.i.). The model also elicited robust IgM responses with elevated titers 7 days post-purified Vi-antigen vaccination, underscoring its value in studying immunity. Overall, this mouse model provides a powerful tool for S. Typhi pathogenesis and vaccine research.

S11-10

Elements of a minimal bacteriophage T7 transcription terminator T ϕ

○Huong Minh Nguyen^{1,2}, Sooncheol Lee¹, Changwon Kang¹ (¹Dept. Biological Sciences, KAIST, ²自治医科大・細菌)

○Huong Minh Nguyen^{1,2}, Sooncheol Lee¹, Changwon Kang¹ (¹Dept. Biological Sciences, KAIST, ²Div. Bacteriology, Jichi Med. Univ.)

The bacteriophage T7 intrinsic (factor-independent) transcription terminator T ϕ for T7 RNA polymerase (RNAP) encodes an RNA hairpin followed by a stretch of U residues. Both RNA secondary structure and primary sequence have been demonstrated to determine its termination efficiency, but the mechanisms through which the RNA hairpin interacts with RNAP and causes transcription termination are yet to be revealed. In this study, we divided the hairpin stem region into several parts according to the G residue positions along the stem to construct different truncated variants of T ϕ terminator with a hairpin stem varying in length and sequence, and measured their *in vitro* effects on transcription termination efficiency. We found that changes in the hairpin stem length hardly affect termination efficiency. In contrast, the stem sequence variations strongly influence termination efficiency, with a bottom part of the stem essential for efficient termination. Our findings suggest that the interaction between RNA hairpin and RNAP in intrinsic termination involves sequence-specific interactions, not just thermodynamic stability of the hairpin, and further studies will elucidate these interactions in detail.

S11-12

Gliotoxin acts as a potent inhibitor against bacterial O-acetylserine sulfhydrylase CysK and CysM

○Azizur Rahman¹, Katsuhiko Ono¹, Touya Toyomoto¹, Kenjiro Hanaoka², Tomohiro Sawa¹ (¹Dept. Microbiology, Sch. Medical Sciences, Kumamoto Univ., ²Div. Analytical Chemistry for Drug Discovery, Fac. Pharmacy, Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences, Keio Univ.)

Cysteine is an essential amino acid for sustaining life and many pathogenic bacteria synthesize cysteine via a two-step enzymatic process using serine as the starting material. The first step is catalyzed by serine acetyltransferase (SAT), also known as CysE, and the second by O-acetylserine sulfhydrylase (OASS), referred to as CysK or CysM. In this study, we aimed to identify inhibitors of CysK and CysM. To identify functionally active inhibitors from a chemical library, we first established an enzyme-based high-throughput screening system. After analyzing 168640 compounds by using high-throughput screening system, a fungal metabolite gliotoxin was identified as a potent inhibitor against both CysK and CysM. Furthermore, gliotoxin significantly suppressed the growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, under cystine-deficient conditions. Gliotoxin possesses a unique disulfide structure classified as epipolythiodioxopiperazine. To date, no studies have reported OASS inhibition by compounds with this structural motif. The screening system developed in this study is expected to accelerate the discovery of functional CysK/CysM inhibitors, providing a foundation for novel antibacterial strategies, especially against multidrug resistance bacteria.

S11-11

Virulence, phylogroups, resistance, biofilm, and motility in environmental *Escherichia coli*

○Ida Munfarida, 渡邊 亮太, Jant Cres Caigoy, Xedzro Christian, 島本 敏, 島本 整 (広島大・院・統合生命科学)

○Ida Munfarida, Ryota Watanabe, Jant Cres Caigoy, Xedzro Christian, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto (Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Escherichia coli poses global health risks, impacting human, animal, and environmental health within a One Health framework. This study examines the relationships among virulence factors, phylogroups, resistance genes, biofilm formation, and motility in *E. coli* from sewage treatment water in Japan. Multiplex PCR detected ten virulence genes; Clermont and specific PCR identified phylogroups and resistance genes. Biofilm and motility were assessed using microtiter plate and soft agar assays. Among 355 isolates, 13.8% carried virulence genes, with *astA* (69.4%) most common, followed by *eaeA* (8.2%), *bfpA* (6.1%), and *aggR* (6.1%). Predominant phylogroups were B1 (32.7%), B2 (24.5%), and D (14.3%). Resistance genes were absent in 44.9%; *bla*_{TEM} and *tet* were most common (8.2% each). *aggR* associated strongly with AmpC, while other virulence-resistance links were non-significant. Biofilm formation varied: 53.1% weak, 32.7% non-producers, 10.2% moderate, and 4.1% strong, with significant differences among isolates carrying *aggR*, *astA*, *bfpA*, and *eaeA* ($p < 0.05$). Motility (81.6%) varied significantly with virulence genes but showed no link to biofilm or phylogroups. This study highlights the complex interplay of virulence, resistance, and phenotypic traits in *E. coli*.

WS1

熱帯地方の細菌感染症 ーグローバルヘルスへの挑戦ー

コンピーナー：中村 修一（東北大学）
許 駿（琉球大学）

Bacterial Infectious Diseases in the tropics: Challenges for Global Health

Conveners: Shuichi Nakamura (Tohoku University)
Jun Xu (University of the Ryukyus)

感染症の蔓延には、国や地域によって異なる文化、経済状況、インフラ、環境問題、教育水準などが複合的に関わり、被害規模は国・地域間格差の社会的指標と捉えることもできる。とりわけ熱帯の貧困地域では、WHO がリストする「顧みられない熱帯病」をはじめ、先進国では既に制圧、あるいは発生しても比較的小規模で抑止できる様々な感染症が未だ甚大な被害をもたらしている。本シンポジウムでは、一般社団法人・日本熱帯医学会の後援のもと、コレラ、腸炎ビブリオ感染症、レプトスピラ症など熱帯地方で多く発生する細菌感染症を取り上げ、研究の最前線で活躍する5名の研究者にご講演いただく。各演者が取り組んでいる病原性や生体防御の基礎研究や疫学的サーベイランスは、感染症に対する危機管理技術の開発基盤として重要である。熱帯地方における細菌感染症の現状と課題を露わにし、グローバルヘルスへの取り組みを一層強化する足掛かりとしたい。

後援：日本熱帯医学会
Supported by Japanese Society of Tropical Medicine

WS1-1

The role of the gut microbiota in susceptibility to *V. cholerae* infection and severity of disease

Denise Chac¹, Fahima Chowdhury², Ashraf I. Khan², Susan Markiewicz¹, Taufiqur Bhuiyan², Gwen Dumayas¹, Regina C. LaRocque³, Jason B. Harris³, Firdausi Qadri², Ana A Weil¹ (¹Univ. Washington Sch. Medicine, ²International Center for Diarrheal Diseases Research, Bangladesh, ³Massachusetts General Hospital Dept. Medicine)

Introduction: Recent *Vibrio cholerae* outbreaks have become larger and more deadly. Known host factors that impact susceptibility only partially explain why some people develop mild disease and others develop life-threatening dehydration. The role of the gut microbiome in likelihood of symptomatic infection and severity of disease is not known.

Methods: We used human cholera emesis rather than stool that reflect the upper intestinal environment at the site of active *V. cholerae* infection. Using metagenomic sequencing, we identified the cholera-specific gut microbiota and then isolated specific gut microbes. We then tested their impact on *V. cholerae* virulence using assays of microbe-pathogen interaction including qPCR, biofilm assays, and RNA sequencing.

Results: We found that cholera emesis originates in the small intestine and contains on average 10⁶ bacteria/mL. We found that *Bacteroides uniformis* culture supernatant reduced *V. cholerae* toxin co-regulated pilus (Tcp) expression, an important virulence factor, consistent with our prior findings in human studies in which *B. uniformis* was associated with a lower likelihood of cholera. *Blautia obeum* was associated with increased *V. cholerae* virulence in our human studies, and was found to increase Tcp expression by more than 10-fold (p=0.03 for each comparison, non-parametric t-test of means).

Conclusions: Increased understanding of small intestinal *V. cholerae* colonization dynamics that include the gut microbiota could reveal new targets for prevention or treatment of cholera using bacterial products or their metabolites.

WS1-2

The Role of Morphological Adaptability in *Vibrio cholerae*'s Motility and Pathogenicity

○許 駿¹, 阿部 敬吾², 児玉 年央³, Marzia Sultana⁴, Denise Chac⁵, Susan Markiewicz⁵, 松波 秀之⁶, 久場 恵梨香¹, 角田 志悠¹, Munirul Alam⁴, Ana Weil⁵, 中村 修一², 山城 哲¹ (¹琉球大・医・細菌, ²東北大・工・応用物理, ³長崎大・医・熱研, ⁴Infectious Diseases Division, ICDDR, B., Bangladesh, ⁵Dept. Med., Univ. Washington, US, ⁶OIST・生体分子電子顕微鏡解析ユニット)

○Jun Xu¹, Keigo Abe², Toshio Kodama³, Marzia Sultana⁴, Denise Chac⁵, Susan Markiewicz⁵, Hideyuki Matsunami⁶, Erika Kuba¹, Shiyu Tsunoda¹, Munirul Alam⁴, Ana Weil⁵, Shuichi Nakamura², Tetsu Yamashiro¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, ²Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ³NEKKEN, Grad. Sch. Med., Nagasaki Univ., ⁴Infectious Diseases Division, ICDDR, B., Bangladesh, ⁵Dept. Med., Univ. Washington, US, ⁶Mol. Cryo-EM Unit, OIST)

Bacterial filamentation is an adaptive phenomenon where bacteria elongate in response to environmental stresses, enhancing survival and pathogenicity. *Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera, exhibits this morphological change under specific conditions, such as within the human gastrointestinal tract. Cholera, a severe diarrheal disease, poses a major public health challenge in tropical regions, with millions of cases reported annually. This disease is characterized by rapid dehydration caused by cholera toxin and is primarily transmitted through contaminated water or food. Our study explores the filamentous transformation of *V. cholerae* and its implications for motility and pathogenicity. We show that filamentous cells, while slower than comma-shaped counterparts, exhibit superior motility in viscous environments, such as mucus layers, enabling better penetration and colonization of host tissues. Importantly, filamentous cells maintain their ability to produce cholera toxin, ensuring their pathogenic potential. These findings provide new insights into the adaptive strategies of *V. cholerae*, emphasizing the role of morphological plasticity in its survival and infection dynamics. This research highlights key aspects of cholera pathogenesis, offering a foundation for developing improved control measures.

WS1-3

Host adaptation and virulence mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus*

○児玉 年央, Sarunporn Tandhavanant (長崎大・熱研・細菌)

○Toshio Kodama, Sarunporn Tandhavanant (Dept. Bacteriol., Inst. Trop. Med., Nagasaki Univ.)

Gram-negative bacterial pathogens utilize specialized secretion systems to transport virulence proteins, such as exotoxins and effectors. Exotoxins are secreted via the type II secretion system (T2SS), while the type III secretion system (T3SS) directly injects effectors into host cells, altering their functions. These systems, crucial for pathogenicity, are tightly regulated to overcome host defenses and establish infection. This presentation focuses on *Vibrio parahaemolyticus*, a major cause of food poisoning and wound infections. The pathogen produces virulence factors, including thermostable direct hemolysin (TDH) and/or TDH-related hemolysin (TRH), and harbors two gene clusters for T3SSs (T3SS1 and T3SS2). Our recent analyses revealed a sophisticated mechanism by which *V. parahaemolyticus* senses the intestinal environment and detects host cell contact. This mechanism enables precise regulation of T3SS effectors and exotoxin expression, critical for its pathogenic process. In this presentation, we discuss how *V. parahaemolyticus* recognizes host cell contact and regulates virulence gene expression, offering new insights into its adaptive strategies and pathogenesis.

WS1-4

Leptospirosis

○小泉 信夫 (感染研・細菌一)

○Nobuo Koizumi (Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

Leptospirosis is one of the most prevalent zoonotic diseases, with one million cases and 58,900 deaths annually worldwide. However, more than 70% of cases occur in tropical regions and morbidity and mortality are highest in the poorest regions of the world. Leptospirosis is recognized as a major cause of acute undifferentiated fever in various parts of the world. The causative agents, *Leptospira* spp., colonize the proximal renal tubules and are excreted in the urine of maintenance host animals. Humans are infected with *Leptospira* spp. through abraded skin or mucous membrane primarily by exposure to water or soil contaminated with the urine of maintenance hosts. Occupational exposure occurring during rice farming and other agricultural activities is still significant in rural areas of developing countries. In urban areas of the tropics, outbreaks of leptospirosis occur during annual seasonal periods of heavy rainfall. This presentation will discuss the current epidemiological aspects of leptospirosis in Sri Lanka and the Philippines, as well as our latest findings on the motility and pathogenesis of *Leptospira* spp.

WS1-5

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus among Pediatric Acute Respiratory Cases in Vietnam

○吉田 レイミント¹, 充史 藤岡^{1,2}, ゲン ヒエンアン³, 樋泉 道子², 吉本 森永⁴, 小佐井 康介⁴, 柳原 克紀⁴, シャー モハマツモニ¹, ダング ツクアン³ (¹長崎大・熱帯医学研究所・小児感染症学分野, ²長崎大・医歯薬総合研究科, ³国立衛生疫学研究所, ⁴医療科学講座病態解析・診断学分野)

○Laymyint Yoshida¹, Fujioka Atsushi^{1,2}, Hien-Anh Nguyen³, Michiko Toizumi², Morinaga Yoshitomo⁴, Kosuke Kosai⁴, Katsunori Yanagihara⁴, Mohammad Monir Shah¹, Duc-Anh Dang³ (¹Dept. Ped Infect. Dis., Inst. Tropical Medicine, Nagasaki Univ., ²Grad. Sch. Biomedical Science, Nagasaki Univ., ³National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, ⁴Dept. Laboratory Medicine, Nagasaki Univ.)

Background: Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection treatment remains challenging due to its multi-drug resistant strains. We investigated the characteristics of S.aureus and MRSA detected among the Pediatric ARI cases in central Vietnam. **Methods:** The study was conducted at Khanh Hoa General Hospital, Nha Trang Vietnam. Hospitalized pediatric cases, presenting with cough, and/or difficulty breathing from February 2011 to April 2018 were enrolled. Clinical epidemiological data and nasopharyngeal swab samples were collected. MRSA rates, antimicrobial resistance profiles, and multi-locus sequencing typing (MLST) were analyzed. **Results:** A total of 7101 cases were enrolled and S.aureus was detected in 317 (4.5%) with 265 (83.6%) as MRSA. The highest MRSA rate was detected in the 1-5months olds (11%), followed by the 59 to 71 months group (10.5%). S.aureus was detected more commonly in those who did not use antibiotics before hospitalization (6.1% vs 3.8%). In this study, 14 STs and 3 CCs were identified. MPIMC, CFX, and EM MIC showed resistance to all STs. ABPC, TAZ/PIPC MIC50 showed resistance in ST45 and ST188. CLDM MIC50 showed resistant in ST188 and ST59. **Conclusion:** A high rate of MRSA was detected among the S.aureus isolated from pediatric ARI cases in Nha Trang. Monitoring and control of MRSA among pediatric hospitalized cases should be considered.

WS4

事例に学ぶ細菌学

コンピーナー：山崎 伸二 (大阪公立大学)
中村 寛海 (大阪健康安全基盤研究所)

Bacteriology learnt from each case

Conveners: Shinji Yamasaki (Osaka Metropolitan University)
Hiromi Nakamura (Osaka Institute of Public Health)

食中毒や感染症の発生時には、患者のみならず食品や環境材料から分離された細菌を様々な方法で分類・型別することにより感染源や感染経路の推定が可能となり、事例の検証を行うことができる。本ワークショップでは、分離株の遺伝子型別によりビルの冷却塔が原因と判明したレジオネラ症事例、2023年に発生した馬刺しによる EHEC 食中毒事例、2011～2020年に分離された食中毒起因カンビロバクター菌株の特徴、牛乳が原因と考えられた非定型病原大腸菌 OgGp9:H18 による大規模食中毒事例や新たに見つかった新型ブドウ球菌エンテロトキシンについて紹介する。実際の事例紹介により、聴講者とともに食中毒や感染症の疫学についての理解を深めるとともに、問題点を見出し、課題解決につながる共同研究に発展すれば幸いである。

WS4-1

大阪府内の一部地域で発生したレジオネラ症の集積事例について

○山口 貴弘¹, 高橋 佑介¹, 平井 佑治¹, 山本 香織¹, 高田 利香², 庄司 裕郁², 西田 伸子², 木下 優², 河合 高生¹, 永井 仁美³ (¹大安研・微生物, ²大阪府茨木保健所, ³大阪府健康医療部)

Clustered cases of Legionnaires' disease that occurred in a certain area of Osaka Prefecture

○Takahiro Yamaguchi¹, Yusuke Takahashi¹, Yuji Hirai¹, Kaori Yamamoto¹, Rika Takada², Yuka Shoji², Nobuko Nishida², Masaru Kinoshita², Takao Kawai¹, Hitomi Nagai³ (¹Div. Microbio., Osaka Inst. Pub. Health, ²Ibaraki Public Health Center, Osaka Pref., ³Dept. Public Health and Medical Affairs, Osaka)

大阪府内の一部地域(曝露源と推定された冷却塔を含む半径約1.5 km以内)にて、約1カ月間に例年を上回る、20名のレジオネラ症患者の発生があった。当該地域を担当する保健所が曝露源探索のため積極的疫学調査を実施するとともに、地区踏査およびエアロゾルの発生が考えられる施設について調査を行なった。本事例では、一部地域から複数の患者が報告され、*Legionella pneumophila* serogroup (SG) 1 が分離された。積極的疫学調査の結果、患者に共通の利用施設はなかったが、外出習慣のある患者が多数いることが判明した。このため感染リスクの高い屋外曝露源を優先的に施設調査したところ、患者の行動範囲周辺の複数施設の冷却塔水から *L. pneumophila* SG1 が分離され、曝露源探索を目的にこれら菌株間での遺伝子型の比較を行うことになった。7施設の冷却塔水10検体から計243株の *L. pneumophila* SG1 が分離され、患者株と同じ遺伝子型の菌株を早期に探索する必要があった。そのため迅速性を重視し、Sequence-Based Typing (SBT) 法に用いられる遺伝子の一つである *mompS* 領域の塩基配列多型に着目したスクリーニングを行い、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施する菌株を1検体につき1~3株まで選抜した。その結果、各施設の代表株として冷却塔水由来株28株に絞ることができ、臨床分離株8株と合わせて PFGE を行った。PFGEの泳動パターンに基づいたクラスター解析の結果から、曝露源である冷却塔を推定することができた。本事例では、血清群が一致している菌株のスクリーニングに *mompS* 領域の塩基配列多型を利用することで、迅速な曝露源の推定に寄与することができた。

WS4-2

2023 年の馬刺しによる腸管出血性大腸菌食中毒の後方視的追究

○瀬戸 順次（山形衛研・微生物）

A retrospective investigation of a food poisoning outbreak of EHEC by raw horse meat, 2023

○Junji Seto (Dept. Microbiol., Yamagata Pref. Inst. Public Health)

2023 年 8 月、山形県内の馬肉を専門とする食肉処理施設が販売した馬刺しを原因とする患者数 74 人（菌分離陽性 42 人）の腸管出血性大腸菌 O157 食中毒が発生した。本食中毒事例の原因追究のため、山形県内 O157 の反復配列多型解析（MLVA）結果を国立感染症研究所に報告したところ、2013～2023 年の全国の腸管出血性大腸菌のうち 163 株（2022 年 87 株、2023 年 76 株）の O157 が同一 MLVA complex（17 領域の MLVA パターン一致もしくは 1 領域違い）となった。これら 163 株のうち全ゲノム配列解析を実施できた 145 株は全て近縁株（一塩基多型 10 か所以内）であった。さらに、これまでの国内 O157 ゲノムデータとの比較により、MLVA complex に含まれなかった 2022 年の 2 株が新たに近縁株と判明した。MLVA と全ゲノム配列解析により見出された 165 株（2022 年 89 株、2023 年 76 株）の患者を全国調査した結果、55 人（2022 年 6 人、2023 年 49 人）が当該施設の馬刺しを喫食しており、2022 年の馬刺し喫食者の割合が有意に少ないことが明らかとなった（ $P < 0.0001$ ）。また、これら 55 人から分離された O157 について、外群株から続くゲノムクラスタを起点とした一塩基多型は最大 2 か所（中央値 0）であり、2022 年 3 株と 2023 年 43 株は、分離年が異なっていたにもかかわらず同一ゲノム配列であった。

本シンポジウムでは、以上の後方視的追究結果と施設の衛生状況等を交えながら、本食中毒事例発生 の 経緯を考察する。併せて、腸管出血性大腸菌の集団感染事例において分子疫学解析ができること・できないことについても考える場としたい。

WS4-3

複数の集団下痢症の起因菌となった新規カテゴリーと考えられる下痢原性大腸菌

○窪村 亜希子（国立健康危機管理研究機構）

Multiple clusters of diarrheas due to a possible new category of diarrheagenic *E. coli*

○Akiko Kubomura (Japan Institute for Health Security)

2021 年に富山県で発生した大規模食中毒（患者数 1896 名）の原因微生物である大腸菌 OUT(OgGp9):H18 は、既存のカテゴリーに分類されない下痢原性大腸菌であった。下痢原性大腸菌は少なくとも 5 つのカテゴリー（enterohemorrhagic *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*）が存在し、それぞれが保有する異なる病原因子（毒素因子または細胞付着因子等）は下痢原性大腸菌の分離検出マーカーとしても用いられる。既存のカテゴリーに分類されない大腸菌による集団下痢症事例は国内で繰り返し発生しているが、これら下痢原性大腸菌には分離検出マーカーが存在しないことから、事例検体から本菌を分離し、起因菌として特定することは通常困難となる。そのため新たな下痢原性大腸菌や共通する病原因子の特定は重要な課題である。我々のこれまでの研究から、富山県食中毒事例の起因菌がヒト大腸由来細胞である Caco-2 細胞へ付着性を示すこと、およびその細胞付着性は CFA/III が担っていることを明らかにした。細胞毒性試験では細胞の形態的变化が検出され、未特定の細胞毒素の保有が示唆された。また、所内に保管される過去の集団下痢症事例由来で既存のカテゴリーに分類されない大腸菌株を対象に CFA/III の遺伝子（*cof*）保有状況調査を行った結果、複数事例の大腸菌株から CFA/III が検出され、これら事例株も共通して Caco-2 細胞に付着性を示した。本発表では、過去に発生した複数の集団下痢症事例の起因菌が共通して Caco-2 細胞に付着性を示す大腸菌であったことを報告し、さらに本菌を新規の下痢原性大腸菌カテゴリーとして提案する。

WS4-4

ブドウ球菌エンテロトキシン研究の進展と事例に基づく食中毒リスクの解析

○小野 久弥¹、鈴木 康規²、胡 東良¹（¹北里大・獣医・人獣共通、²北里大・獣医・獣医衛生）

Recent Insights into Staphylococcal Enterotoxins and Their Impact on Food Poisoning

○Hisaya Ono¹, Yasunori Suzuki², Dong-Liang Hu¹（¹Lab. Zoonoses, Kitasato Univ. Sch. Vet. Med., ²Lab. Animal Hygiene, Kitasato Univ. Sch. Vet. Med.）

ブドウ球菌食中毒（Staphylococcal food poisoning；SFP）は、主に黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*（*S. aureus*）が産生する毒素ブドウ球菌エンテロトキシン（Staphylococcal enterotoxin；SE）の摂取によって引き起こされる食品内毒素型食中毒の代表例である。食品の製造・販売段階での衛生管理の向上により、発生件数は減少傾向にあるものの、不十分な衛生管理下で製造調理された食品が原因となる事例が依然として発生している。特に昨年、100 名以上の患者を出した事例が相次ぎ、その社会的影響が甚大であることが改めて示された。SFP は現在においても公衆衛生上重要な食中毒であり、継続的な注意が必要である。SFP の原因となる SE は「古典的 SE」として知られる 5 種類（SEA～SEE 型）が代表的であるが、1990 年代以降、遺伝子解析技術の進歩により、新型 SE および SE-like toxin（SEL）が次々と報告されている。2024 年時点で、少なくとも 29 種類の SE が報告されており、その多様性が注目されている。現在、各 SE の嘔吐活性の評価は進んでいるが、菌株の毒素産生性やヒトにおける発症に必要な毒素量については未解明な課題が多い。また、新型 SE の検出法は限られており、食中毒統計では古典的 SE の検出状況が中心となっている。このため、我々は新型 SE の生物活性を評価し、新しい検出法の構築に取り組んできた。本発表では、新型 SE の生物活性評価や実際の事例における SE 産生量に着目し、新型 SE を含めた SE 全体の食中毒リスクについて議論したい。

WS4-5

食中毒起因カンピロバクターの遺伝子型別と分離株の特徴

○中村 寛海¹、野本 竜平²、白石 志帆¹、山本 香織¹、和田 崇之^{3,4}、若林 友騎¹、河原 隆二¹（¹大安研・細菌、²神戸市・健科研、³大阪公立大院・生・微生物、⁴大阪公大・国際感染症研究センター）

Genotyping and characterization of strains isolated from foodborne campylobacteriosis patients

○Hiromi Nakamura¹, Ryohei Nomoto², Shiho Shiraishi¹, Kaori Yamamoto¹, Takayuki Wada^{3,4}, Yuki Wakabayashi¹, Ryuji Kawahara¹（¹Bacteriol. Sec., OIPH, ²Kobe Inst. Heal., ³Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ⁴Osaka Intl. Res. Center Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.）

カンピロバクター食中毒は、依然としてわが国の細菌性食中毒において最も事件数が多く、本菌による食中毒は制御できていない。我々は、食中毒起因カンピロバクターの遺伝学的な特徴を調べることを目的として、2011～2020 年の 10 年間に食中毒原因究明調査目的で大安研に搬入された 200 事例由来 446 名の患者便から分離された 488 株を multiplex PCR binary typing（mP-BIT）により型別した。その結果、403 株の *C. jejuni* は 101 タイプ、85 株の *C. coli* は 15 タイプに型別された。*C. jejuni* で最も多かった J-000260（タイプ名は任意に付与）は 45 事例由来 93 株に見られ、2014 年以外の全ての年から検出された。mP-BIT で同一遺伝子型を示した主要なクラスターの中から菌株を選び、MiSeq で得られた全ゲノム配列データを用いて PubMLST で ST および CC を決定した。その結果、食中毒原因究明調査で分離された菌株の多くは CC22、CC21、CC52、CC443 の 4 つの CC に属することがわかった。J-000260 は供試した全ての菌株が ST22 であったが、ST22 は近年国内において食中毒起因カンピロバクターの主要な ST と報告されており、ギラン・バレー症候群との関連性も指摘されている。mP-BIT は MLST と相関がみられ、mP-BIT によるクラスター解析およびバイオフィーム形成試験の結果から、CC22 はその他の CC とは異なる系統であることが示唆された。現在、cgMLST でさらに詳細な解析を実施している。

WS7

健康増進に向けた口腔マイクロバイオーム研究の新展開

コンピーナー：竹下 徹（九州大学）
松尾 美樹（広島大学）

Recent advancements in oral microbiome research for promoting health

Conveners: Toru Takeshita (Kyushu University)
Miki Kawada-Matsuo (Hiroshima University)

消化管の入り口に位置する口腔には膨大な種類および数の細菌が生息し、複雑ながら安定な常在微生物叢を構築している。近年、この口腔常在微生物叢を構成する細菌がう蝕や歯周病といった歯科疾患のみならず全身の健康状態にも関わっていることが明らかになってきた。今後、口腔常在微生物叢の構造および動態の把握、そして制御は、我々が健康増進を図っていくうえでより重要な意味を持つてくることが予想される。本シンポジウムでは口腔常在細菌に着目した研究に携わってきた各演者から最新の研究成果についてご紹介しながら、口腔常在微生物叢というシステムの理解に向けて議論する。本ワークショップが微生物学的知見に基づくこれまでなかった保健アプローチの確立に繋がればと考えている。

WS7-1

口腔マイクロバイオームの微生物リザーバーとしての役割とその確立

○影山 伸哉（九大・院歯・口腔予防）

Role of oral microbiota as a microbial reservoir and its establishment

○Shinya Kageyama (Sect. Prevent. Dent. Public Health, Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ.)

口腔には膨大な数の微生物が存在し、それらが複雑な常在微生物叢（マイクロバイオーム）を構築している。口腔マイクロバイオームがう蝕や歯周病などの口腔疾患に関わることはこれまで数多くの研究によって示されてきたが、近年では、口腔マイクロバイオームは唾液や血液を介した全身への微生物の供給源、またそれに伴う遠隔部位の疾患の病態に関与する要因としても注目を集めている。本発表では、PacBio ロングリードシーケンシングを用いて口腔マイクロバイオームの細菌構成を一塩基レベルで高解像度に評価し、腸管や呼吸器への細菌伝播を検証した研究成果について紹介する。また、上記より健全な口腔マイクロバイオームの確立は口腔のみならず全身の健康維持に寄与すると考えられる。一方で、口腔マイクロバイオームがいつ、どのように獲得され安定化していくのかについては不明な点が多い。我々は現在、口腔マイクロバイオームの形成過程とその制御因子を調べるため乳幼児を対象とした縦断プロジェクトを実施しており、そこで得られた研究成果についても紹介したい。

WS7-2

口腔マイクロバイオームの栄養的な相互接続性から口腔と全身の健康を考える

○坂中 哲人（大阪大・歯・予防）

Implications of Metabolic Interconnectivity in Oral Microbiomes for Oral and Systemic Health

○Akito Sakanaka (Dept. Prevent. Dent., Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

口腔マイクロバイオームの高病原化が血管や消化管を介して全身に影響するエビデンスが蓄積され、口腔を健康な状態に維持する重要性がかつてないほど認識されている。口腔マイクロバイオームの高病原化を考える上で、微生物生態系の「多即一」という二面性、すなわち多の振る舞いが一つの機能として統合されるダイナミズムが、宿主とのバランスを規定し、疾患リスクを左右する重要な因子として注目されている。この二面性を支えるメカニズムとして、生態系内での多次の相互接続があり、これが空間的・時間的制約のもと、宿主の微小環境の影響を受けながら、マイクロバイオームの統合的な機能として出力されるという理解が進んでいる。我々はこれまで、栄養共生と呼ばれる異種微生物間での栄養的な相互接続性に注目して研究を行い、*Fusobacterium nucleatum* を中心とするアミノ酸を介した歯肉縁下生態系の共存戦略が、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の増加を招き、歯周病リスクを高める可能性を示した。また最新の研究では、宿主由来糖の唾液中濃度変動が歯肉縁上マイクロバイオームの構成や機能に影響を与え、う蝕リスクを高める可能性を示している。う蝕や歯周病といった口腔疾患はその特性上、いったん増悪すると制圧が困難になり、もはや以前の状態に回復させることはできないのが現状である。そのため口腔と全身の健康増進を見据えるとき、治療よりも予防に重点を置いて考えることが肝要であり、口腔微生物生態系の栄養的な相互接続性が病原性に及ぼす影響を深く理解し、それを基盤とした科学的管理手法の確立が求められる。

WS7-3

口腔マイクロバイオームによる硝酸塩代謝と口腔・全身健康との関連

○鷲尾 純平，江副 和子，安彦 友希，高橋 信博（東北大・歯・口腔生化）

Nitrate metabolism by the oral microbiome and its association with oral and systemic health

○Junpei Washio, Kazuko Ezoe, Yuki Abiko, Nobuhiro Takahashi (Div. Oral. Ecol. Biochem., Grad. Sch. Dent., Tohoku Univ.)

これまで口腔マイクロバイオーム（OMB）は、う蝕・歯周病・口臭などの病原因子となり得る各種代謝産物を産生することに加え、誤嚥性肺炎・心内膜炎などの全身疾患への関与も議論され、我々の健康維持にとって“負”の印象を持たれてきた。一方、OMB 内では、これまで注目されていなかった様々な代謝が行われていることが、近年明らかになりつつあり、中でも緑黄色野菜や唾液中に多く含まれる硝酸塩を亜硝酸塩へと還元する活性（硝酸還元活性）に注目が集まっている。亜硝酸塩は、抗菌効果や血管拡張効果をもたらすため、OMB はその代謝活動を通じ、細菌性口腔疾患や循環器疾患の抑制に寄与し、わたしたちの口腔・全身の健康維持に貢献するという、“正”の印象を併せ持つ可能性が明らかになってきた。これまでの当研究室における硝酸塩代謝関連研究では、実際の OMB による硝酸塩代謝活性は個人差が大きい一方で、特定の細菌種によってではなく一般的に常在細菌とされる多種の菌群によって行われていることが明らかとなった。さらに、食事や唾液による洗浄・緩衝作用などにより、常に変動しやすい様々な口腔環境因子が、硝酸塩代謝活性を大きく増減させることも明らかになったことから、OMB による硝酸塩還元能は、細菌叢構成だけではなく、口腔環境因子の影響なども含め、より多角的に評価し明らかにすることが重要であると考えられた。今後は、OMB による亜硝酸塩産生をより効率的に導く最適法の確立を目指すことにより、「OMB を活用した新・健康維持戦略」の立案・創生に貢献できればと考えている。本日は、このような観点から、OMB とわたしたちの健康との関わりについて、改めて考えてみたい。

WS7-4

マイクロバイオーーム内 **pathobionts** を標的としたバクテリオシン・ファージセラピー応用に向けた基盤研究

○松尾 美樹, 小松澤 均 (広島大・院 医系・細菌学教室)

Basic research for novel bacteriocin and phage therapy targeting pathobionts within the microbiome

○Miki Kawada-Matsuo, Hitoshi Komatsuzawa (Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ.)

口腔マイクロバイオーームは、種々の細菌による巨大なコミュニティを形成している。う蝕や歯周病の原因菌や口腔マイクロバイオーームの **dysbiosis** が、全身健康と深く関わる事が明らかになっている。また、口腔には特に医科領域で問題となる薬剤耐性菌が存在することも報告されている。薬剤耐性菌の問題は、今後の感染症治療に大きな懸念をもたらしており、新規感染症治療法の開発が期待されている。私たちの研究室では、口腔薬剤耐性菌実態調査と、口腔マイクロバイオーーム内の病原細菌 "**pathobiont**" のみを攻撃する新規抗菌薬として、バクテリオシンとバクテリオファージ (ファージ) に着目し研究を行っている。広島大学病院歯科外来を受診した患者 514 名の口腔・鼻腔から、第三世代セファロスポリン耐性グラム陰性菌 144 株が分離され、その多くは口腔からの分離であった。薬剤耐性菌と口腔細菌叢の全体的な細菌組成に有意差は認められなかったが、耐性菌が分離された口腔細菌叢では皮膚常在菌などの割合がやや高い傾向を示した。バクテリオシンは、ヒト由来分離株を主に用いて、これまでに **MRSA** に効果を認めるものを含め複数のバクテリオシンを同定した。これらのバクテリオシンは特定の菌種にのみ効果を認めることから、口腔細菌叢を乱さず病原細菌を排除することが期待できる。また、ファージも菌種特異性が非常に高いことから、近年、精力的に研究がなされている。私たちはう蝕細菌 *S. mutans* 特異的に効果を認めるファージ分離に成功している。本講演では、口腔薬剤耐性菌の状況およびバクテリオシン、ファージの可能性と応用に向けて、現時点での私たちの研究成果を報告させていただきたい。

WS7-5

Age-related dysbiosis of oral microbiota through B cell senescence

○河本 新平 (大阪大・微研・分子生物)

○Shimpei Kawamoto (Dept. Mol. Biol., RIMD, Osaka Univ.)

The mechanisms underlying age-related changes in the oral microbiota, which contribute to age-associated diseases, remain unclear. We have recently reported that cellular senescence in ileal germinal center (GC) B cells induced by the gut microbiota reduces IgA production and dysbiosis in the gut microbiota with aging. Consequently, a similar mechanism may occur in the oral cavity, potentially contributing to age-related changes in the oral microbiota. Examination of *p16-luc* mice, which allow for the visualization of senescent cells through bioluminescence imaging, revealed that, unlike in ileal GC B cells, cellular senescence is induced in GC B cells of cervical lymph nodes with aging irrespective of the presence of commensal microbiota. Furthermore, longitudinal studies using the same individual mice indicated age-related reduction of salivary IgA secretion and alterations in the oral microbiota. Moreover, a transfer experiment revealed that B cell senescence contributes to reduced IgA secretion and alteration in the oral microbiota. Additionally, we found that the age-related increase in endogenous mouse mammary tumor virus expression may contribute to the cellular senescence of GC B cells in cervical lymph nodes. These findings advance our understanding of the mechanism underlying age-associated changes in the oral microbiota.

WS8

細菌学若手コロッセウム —未来を拓く若手細菌学研究—

コンピーナー：水谷 雅希 (産業技術総合研究所)
奥野 未来 (久留米大学)
宮下 慎一郎 (東京農業大学)

Wakate colosseum for bacteriology —Young bacteriological research for the future—

Conveners: Masaki Mizutani (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
Miki Okuno (Kurume University)
Shin-Ichiro Miyashita (Tokyo University of Agriculture)

細菌学若手コロッセウムは、今後の細菌学の礎を築く若手研究者が切磋琢磨する場を提供することを目的とした学術集会です。若手コロッセウムでは、"微生物"をキーワードとして集まった専門分野の異なる若手研究者が、率直な疑問・意見をぶつけあいます。そこでは、参加者の研究者としての成長だけでなく、新しいネットワークの構築や日本の細菌学の裾野拡大も期待されます。「第18回細菌学若手コロッセウム」は日本細菌学会の助成を受け、2024年9月27-29日に大阪公立大学で開催され、薬剤耐性、感染戦略、運動、生理、遺伝子操作などの分野での最先端のトピックスについての発表や議論が行われました。本ワークショップでは、日本細菌学会会員の皆様へのフィードバックとして、第18回大会の内容の報告および第18回大会で特に優れた発表を行った若手研究者による研究発表を予定しています。

WS8-1

Salmonella's immune-evasion strategies promoted by host immunity and antibiotics

○木村 宇輝¹, 佐伯 華蓮¹, 松山 悦大¹, 高屋 明子², 常世田 好司¹ (¹鳥取大院・医科・免疫, ²千葉大院・薬・感染制御)

○Uki Kimura¹, Karen Saiki¹, Nobuhiro Matsuyama¹, Akiko Takaya², Koji Tokoyoda¹ (¹Div. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Tottori Univ., ²Dept. Infect. Cont. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

Antibiotic-resistant bacteria arise from persisters, which are survived from antibiotics without resistant genes. To develop new vaccines and medicines, it is urgently required to understand immune-evasion mechanisms of persisters. Using attenuated *Salmonella* Typhimurium infected mice, we here show that persisters employ host immune system for survival from antibiotics. After antibiotic-treatments, most persisters resided in the spleen. However, a large number of persisters were decreased by immunization with heat-killed *Salmonella*. Without such immunization, the titer of LPS-specific antibody was increased in antibiotic-treated mice. Flow cytometric and electron microscopic analysis show bacterial cellular-size and cell-surface LPS were increased in the presence of antibiotics in vitro. Moreover, LPS-specific antibodies and complements enhanced phagocytosis of persisters in vitro. Thus, antibiotic-persisters evade from extra-cellular antibodies and antibiotics by hiding in the phagocytes. In conclusion, antibiotic-treatments foster the opportunities for such immune-evasion by increasing LPS-specific antibodies of host immunity and inducing persisters reactive to the antibodies and complements.

WS8-2

Motility of *Haloplasma*, the primitive Mollicutes reconstituted in a minimal synthetic bacterium

○三村 萌音¹, 木山 花¹, 湯浅 永¹, 加藤 真悟², 和田 浩史³, 柿澤 茂行⁴, 宮田 知子^{5,6}, 牧野 文信^{5,6,7}, 難波 啓一^{5,6}, 宮田 真人^{1,8} (¹大阪公大・院理, ²理研・BRC・JCM, ³立命館大・理工, ⁴産総研・生物プロセス, ⁵大阪大・院生命機能, ⁶日本電子・YOKOGUSHI協働研究所, ⁷日本電子株式会社, ⁸大阪公大・複合先端)

○Mone Mimura¹, Hana Kiyama¹, Haruka Yuasa¹, Shingo Kato², Hirofumi Wada³, Shigeyuki Kakizawa⁴, Tomoko Miyata^{5,6}, Fumiaki Makino^{5,6,7}, Keiichi Namba^{5,6}, Makoto Miyata^{1,8} (¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²RIKEN BRC., JCM., ³Dept. Sci. and Eng., Ritsumeikan Univ., ⁴Bioproduction Res. Inst., AIST., ⁵Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ⁶JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance Lab. Osaka Univ., ⁷JEOL Ltd., ⁸OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

Class Mollicutes lacking cell wall is featured with unique motilities. *Haloplasma*, the primitive Mollicutes, is phylogenetically located closely to walled bacteria and has seven MreBs (HMreB1-7). MreB protein belonging to actin superfamily is generally not involved in motility, and functions as a scaffold for peptidoglycan synthesizing complex. To clarify the role of these HMreBs, we expressed the HMreBs in a minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B (syn3B), a spherical and non-motile bacterium. syn3B expressing all seven HMreBs showed *Haloplasma*-like coil morphology and motility. Moreover, a half speed of the motility was observed by expressing each of two HMreB pairs. Small ratio of syn3B cells expressing only HMreB4 showed incomplete movements. Amino acid substitution for ATPase reduction disabled the motility. Cryo-electron tomography of syn3B cells revealed sheet structures, composed of filaments likely to be made of HMreBs. We compared this motility with the MreB motility from another Mollicutes genus, *Spiroplasma* which is distantly related to *Haloplasma*. Computer modeling suggested that the direction of force generation occurring in the mechanisms is 90 degrees different. These results suggest that MreB-dependent motility occurred twice during the evolution of Mollicutes.

WS8-3

シングルセル観察が解き明かすアンモニア酸化細菌の細胞伸長量の制御因子

○池田 秀斗¹, 藤谷 拓嗣², 常田 聡¹ (¹早大・先進理工学・生命医科, ²中大・理工学・生命科学)

Single-cell Observation Reveals a Regulatory Factor of Cell Elongation in Ammonia-Oxidizing Bacteria

○Shuto Ikeda¹, Hirotsugu Fujitani², Satoshi Tsuneda¹ (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Dept. Biol. Sci., Sch. Sci. Eng., Chuo Univ.)

【背景】細菌の増殖は、1細胞ごとの伸長と分裂により達成される。しかしモデル細菌以外では、1細胞が伸長して分裂する様子を直接観察した例が少なく、その制御メカニズムには不明点が多い。*Nitrosomonas* sp. PY1 (PY1株)は、活性汚泥から分離されたアンモニア酸化細菌の一種で、温度・pH・基質濃度が適切な状態で植え継いでも、なぜか確率的に増殖挙動が変動する。我々は、PY1株が未知のメカニズムで1細胞が分裂するまでの伸長量を制御しているのではないかと考えた。そこで本研究では、PY1株の増殖を1細胞レベルで観察し、分裂までの伸長量を定量した。【方法】PY1株の比較対象として、NBRCより購入した *Nitrosomonas europaea* winogradsky 1892 (NE株)を使用した。細胞位置を固定して1細胞ごとの増殖を観察できるマイクロ流体デバイスを用いて観察を実施した。取得した画像から、1細胞ごとの分裂までの伸長量(分裂直後と再分裂直前の細胞面積の差分)を定量した。【結果】新鮮な培地を供給すると、PY1株でのみ、細胞の誕生時間と分裂までの伸長量に負の相関が見られた (PY1: $r = -0.68$, NE: $r = 0.0024$)。デバイスの構造上、細胞由来の上清成分が蓄積し、環境を変動させる可能性が考えられた。次に培養上清を10%含む培地を供給して観察を行った。その結果、PY1株における細胞の誕生時間と分裂までの伸長量の相関が弱まることがわかった (PY1: $r = -0.26$)。最後に培養上清を10%含む培地を用いてPY1株を回分培養すると、安定した増殖挙動を示すことが判明した。以上よりPY1株では、培養上清が分裂までの伸長量を制御し、集団レベルでの増殖挙動を安定化させることが示唆された。

WS8-4

大腸菌ファージの生理学的特徴に基づく分類法の改良と受容体特異性と関連性検証

○金子 知義^{1,2}, 大坂 利文³, 稲垣 穰⁴, 波部 賢人¹, 水谷 拓聖¹, 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファージセラピー研, ³東京女子医科大・医・微生物学免疫学, ⁴三重大・生物資源学・生理活性化学)

Improved physiological classification of *E. coli* phages correlates with receptor specificity

○Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Toshifumi Osaka³, Minoru Inagaki⁴, Kento Habe¹, Hiromasa Mizutani¹, Satoshi Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ., ³Dept. Microbiol. Immunol., Tokyo Wom. Med. Univ., ⁴Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

ファージ耐性菌の出現を抑制するには異なる受容体を標的とするファージを組み合わせたカクテルが有効であるが、標的受容体の同定は時間を要する上に宿主細菌のゲノムが詳細に明らかである必要があるため臨床応用には適さない。我々は以前、大腸菌ファージの感染域や溶菌持続時間などの生理学的特徴に基づく分類により標的受容体の同定を介さず効果的なカクテルを作製できる可能性を示したが、この分類法と実際の標的受容体との関連は未検証であった。また、この分類法は宿主域評価のための細菌パネルの選定が不十分であり、量的データ(感染域)と質的データ(その他生理学的特徴値)が混在するデータセットに対する距離計算法が最適化されておらず、またクラスター数決定に客観的基準がないという課題も残されていた。本研究では前回の報告の大腸菌ファージの各耐性株の全ゲノム解析とLPS構造解析から、これらのファージは標的受容体として膜タンパク質や鞭毛に加えてLPSのR-core領域の化学修飾の微細な差を認識していることを明らかにした。また、主に大腸菌からなる細菌約40株とファージ約60種の感染マトリックスから宿主域評価のために最適化された細菌株を選定し、質量混合データに適した距離計算法を導入した上でシルエット係数に基づく最適クラスター数決定アルゴリズムを開発した。この改良した生理学的特徴に基づく分類と、全ゲノム解析あるいは尾部繊維の系統に基づく分類はいずれも受容体に基づく分類と高い相関を示し、ファージの表現型や遺伝型が受容体特異性を反映することが示された。本研究により、大腸菌ファージの表現型や遺伝型に基づく分類法の有効性が実証された。

WS8-5

大腸菌性膀胱炎に対する戦略的なファージセラピーの検討

○遠山 茉奈¹, 大橋 春香¹, 中村 暢宏^{1,2}, 藤木 純平¹, 岩野 英知¹ (¹酪農学園大・獣医・生化学, ²国立感染症研究所・治療薬ワクチン開発研究センター)

Strategic phage therapy for E.coli cystitis

○Mana Tohyama¹, Haruka Ohashi¹, Tomohiro Nakamura^{1,2}, Jumpei Fujiki¹, Hidetomo Iwano¹ (¹Dept. Biochemistry, Sch. Veterinary, Rakuno Gakuen Univ., ²Reserach Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases)

抗生物質の不適切な使用により薬剤耐性菌が世界的に増加しており、効果的な対策を講じなければ2050年には年間死者数が1000万人を超えると予測され、深刻な状況となっている。また、このような薬剤耐性菌の現状は獣医療においても同様であり、抗生物質だけに頼らない新たな治療法が求められており、バクテリオファージを利用したファージ療法が注目されている。そこで本研究では、再発を繰り返す難治性大腸菌性膀胱炎の猫に対して有効なファージを分離し、ファージ耐性によるトレードオフ効果の検証を行った。犬、猫の膀胱炎から分離された大腸菌臨床株と3種類の下水を用い、3株のLPS認識ファージを分離した。分離されたファージを用い、大腸菌臨床分離株に対してEOP, killing assayを行い、ファージの感染・溶菌性を比較した。ファージ3株に対するそれぞれの耐性菌に対し、プレートリーダーを用いた濁度測定法による溶菌活性の比較、増殖の比較、抗生物質の感受性試験を行った。LPS認識ファージ3株のうち、LPSインナーコアを認識するΦH28-2は広い宿主域と高い溶菌活性、加えて脂溶性抗菌薬の感受性の上昇がみられた。ΦH28-2耐性菌はLPSの糖鎖を大部分失うことにより、外膜の疎水性が高まっていると考えられた。このことで脂溶性抗菌薬の効果が高くなり、抗生物質との相乗効果が期待されることが示唆された。これらの知見から、ファージの感染メカニズムや耐性メカニズムを解明することが、戦略的なファージセラピーの実用化において重要であり、将来的には難治性感染症に対する新たな治療法の確立に寄与すると考えられる。

WS8-6

二形性真菌 *Trichosporon asahii* の形態変換におけるオートファジー関連因子の調節機構の解明

○中山 メイ, 松本 靖彦, 米本 歩未, 宮本 和夢, 倉門 早苗, 杉田 隆 (明治薬大・微生物学)

Regulation by autophagy-related factors in morphology of the dimorphic fungus *Trichosporon asahii*

○Mei Nakayama, Yasuhiko Matsumoto, Ayumi Yonemoto, Kazumu Miyamoto, Sanae Kurakado, Takashi Sugita (Dept. Microbiol., Meiji Pharm. Univ.)

病原真菌 *Trichosporon asahii* は、好中球減少症の患者に重篤な深在性真菌症やカテーテル関連感染症を引き起こす。また、*T. asahii* は環境常在性真菌でもあり、酵母や菌糸・分節型分生子の形態を示すことで環境に適応する。しかし、*T. asahii* における形態変換および環境応答ストレスへの制御因子やメカニズムは解明されていない。

そこで我々は、栄養飢餓ストレスなどによって細胞内小器官やタンパク質を分解するオートファジーについて着目した。このオートファジー経路に関与する因子は、病原真菌である *Cryptococcus neoformans* において、その病原性や環境ストレス応答に重要である。本研究では、当研究室において世界で初めて開発された *T. asahii* の遺伝子欠損株作製技術を使用して、オートファジーの中期に関与する *atg8* および *atg12* 遺伝子欠損株を作製し、表現型を比較・検討した。*atg8* および *atg12* 遺伝子欠損株は、親株と比較して栄養条件に関わらず菌糸形の割合が多かった。しかし、*atg8* 遺伝子欠損株と *atg12* 遺伝子欠損株では、様々な環境ストレスに対する感受性のパターンが異なっていた。さらに、*atg8* 遺伝子欠損株はカイコに対する病原性が低下したが、*atg12* 遺伝子欠損株は病原性が低下しなかった。また、バイオフィーム形成の初期における接着段階において、*atg8* 遺伝子欠損株の接着能は低下したが *atg12* 遺伝子欠損株の接着能は低下しなかった。以上の結果から、*T. asahii* における形態変換に *atg8* および *atg12* 遺伝子が寄与することが示されたが、*T. asahii* の環境応答には *atg8* 遺伝子がより重要であることが示唆された。

WS8-7

Energy landscape Analysis: Stability and Predictability of Bacterial Community Composition

○島 玄太¹, 東樹 宏和¹, 鈴木 健大² (¹京大・生命・統合生命, ²理研・BRC・統合情報)

○Genta Shima¹, Hirokazu Toju¹, Kenta Suzuki² (¹Div. Integr. Life Sci., GSB, Kyoto Univ., ²Integr. Bioresour. Info. Div., BRC, RIKEN)

In most environments, bacteria exist as communities composed of numerous species, exhibiting complex interspecies interactions. Therefore, understanding the entire community is difficult through studying individual bacterial species alone. Many studies of environments such as animal guts or aquatic ecosystems classify realized community compositions into only a few types. This suggests the presence of stable compositions that are more easily realized within communities, highlighting the importance of compositional stability in understanding community properties. Energy landscape analysis enables the quantitative analysis of compositional stability. It uses the observation probability as stability indicators. In this study, we tracked the bacterial community dynamics in 5 eel aquaculture tanks over one year. We collected 1,376 observational data points along with environmental parameters such as pH, water temperature, and dissolved oxygen levels. Applying energy landscape analysis to these data revealed multiple stable compositions with varying stability levels within the bacterial communities in the tanks. Furthermore, the stability indicator significantly correlated with the degree of change (dissimilarity) in community composition over 1 day. This demonstrated that low stability (high instability) effectively predicts changes in community composition.

WS9

臨床検査学分野の細菌学研究

コンピーナー：岡本 成史 (大阪大学)
佐藤 拓一 (新潟大学)

Bacteriological Research in the Category of Clinical Laboratory Sciences

Conveners: Shigefumi Okamoto (Osaka University)
Takuichi Sato (Niigata University)

細菌感染症の診断や治療には、原因菌や薬剤耐性の有無を同定する必要があります。その業務を担うのが臨床検査技師である。臨床検査技師やその養成機関の教員は、日常業務の傍らで感染症の原因菌や薬剤耐性を正確かつ迅速に判定できる新たな検査法の開発から、さまざまな病原菌の動向を把握する疫学研究、環境微生物学や細菌の性状研究まで、多岐にわたる研究に取り組んでいる。本セッションでは、これまで日本細菌学会ではあまり取り上げられることのなかった臨床検査技師や臨床検査科学機関の教員など臨床検査学分野の研究者が行っているさまざまな細菌学研究に焦点を当てて紹介し、学会における学問分野や職種の多様性の拡大に貢献できればと考えている。

WS9-1

感染症診断における遺伝子解析技術の適用と実際

○大楠 清文 (東医科大・微生物学)

Molecular techniques and applications for the diagnosis of infectious diseases

○Kiyofumi Ohkusu (Dept. Microbiol, Tokyo Med. Univ.)

近年、遺伝子解析技術は、分離菌株の迅速な菌種の同定のみならず、検体から直接、微量な病原体の遺伝子を増幅・検出して、感染症の迅速診断と治療に利用されている。核酸増幅法の最大の利点は、ヒトに感染症を起こすほとんどすべての細菌、真菌、原虫、ウイルスを迅速かつ高感度に検出できることである。抗菌薬投与後あるいは投与中の細菌感染症、とりわけ髄膜炎や心内膜炎では、培養法で原因菌を検出できない場合においても病因診断が可能である。さらに、培養が困難な病原体、培養に長い時間を要する病原体の検出にも威力を発揮する。日常検査では鏡検で菌体が観察されたにもかかわらず、培養で発育しない場合がある。このようなケースでは検体から直接 broad-range PCR 法で細菌や真菌の DNA を増幅後、産物をシーケンス解析することで菌種名を決定できるだけでなく、その病原体を分離するための培地の追加、温度やガス環境などの培養条件の変更、培養期間を延長することが可能となり、生菌を得ることに繋がる。演者は、約 20 年間、全国の医療施設において日常検査法で診断できなかった 1,600 症例以上の臨床検体を精査してきた。これらの症例の多くは原因微生物を特定できており、診断と治療に少なからず寄与してきたとの実感がある。本発表では、現状の遺伝子検査の特徴を整理しながら、その活用のコツとノウハウを把握してもらうべく、解析した代表的な症例の病態や診断名と原因微生物、病因診断までのプロセスを紹介する。遺伝子解析技術を用いた感染症の診断においても、臨床医との緊密なコミュニケーションにより得られた情報を熟慮しながら解析することが必須であることを強調したい。

WS9-2

Genomic epidemiology of multidrug-resistant bacteria

○齋藤 良一 (科学大・医歯学・微生物感染免疫)

○Ryoichi Saito (Dept. Mol. Microbiol. Immunol., Science Tokyo)

Antimicrobial resistance (AMR) poses a significant global health threat, with ongoing efforts to address it. Despite some progress, AMR bacteria have emerged sporadically in clinical settings, complicating treatment regimens. Additionally, international travel, including medical tourism, has been reported to exacerbate the AMR issues in recent years. Consequently, even if AMR is limited to a particular region, robust diagnostic and surveillance systems based on updated epidemiological data containing AMR trends are essential to prevent its potential global dissemination. This presentation will introduce genomic epidemiological research on AMR bacteria aimed at preventing their global dissemination.

WS9-4

地方衛生研究所が担う地域感染症対策における分子疫学的アプローチ

○中西 典子, 野本 竜平 (神戸市健科研・感染症部)

Molecular epidemiology for regional infectious disease control by public health institute

○Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto (Dept. Infect. dis., Kobe Inst.)

当研究所が属する地方衛生研究所 (以下, 地衛研) は, 地域の健康危機発生時の原因究明, 行政処分の根拠となる検査, 感染症発生動向調査に係る検査, 感染症対策に資する調査研究を担う行政機関である。令和5年の地域保健法改正に伴い, 地衛研は法定化され, 地域で発生する様々な感染症に対して, 科学的根拠の提示や技術的中核となることが求められている。

神戸市では, 感染症法に基づく感染症発生動向調査の一環として, 細菌感染症に関する病原体サーベイランスを実施している。医療機関から患者検体や分離菌株を提供いただき, 分離同定, 性状解析, 遺伝子型別解析を実施している。また, 当研究所では全ゲノム解析による分子疫学を取り入れ, 地域内の感染流行状況や伝播経路の詳細な解析を行い, その結果を行政機関や医療機関に還元している。本講演では, 地域の感染症対策に寄与した3つの事例について報告する。

1. A 群溶血性レンサ球菌感染症: COVID-19 流行前後で, MIUK 系統の異なる Clade が市内に流入していたことを明らかにした。

2. KPC-2 産生 *Enterobacter kobei* による ICU 内感染伝播事例: *bla_{KPC-2}* 保有プラスミドの配列決定や分離株の SNVs 解析を実施し, ICU 環境内での汚染源や伝播経路を明らかにした。

3. *Legionella longbeachae* によるレジオネラ症事例: 尿中レジオネラ抗原検査で陽性となったレジオネラ症患者の喀痰から, 国内では稀な *L. longbeachae* を分離し, 診断・検査法の検討や遺伝的特徴について解析した。

いずれの事例においても, 地域の医療機関 (特に検査室や感染対策チーム), 保健所, そして当研究所が緊密に連携し感染症対策を進め, その過程で得られた分子疫学的知見を紹介する。

WS9-3

猫ひっかき病の検査診断法の開発: 患者分離株 YH-01 の遺伝子型別解析から血清診断用抗原への応用

○柳原 正志 (阪大院・医保・生体病態情報科学)

Development of serological diagnosis for cat scratch disease using Japanese strain YH-01

○Masashi Yanagihara (Dept. Clin. Lab. Biomed. Sci., Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Cat scratch disease (CSD) は, 主に猫を介して感染する人獣共通感染症で, その原因菌は *Bartonella henselae* である。本菌は発育が遅く, 患者からの菌の分離培養が難しいため, CSD の検査診断は, 間接蛍光抗体 (IFA) 法による抗 *B. henselae* 抗体価測定が標準法として行われている。しかし, IFA 法の特異度は高いものの, 感度は低いため, 確定診断に至らない症例も多く, 検査法の改良が必要であった。我々は, 感染性心内膜炎 (IE) 患者の大動脈弁疣贅から *B. henselae* YH-01 株の分離に成功した (Diagn Microbiol Infect Dis. 68:174-176, 2010.)。YH-01 株と患者由来臨床材料 DNA サンプルおよびネコ由来分離株を用いて, Multispace typing (MST) 法で日本の *B. henselae* の MST 遺伝子型の分布を検討したところ, 日本の患者由来株とネコ由来株の MST 遺伝子型は Cluster 1 に分布して一致していた。一方で, IFA 法の抗原に用いられている Houston-1 株 (米国) の MST 遺伝型は Cluster 2 に分類され, 日本の菌株と系統が異なっていた (Emerg Infect Dis. 16:1983-1985, 2010.)。そこで, 我々は国内の CSD 疑い患者 100 例の血清を用いて YH-01 株との血清反応性を検討した。IFA 法の IgM 抗体価測定において, 従来の Houston-1 株で陽性の 15 例は全て YH-01 株でも陽性となり, このうち 4 例では YH-01 株の方が高い抗体価を示した。一方, Houston-1 株で陰性の 85 例中 6 例 (7%) で YH-01 株によって新たに陽性となった (Diagn Microbiol Infect Dis. 87:22-24, 2017.)。このように我々の一連の研究は, IE 患者から分離された YH-01 株を用いて, *B. henselae* MST 遺伝子型の違いが抗原性に影響することを見出し, CSD の検査診断法の向上に寄与した。

WS9-5

人肌に加温した高頻度接触面がその表面上での病原細菌の生存性に与える影響: 新たな感染制御の試み

○大久保 実彦¹, 栗城 琴華¹, 今野 綾乃², 中村 眞二³, 山口 博之¹ (¹北大・院・保健科学, ²道衛研・食品科学, ³順大院・医・形態解析イメージング)

Effect on the viability of pathogenic bacteria on high-touch surfaces heated to body temperature

○Torahiko Okubo¹, Kotoka Kuriki¹, Ayano Konno², Shinji Nakamura³, Hiroyuki Yamaguchi¹ (¹Fac. Health Sci., Hokkaido Univ., ²Hokkaido Inst. Pub. Health, ³Div. Biomed. Imag. Res., Juntendo Univ. Grad. Sch. Med.)

手すりやドアノブ等に付着した細菌は接触感染の原因になると懸念されるが, 接触面での病原細菌の生存機構やそれを規定する環境因子は不明である。本研究室では接触面の付着細菌がどの程度生残するかを調査する中で, 病院内スワブの生菌数と環境要因との主成分解析から, 温度と湿度が低いほど生菌数が増加することを見出した。この結果から, 人体に無害で環境温度の幅でもある人肌程度 (35-37°C) の加温で付着細菌の生存性を制御できるのとの仮説を立て, 接触面での生菌数と温度の関係を検証した。まず床材断片に菌液 (大腸菌・黄色ブドウ球菌) を滴下後に気温制御下で最大 11 日間静置し生菌数を測定すると, 低温 (15°C) よりも高温 (37°C) で生菌数が有意に低下した。次に, 正確に表面温度を 35°C に調整できる手すり型デバイスを作製し, 気温 15°C 湿度 55% 条件で生菌数を 72 時間測定した結果, 無加温 (15°C) と比べ加温 (35°C) で大腸菌・黄色ブドウ球菌の生菌数が有意に減少した。さらに, 便座モデル上で大腸菌生菌率と温度の関係を検証すると, 生菌率と表面温度 (22-37°C) に負相関 ($r = -0.53$, $p < 0.01$) がみられた。その機序としてトランスポゾン挿入変異株を用いた実験から, 大腸菌の NhaA (Na⁺/H⁺ antiporter) 欠損株では接触面生菌数が大幅に低下した。グラム染色像や顕微鏡観察では NhaA 欠損株で菌体長が著しく伸長しており, 他の変異株での検証でも菌体長と接触面生菌率に負の相関傾向があった ($r = 0.447$, $p = 0.083$) ことから, 細菌の表面積が接触面での生存性に関与する可能性が示唆された。これらの結果から, 接触面の人肌加温が付着細菌数を低減させる方法として有効であり, 新たな感染制御策となり得ると考えられる。

WS9-6

臨床検査学分野の若手女性研究者が行っている細菌学研究の一例紹介

○涌井 杏奈^{1,2}, 佐藤 拓一² (¹新潟医福大・医療技術, ²新潟大・院保・臨床化学)

An example of microbiological research by a young researcher in the field of medical technology

○Anna Wakui^{1,2}, Takuichi Sato² (¹Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare, ²Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci.)

【緒言】20歳代の博士の女性研究者が行っている細菌学研究の一例を紹介し、本WSに貢献できればと考えます。

【経緯 1】「卒業研究」でペットボトル飲料物の飲み残しについて着手し、現在まで継続させています。飲み残しの常温保存による細菌の増殖など、飲料物の安全性に関するデータが広く社会で求められていることに着想しています。ペットボトル飲料物から1万個レベルの細菌が検出され、その構成は *Streptococcus*, *Actinomyces/Schaalia*, *Gemella*, *Cutibacterium*, *Veillonella* など、それを1日保存すると、*Streptococcus* 主体に変容することが判明しました(*Dent J* 2021, *JOB* 2022;2024)。

【経緯 2】修士課程では、液体ミルクを哺乳瓶乳首を使って飲んだ際の、口腔からの流入について解析しました。冷蔵保存した場合も、細菌量・構成ともに類似しており、冷蔵保存が可能であることが示唆されました(*JOB* 2021)。併せて、PCR法と制限酵素を組み合わせた口腔細菌叢解析(プロファイリング)システムを構築し、迅速で廉価であることから、小規模の研究室における細菌叢研究に適していると考えられます(*JOB* 2021)。

【経緯 3】博士課程では、搾乳した母乳を対象とし、母乳には一定レベルの細菌が生息していること、それを哺乳瓶ニップルで授乳すると、新生児の口腔内から逆流し、細菌叢構成が変化すること、授乳後の母乳は、ある程度の期間、冷蔵保存できる可能性を示しました(*JOB* 2022)。

【経緯 4】助教に採用され、幸い、科研費(若手研究)に採択され、スマホ画面や不織布マスク、エレベータボタン等を介しての微生物伝播について探求しています(*JOB* 2025)。

WS10

病原因子を駆使した細菌の巧妙な戦略

コンビナー：原 英樹(旭川医科大学)
坂本 啓(山口大学)

Ingenious strategies of bacteria using virulence factors

Conveners: Hideki Hara (Asahikawa Medical University)
Kei Sakamoto (Yamaguchi University)

細菌感染が発症および重症化する要因の1つに細菌毒素やエフェクターなどの病原因子の有無が挙げられる。多くの病原因子は、生物活性を示すために作用点となる受容体を必要とする。また、受容体からのシグナルが細胞内の下流分子に正しく伝達されることで宿主の免疫応答や表現型に効果が現れる。さらには、細菌は多数のリガンドを発現することから、実際の感染症では複数の受容体が同時期に活性化し、その結果誘導される炎症応答はそれらが相互作用したものとなる。つまり、感染症における病原因子の機能を解明するためには、細菌感染による細胞および個体レベルでの検証が必要不可欠となる。本セッションでは、病原因子に加えて、それらが生物活性を発揮するのに必要となる受容体やシグナル伝達分子まで包括した最新の研究を紹介し、より感染実態に迫る細菌の病原機構について議論する。

WS10-1

Exacerbation mechanisms of Gram-positive pathogen infection through inflammasome responses

○原 英樹(旭川医大・医・感染症学)

○Hideki Hara (Dept. Infect. Dis., Asahikawa Med. Univ.)

Infections with pathogenic microorganisms, such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, activate inflammasomes that are innate immune responses. After sensing microbial components by intracellular receptors including Nod-like receptors and AIM2-like receptors, inflammasome adaptor ASC and procaspase-1 are recruited to form a protein complex “Inflammasome”, resulting in activation of caspase-1. Active caspase-1 induces a secretion of proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-18, and a programmed-cell death Pyroptosis. Although infection with the pathogens activates inflammasome, the molecular mechanisms remained poorly understood. Here we show that NLRP6, an intracellular receptor that engages inflammasome responses, was activated in macrophages infected with these Gram-positive pathogens. Notably, NLRP6-deficient mice harbored fewer bacterial burdens compared with wild-type mice. We demonstrated that NLRP6 recognizes lipoteichoic acid, a cell wall component of Gram-positive bacteria, to secrete IL-1 β and IL-18. IL-18-deficient mice were resistant to these Gram-positive pathogen infections as well as NLRP6-deficient mice. These results indicate that inhibition of inflammasome responses ameliorates these Gram-positive pathogen infections.

WS10-2

腸炎ビブリオの外毒素／エフェクターによる病原性発現機構

○松田 重輝 (阪大・微研・細菌感染)

Exotoxin/effector-mediated pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*

○Shigeaki Matsuda (Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ.)

外毒素とエフェクターは広義にはタンパク毒素に分類され、細菌から分泌され宿主細胞に作用して毒性を発揮する。一方でその作用様式は異なり、外毒素は一旦菌体外へ放出されたのちに宿主細胞に作用するが、他方、エフェクターは III 型分泌装置のような接触依存的なタンパク質分泌装置によって菌体より宿主細胞内に直接注入されて作用する。腸炎ビブリオは主要な食中毒原因細菌の一つであり、その重要な病原因子として外毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) および第二染色体にコードされる III 型分泌装置である T3SS2 が知られている。本発表では我々が見出した、TDH が本来の輸送経路から III 型分泌装置に混線するような形でエフェクターとして輸送される「クロストーク分泌」について、その病原性および輸送機構を中心に紹介する。また腸炎ビブリオの T3SS2 エフェクターとしては現在のところ 10 種類が報告され、複数が下痢原性に重要であるとされているが、これら定型的なエフェクターによる下痢原性についても我々の成績を紹介しつつ、併せて議論したい。

WS10-3

病原細菌による宿主細胞死制御機構の包括的解明

○芦田 浩¹、鈴木 敏彦¹ (¹東京科学大・細菌感染制御学、²千葉大・真菌医学研究センター)

Comprehensive analysis of bacterial strategies that regulate host cell death

○Hiroshi Ashida¹, Toshihiko Suzuki¹ (¹Dept. Bacterial Infection and Host Response, Institute of SCIENCE TOKYO, ²Medical Mycology Research Center, Chiba Univ.)

腸管病原菌が感染を成立させるためには、宿主による様々な生体防御機構と対峙する必要がある。病原細菌の感染に対し、宿主は炎症や細胞死といった自然免疫応答を誘導することで感染を効果的に阻止する。特に、細胞死はその形態や誘導機構により、様々なタイプに分類されるが、感染により損傷を受けた細胞を病原細菌ごと取り除くため、生体防御機構として効果的である。これに対し、多くの腸管病原菌は、III 型分泌装置から複数の病原性タンパク (エフェクター) を宿主細胞内に分泌する。エフェクターは自身の有する酵素活性により宿主細胞機能を菌にとって有利になるようにハイジャックすることで自然免疫応答を抑制し、感染を拡大させる。これまで病原細菌感染では、宿主センサーが菌体構成成分や感染に伴う細胞性物質を認識し、自然免疫応答を誘導することが明らかにされてきた。しかし近年、病原細菌エフェクターによる宿主細胞機能の攪乱自体が、別の炎症反応や細胞死といった自然免疫応答を誘導する引き金となる現象が報告されている。すなわち、病原細菌エフェクターの中には「諸刃の剣」として機能しているものが存在する。本研究では、腸管病原細菌感染における自然免疫誘導機構とそれに対抗する腸管病原細菌の感染戦略に関する最近の知見を紹介する。

WS10-4

Legionella manipulates host SNAREs using multimodal post-translational modifications

○北尾 公英¹、久堀 智子²、永井 宏樹² (¹北大・人獣研・感染免疫、²岐阜大・医・病原体制御)

○Tomoe Kitao¹, Tomoko Kubori², Hiroki Nagai² (¹Div. Infect. Immun., Int'l. Inst. for Zoonosis Ctrl., Hokkaido Univ., ²Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ.)

Legionella pneumophila is an intracellular bacterial pathogen that primarily resides in protozoan in nature. Once the human body inhales aerosols contaminated with *L. pneumophila*, the bacterium infects alveolar macrophages and causes severe atypical pneumonia. Following internalization of *L. pneumophila* by alveolar macrophages through the process of phagocytosis, the early phagosomes containing the bacterium are converted into endoplasmic reticulum (ER)-mimicking replicative niche known as the *Legionella*-containing vacuole (LCV) by fusion with ER-derived transport vesicles. Approximately 300 effector proteins, which are translocated into host cells via a type IV secretion system, play an important role in this process. In eukaryotic cells, SNARE proteins are responsible for membrane fusion, which mediates the fusion of intracellular vesicles with the target membrane of each organelle. Membrane fusion is facilitated by the binding and structural alteration of v-SNAREs on vesicles and t-SNAREs on the target membrane. Recent studies have shown that some *L. pneumophila* effectors manipulate host SNAREs responsible for membrane fusion through multimodal post-translational modifications. In this talk, we will provide a comprehensive overview of recent findings, including our results, showing how the *L. pneumophila* manipulates host SNARE proteins to survive in host cells.

WS10-5

化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素 HylA の不活性化機構と進化的役割の解明

○山口 雅也 (医薬基盤・健康・栄養研)

Inactivation mechanism and evolutionary role of hyaluronidase HylA in *Streptococcus pyogenes*

○Masaya Yamaguchi (NIBIOHN)

病原細菌の重要な生存戦略の一つに糖鎖を介した免疫機構の回避が挙げられる。我々はこれまでに、病原性のレンサ球菌において、種間や種内において莢膜糖鎖と糖鎖分解酵素が互いに排他的に分布していることを示した。特に、化膿レンサ球菌の多くの系統ではヒアルロン酸莢膜を持ち、ヒアルロン酸分解酵素 HylA は 199 番目のアミノ酸の 1 残基変異により不活化されている。本研究では、HylA の分子系統関係を明らかにするとともに、不活性型 HylA の結晶構造を解明し、点変異が酵素活性を失わせる機構を解明した。

分子系統解析から、化膿レンサ球菌への種の分化とともに HylA は不活性型になったが、莢膜を欠いた系統においては自然変異により活性型に復帰変異したことが示唆された。次に、X 線結晶構造解析により、未解明であった不活性型 HylA の構造を決定した。結晶構造と分子動力学シミュレーションから、不活性型 HylA では D199V の変異によって側鎖による水素結合が形成できなくなり、活性中心の残基の構造安定性が低下することで糖鎖分解活性が失われるという不活性化機構が示された。一方で、ドッキングシミュレーションによる相互作用解析から、不活性型 HylA においてもヒアルロン酸結合能は維持されていることが示唆された。

これらの結果から、不活性型 HylA はヒアルロン酸との結合能は維持しているにも関わらず、活性残基ではない 1 残基の変異によって活性中心の構造が不安定になり、糖鎖分解能が失われたことが示された。さらに、莢膜を持つ株においては不活性型 HylA の遺伝子が維持され、莢膜を失った場合には活性型への復帰変異が起きるという進化上の排他的な関係が示唆された。

WS11

天然物質の抗微生物作用 ～未来戦略に向けたアップデート～

コンピーナー：岡 真優子（京都府立大学）
三宅 真実（大阪公立大学）

Antimicrobial activity of natural substances — Update for Future Strategies in Infectious diseases—

Conveners: Mayuko Osada-Oka (Kyoto Prefectural University)
Masami Miyake (Osaka Metropolitan University)

天然物に由来する抗菌物質の研究の歴史は古く、その一部は抗生物質の発見と開発に繋がった。しかしやがて薬剤耐性の問題に直面し、従来型の研究開発手法には見直しが迫られている。近年、画像解析技術、ゲノム科学、情報科学、構造生物学などの飛躍的な発展を背景として、新しい視点からの抗微生物活性スクリーニングが可能となった。また生物の中間代謝産物を微生物制御へ利用した成功例も報告されている。さらに、既知あるいは未知の抗微生物活性を用いて、生命現象をより深く理解しようとするアプローチも試みられている。本シンポジウムではこのような取り組みの象徴的な例を紹介することで、天然物質の持つ潜在性をあらためて認識するとともに、この分野に関する未来戦略の1つの方向性を示したい。

WS11-1

Mixture design of antibacterial plant extracts via machine learning

○藪内 弘昭（和歌山・田辺保健所）

○Hiroaki Yabuuchi (Tanabe Health Center, Wakayama Pref.)

Plant extract contains diverse phytochemicals and is considered as an important resource for drug discovery. However, the chemical diversity makes it difficult to predict its biological activity as a mixture. Herein, three computational models that predict antibacterial activity of the plant extract have been developed using machine learning and literature data, and their performances were evaluated using a standard strain of *Staphylococcus aureus*. (1) A model that classifies bioactive compounds and plants in semantic space generated by word embedding algorithm. The model led to the discovery of antibacterial activity of essential oils from *Lindera triloba* and *Cinnamomum sieboldii*. (2) A chemometric model that integrates chemical composition data with structure-based chemical ontology. Antibacterial assay revealed that the model correctly predicted the activity of commercially available essential oils with an accuracy of 83%. (3) A classification model using graph embedding to predict types of (synergistic/antagonistic/no) antibacterial interaction between essential oils. Broth microdilution assay revealed that 4 out of 16 essential oil pairs exhibited synergistic interaction as predicted. These results indicate that machine learning of literature data can be a highly efficient approach for screening and mixture design of antibacterial plant extracts.

WS11-2

Analysis of the action of germination inhibitors against *Clostridium* and *Bacillus* spp. spores

○三宅 真実^{1,2}, 岡脇 良奈², 櫻井 研輔², 安木 真世^{1,2}, 関本 訓士³ (¹大阪公立大・獣・公衆衛生, ²大阪府立大・獣・公衆衛生, ³三菱ケミカル)

○Masami Miyake^{1,2}, Rana Okawaki², Kensuke Sakurai², Mayo Yasugi^{1,2}, Satoshi Sekimoto³ (¹Lab. Vet. Public Health, Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ., ²Lab. Vet. Public Health, Dept. Vet. Sci., Osaka Pref. Univ., ³Life Sol. Tech. Center, Mitsubishi Chemical Co.)

Bacterial spores are ubiquitously distributed in natural environments and often contaminate in food products such as vegetables and meats, which consequently causes food spoilages and food-borne illness under certain circumstances. A critical control point to prevent such food-borne illness is a process where the contaminated spores begin to revive from dormant status (germination). To establish a new food hygiene practice, we aimed to prevent spore germination in foods and searched inhibitory activity among spice extracts on the germination of *C. perfringens*. As results, four spice-water-extract exhibited strong inhibitory activities, of which one seemed to contain high-molecular-weight inhibitors (more than 1,000) and the others contain relatively lower ones. The action of the former (derived from clove extract) showed irreversible action, whereas the other inhibitions were reversible. We also examined the action of a food additive (emulsifier) using *B. subtilis* spores as a model organism and finally determined the action sites of each inhibitor during the germination-to-outgrowth process of the bacterial spores. The results suggest that phytochemicals in spices can be applied to food hygiene practice in combination with a standard physical procedure that inactivates spores in foods by heating at ultra-high temperature (more than 121°C).

WS11-3

Antimicrobial activity of Red ginseng for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

○岡 真優子^{1,2}, 篠原 明莉², Dendi Krisna Nugraha³, 中川 一路⁴, 堀口 安彦³ (¹京都府大院・生命環境・食環境安全性, ²京都府大・農学食料・食環境安全性, ³大阪大・微研・分子細菌, ⁴京都大院・医・微生物感染症)

○Mayuko Osada-Oka^{1,2}, Akari Shinohara², Dendi Krisna Nugraha³, Ichiro Nakagawa⁴, Yasuhiko Horiguchi³ (¹Food Hyg. and Environ Health, Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²Food Hyg. and Environ. Health, Fac. of Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., ³Dep. of Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ., ⁴Dep. of Microb., Grad. Sch. of Med., Kyoto Univ.)

Red ginseng (紅参), made from the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer (高麗人参) has been used as a traditional medicine to treat various diseases for more than 2,000 years. Ginsenosides are a class of natural product steroid glycosides and triterpene saponin responsible for the pharmacological effects of red ginseng. Nearly 20 ginsenosides identified in red ginseng, are classified into three groups based on the structure of the aglycone moieties: 20S-protopanaxadiol (PPD), 20S-protopanaxatriol (PPT), and oleanolic acid. We first found that ginsenoside Rg3 (PPD type) in red ginseng increased the sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to β -lactam antibiotics (oxacillin, ampicillin, carbenicillin, and cefazolin) and aminoglycoside antibiotics (kanamycin and gentamicin). Similar effects were found in compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1 (PPT type); however same ginsenosides including ginsenoside Rb1 did not increase the antibiotic sensitivity. Furthermore, ginsenoside Rg3 inhibited the production of *S. aureus* toxins, and toxin-dependent inflammatory reactions in macrophages. Unlike known antibiotics, ginsenoside Rg3 does not have bactericidal activity against MRSA but reduces bacterial virulence, implying that ginsenoside Rg3 exerts antimicrobial activity in a different way from known antibiotics.

WS11-4

Enterococcus faecalis 特異的ファージ由来酵素を用いた aGVHD の治療法の開発

○植松 智^{1,2} (1大阪公立大・医・ゲノム免疫, 2東大・医科研・メタゲノム医学)

An enterococcal phage-derived enzyme suppresses graft-versus-host disease

○Satoshi Uematsu^{1,2} (1Dept. Imm. & Gen., Grad. Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ., 2Div. Metagenome Med., IMS., U Tokyo)

腸内細菌叢の変化(dysbiosis)は、同種造血細胞移植後の acute Graft Versus Host Disease (aGVHD) の病態形成に重要な役割を果たしている。dysbiosis を安全に是正する有効な方法はまだ確立の途上である。最近の報告では、dysbiosis に伴う腸内 *Enterococcus faecalis* の増殖が aGVHD の危険因子であることが示された。我々は、同種造血細胞移植患者の腸内細菌叢を調べ、*E. faecalis* がバイオフィルムを形成することによって排除を免れ腸内で増殖することを見出した。患者の糞便からサイトリジン陽性の高病原性 *E. faecalis* を分離し、菌の全ゲノム配列データを解析し、*E. faecalis* 特異的バクテリオファージ由来の溶菌酵素エンドライシンを同定した。エンドライシンは、*in vitro* および *in vivo* で *E. faecalis* のバイオフィルムに対して溶菌活性を示した。さらに、*E. faecalis* または *Enterococcus* 属細菌が優勢である患者の糞便サンプルを移植したノトバイオームマウスにおいて、エンドライシン投与群では、腸内 *Enterococcus* 属細菌の菌数が減少し、生存率が有意に改善した。既存の抗生剤では排除困難なバイオフィルム形成性の病原性 *E. faecalis* に対するエンドライシンの投与は、aGVHD の新しい治療となる可能性がある。

WS11-5

Diverse anti-infectious diseases actions of natural products such as ascofuranone and 5-ALA

○北 潔 (長崎大・院・熱帯医学・グローバルヘルス)

○Kiyoshi Kita (Sch. Trop. Med. Global Health, Nagasaki Univ.)

Pathogen have developed a variety of physiological functions necessary for their survival within the specialized environment of the host. Using metabolic systems that are very different from those of the host, they can adapt to diverse environments within the host animals. For example, parasite mitochondria play diverse roles. In particular, dynamic changes in the morphology and components of the mitochondria during the life cycle are very interesting elements of biological processes such as developmental control and environmental adaptation. As mitochondrial function is essential for the survival of the parasites, it should be promising target of chemotherapy. Anti-malarial atovaquone, which targets cytochrome b of parasite mitochondrial respiratory chain, is a well known case. In this talk, uniqueness of parasites and bacterial respiratory chains and discovery of anti-COVID-19 candidate as well as anti-malarial natural amino acid, 5-aminolevulinic acid (5-ALA) will be presented in addition to diverse effect of ascofuranone produced by fungus, which inhibits respiratory chains of Trypanosomes and Echinococcus. Finally, possibility of the bacterial respiratory chain as a target for anti-tuberculosis drugs will be discussed.

JRS 学会企画 中・高校生研究発表 セッション

コンピーナー：大原 直也（岡山大学）
小椋 義俊（久留米大学）

Research Presentations by Junior High School and High School Students

Conveners: Naoya Ohara (Okayama University)
Yoshitoshi Ogura (Kurume University)

JRS-1

使用済みの機能性不織布マスクから検出された細菌の分析

○小田 直太郎¹、加藤 優希²、関口 未来²、丸山 伸吾²、涌井 杏奈^{2,3}（¹新潟市立 五十嵐中学校 3年、²新潟大・院保・臨床化学、³新潟医福大・医療技術）

Analysis of bacteria detected from used multifunctional non-woven fabric masks

○Naotaro Oda¹, Yuki Kato², Mirai Sekiguchi², Shingo Maruyama², Anna Wakui^{2,3}（¹Ikarashi Junior High School, Niigata City, ²Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ³Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare）

【研究の背景・目的】前回の大会（2024 年札幌）で、1 日使用した通常の不織布マスクから検出される細菌の数・構成について報告しました。今回は、機能性（抗菌性）不織布マスクから検出される細菌について分析しましたので、報告します。

【方法】発表者自身（実験当時、中 2）および研究室に付き添いで来ている保護者 1 名を被験者としてしました。機能性不織布マスク（バイロン PL Pro マスク®；シオノギヘルスケア社）を 1 日使用後、口唇に触れていた部分（滅菌ろ紙で窓枠を作成し、その内側 2.5 cm 四方）を滅菌綿棒で強く擦過し、生理食塩水に懸濁し試料としました。別日に、同社製のスプレー（マジッシュ®）を噴霧し、1 晩陰干し後、試料採取しました。ボルテックス後、CDC 血液寒天平板に接種し、37°C で嫌気培養（ヒラサワ社製、ANX-Type 3）を行い、各コロニーから DNA 抽出し、16S rRNA PCR-RFLP（アガロースゲル電気泳動）法により細菌種の同定を行いました。

【結果】機能性マスクからは、中 2（36.7±38.6）、大人（1255±645）CFU/mL の細菌が検出され、前回、報告した通常の不織布マスク [各々（992±1511）、（6600±5481）CFU/mL] より、かなり少なくなった。その細菌構成は、中 2 で *Staphylococcus* (54.5%)、*Rothia* (18.2%)、*Neisseria* (9.1%) で、大人で *Staphylococcus* (64.5%)、*Corynebacterium* (19.4%)、*Cutibacterium* (16.1%) でした。スプレーを噴霧すると、各々（6.7±9.4）、（10.0±8.2）CFU/mL まで減少し、残存菌は *Staphylococcus* や *Schaalia* でした。

【考察】機能性マスクだと、通常の不織布マスクの、中 2（子供）で約 1/30、大人で約 1/5 に細菌量が減少することが分かりました。そしてそれがスプレー噴霧で、さらに大きく減少することも分かりました。機能性マスクを使用し、スプレーを噴霧することで、使用済みの不織布マスクの「再利用」という資源の活用（ゴミの削減）の実用化に大きく近づいたと思います。

JRS-2

スマートフォン画面から検出された細菌の分析

○五十嵐 優翔¹、小田 直太郎²、加藤 優希³、丸山 伸吾³、涌井 杏奈^{3,4}（¹新潟市立 鳥屋野中学校 2年、²新潟市立 五十嵐中学校 3年、³新潟大・院保・臨床化学、⁴新潟医福大・医療技術）

Analysis of bacteria detected from smartphone touchscreen

○Yuto Ikarashi¹, Naotaro Oda², Yuki Kato³, Shingo Maruyama³, Anna Wakui^{3,4}（¹Toyono Junior High School, Niigata City, ²Ikarashi Junior High School, Niigata City, ³Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ⁴Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare）

【研究の背景・目的】日常生活において、スマートフォンやタブレット端末への接触頻度が高く、スマートフォン画面の消毒を勧める記事・報道も見かけます。そもそものくらいの細菌が画面に付着しているのに興味を持ち、培養し、分子生物学的に解析してみました。【方法】発表者 2 名（実験当時、中 1 および中 2）、さらに研究室に付き添いで来ている保護者 1 名のスマートフォンやタブレット端末を対象としました。（130μL の生理食塩水で湿らせた）滅菌綿棒で丁寧に擦過し、生理食塩水（1,040μL）に懸濁し、試料としました。各試料をボルテックスで分散させ、CDC 血液寒天平板に接種し、37°C で嫌気培養を嫌気グローブボックス（ヒラサワ社製、ANX-Type 3）内で行いました。得られた各コロニーから DNA を抽出し、16S rRNA PCR-RFLP（アガロースゲル電気泳動）法により細菌種の同定を行いました。【結果】スマートフォンなどの画面からは、中学生（1170 ± 850）、大人（77.5 ± 17.5）CFU/mL の細菌が検出され、研究室大学院生 10 例（228 ± 271）の結果と異なっていた。その細菌構成は、中学生で *Staphylococcus* (62.5%)、*Corynebacterium* (37.5%) で、大人で *Cutibacterium* (47.4%)、*Corynebacterium* (36.8%)、*Actinomyces* (10.5%)、*>Staphylococcus* (5.3%) でした。大学院生 10 例の構成は、*Cutibacterium* (65.5%)、*Streptococcus* (13.3%)、*Staphylococcus* (8.9%)、*Corynebacterium* (7.4%) などでした。【考察】スマートフォンなどの画面からは、およそ数十～1 千個程度の細菌が検出され、その構成は、*Staphylococcus* や *Cutibacterium*、*Corynebacterium* で、およそ指先（皮膚）で検出されるとされる細菌でした。現在、自分たちの指先を対象として実験を進めていて、細菌量と構成の点で、実際の程度、類似性があるのかを、実験的に確かめようと思っています。

JRS-3

岩塩の中にいる菌について

○寺岡 壮太、○池藤 智史、○大谷 一太（大阪府立千里高等学校・理科学研究部）

About the bacteria in rock salt

○Souta Teraoka, ○Satoshi Ikefuji, ○Ichita Otani (SENRI High school)

岩塩の中にいる高度好塩菌という菌についての研究を行った。本研究は本校の先輩方の先行研究の発表ポスターに基づき、その研究に同定作業などの不備があったため、より深掘りして研究を行った。本研究では、高度好塩菌を様々な岩塩から取り出して培養し、どの種類にどのような、どれくらいの高度好塩菌がいるのかを調べることを目的として実験、研究を行った。まず研究に先立って、本校の実験室にあったクリスタル結晶の塩化ナトリウムを用いて実験を行った。しかし、その実験では高度好塩菌の増加はみられず、培養は失敗に終わったことが考えられた。そして今回は、クリスタル岩塩とピンク岩塩の 2 種類の岩塩を用いて、培養を行っていた。実験は、液体 LB 培地の入った試験管に 3. 6g、4. 0g、4. 4g に分けたそれぞれの岩塩の粉末を入れて、ロータリーシェーカーで 1 週間培養し、その後に分光光度計を用いて、透過率を測定し、培養できているかを調べるという流れで行った。今回の結果としては、ピンク岩塩は塩分濃度が 20%前後のところでは好塩菌が発生しているのに対し、クリスタル岩塩はほぼ均一という結果が得られた。この結果に対する考察としては、クリスタル岩塩は不純物がほとんど含まれていないが、ピンク岩塩にはナトリウム以外のミネラルが含まれている。つまり、これらのミネラル成分が発生する高度好塩菌を限定的な範囲に保っていると思われる。また、ピンク岩塩に含まれている異物の影響の可能性もある。といったことが考えられる。今後の展望として、高度好塩菌とミネラル成分の因果を調べながら、実験を継続し、他の色の岩塩でも試行を行うことを考えている。

JRS-4

飲みさしのペットボトル飲料における細菌の増殖

○田尾 倅那 (高槻高等学校)

Bacterial growth in partially consumed bottle

○Yukina Tao (Takatsuki High School)

夏に飲みさしのペットボトルを置いておくと食中毒になる。しかし、昨年見たネット記事によると、スボドリでは食中毒の原因となる細菌は増殖しない。この原因はスボドリが酸性だから、と書いてあったが、私は糖を多く含むのになぜだろうと思い、細菌の増殖と飲料の pH や糖の関係を明らかにするために研究を始めることにした。予備実験としてネット記事と同様に、口を付けて飲んだ入れたペットボトル飲料を、直後と一日常温で放置した後の残液を培養し、コロニー数を計測した。その結果、ネット記事と同様の結果が得られた。そこで、実験 1 では、pH と細菌の増殖について調べた。グルコース溶液にクエン酸を加えた。そして、それをペットボトルに入れ、口をつけて飲み、飲んだ直後と 30℃ で 1 日置いた後の溶液をそれぞれ 100μl、標準寒天培地で培養させコロニー数を数えた。その結果から、pH が低い飲料では細菌が増殖しにくいことが分かった。次に、実験 2 では糖の種類と細菌の増殖について調べた。細菌の増殖が抑制されるスボドリやオレンジジュースでは果糖や砂糖が含まれている。そこで、水にブドウ糖、果糖、ショ糖を加えて、大腸菌か私の口の中から単離したブドウ球菌も添加した。そして、実験 1 と同様にしてコロニー数を調べた。また、溶媒を麦茶に変える実験もおこなった。その結果、ブドウ糖や果糖を加えた条件では、砂糖を加えたときよりも細菌の増殖が抑制された。ブドウ糖と果糖が単糖で砂糖は二糖であることから、単糖を加えたときは高張となり、細菌が増殖できなかったと考えた。今後は、糖の影響についてより詳細に検討するために、人工甘味料のみを含む溶液で検証をおこなう。

JRS-5

若狭高校内のカビの定量

○畑下 彩葉, ○角野 心麗, ○梶原 琉菜, ○中畑 愛花 (福井県立若狭高等学校)

Quantification of mold within Wakasa High School

○Iroha Hatashita, ○Mirei Kadono, ○Runa Kajihara, ○Aika Nakahata (Wakasa Senior High School)

本研究の目的はカビの数を数値化し、校内におけるカビが多い場所を特定することで効果的な対策を行うことである。この研究の背景は、先輩方の先行研究であるカビマップから、若狭高校にもたくさんの種類のカビや細菌が存在していることがわかり、学校生活をより良い環境で快適に過ごせるようにしたいと考えたからだ。先行研究では、カビや細菌の量の数値化がされていなかった。そこで私たちはカビだけに注目してカビの量を数値化することで、カビの多い場所を特定し、効果的なアプローチを行う。私たちは仮説として、カビだけを培養するにはポテトデキストロース寒天培地、クロラムフェニコールを用いることで可能になるという説を立てた。実験を通して、標準寒天培地よりポテトデキストロース寒天培地を使用すること、またクロラムフェニコールを用いることでカビだけを培養することができ、カビの数値化を行うには好条件であることがわかった。しかし、7 日間カビを培養してみたところ、カビのコロニーが大きくなりすぎたり重なりすぎてしまったため、カビの量を実際に数値化することはできなかった。結果から培養 5 日目ではコロニーが大きくなりすぎたため培養期間は約 4 日目のが最適ではと考えた。また、培地の放置時間を短縮すれば培地に落ちる孢子の量が数値化に適した量になるのではないかと予想した。今後の展望として、コロニーが数えられる培地の条件や培養の時間などのカビを数値化する方法を確定させたいと考えている。数値化の方法を確立させたあとで校内のカビの多い場所を特定していきたい。

JRS-6

グリシンが細菌のストレス耐性に及ぼす影響への実験的考察

○太田 遙音, 三枝 拓 (茗溪学園高等学校)

Experimental Investigation of the Impact of Glycine on Bacterial Stress Resistance

○Haruno Ota, Taku Saegusa (Meikei High School)

夏などの高温多湿環境下では、食中毒の被害が増加する。そこで身近にある菌に焦点を当て、簡単に菌の増殖を抑制でき、食品にも添加できる物質を発見し、食中毒予防を目的とした。複数の食品添加物下で細菌の培養を試みたところ、グリシン添加で細菌を抑制する現象が見られた。文献調査により、グリシン添加による細菌の増殖抑制はすでに知られている事実であり、細胞壁合成への効果の報告もあった。このような状況で私は、グリシン添加の有無や濃度の違いにより、細菌へのストレス耐性に違いは出てくるのかということを調べようと考えた。黄色ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌、セラチア菌にどれほどグリシンを投与したら抑制されるのかを調査するために、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定したところ、黄色ブドウ球菌は 1.0M、大腸菌 0.25M、緑膿菌 0.50M、セラチア 1.0M であることが確認でき、黄色ブドウ球菌とセラチア菌が比較的耐性が高いことが示された。現在はグリシン添加時の乾燥耐性および抗生物質耐性を実験している。予備の結果では、グリシン添加時において、黄色ブドウ球菌では乾燥耐性が低下しないが、セラチア菌で乾燥耐性が低下する傾向が観察されている。また、一部抗生物質耐性度への影響も見られている。これらの結果が何を意味するのかを考察していく。

JRS-7

ヒト唾液における抗菌特性の解析 ―グラム陽性菌に対する抑制効果と内因性微生物叢の検討から―

○浅田 結衣 (神戸大学附属中等教育学校)

Analysis of Antibacterial Properties in Human Saliva: Examination of Effects on Gram-Positive Bacteria

○Yui Asada (Kobe Univ. Secondary School)

本研究は、「傷口を舐めたら早く治る」という迷信に基づき、唾液の抗菌特性と潜在的な有害性を検証することを目的とした。唾液には、リゾチームやラクトフェリンなどの抗菌成分が含まれる一方で、多種多様な口腔内常在菌も含まれており、それらが傷口に与える影響は二面的であると考えられる。本研究では、唾液が持つ抗菌効果および唾液中の菌の繁殖傾向を解析し、抗菌作用と感染リスクの両側面を評価した。唾液中の抗菌成分の中でも、リゾチームは唾液の抗菌に大きく貢献している成分である。実験では、健康人の唾液を採取し、環境中およびヒトの体内で広く存在する細菌である枯草菌と皮膚感染や重篤な感染症の原因菌として知られる黄色ブドウ球菌といった身近なグラム陽性菌に対する抗菌活性を培養実験によって評価した。また、唾液を培養して菌の増殖を観察し、唾液中の内因性微生物叢の特性を調査した。その結果、唾液は、黄色ブドウ球菌に対して抗菌効果を示したが、同じくグラム陽性菌である枯草菌に対しては顕著な抗菌効果を示さず、唾液中の内因性微生物が繁殖しやすい環境を提供することも確認された。このことから、唾液中の抗菌成分は創傷治療に有用である可能性があるものの、同時に感染リスクの管理が重要であることが示唆された。さらに、本研究の最終目標として、唾液中のリゾチームを治療薬として応用する可能性について検討を行った。ヒト唾液由来のリゾチームは、外部由来の抗菌薬と比較して拒否反応が少なく、個人の特性に適応した治療が可能であると考えられる。

JRS-8

金属イオンの青カビに対する抗菌性について

○椎津 貴晴（千葉県立船橋高等学校理科）

Antibacterial properties of metal ions against *Penicillium* species

○Takaharu Shiizu (Chiba Prefectural Funabashi Highschool)

花瓶に10円玉を入れると花が長持ちすると知り、金属の抗菌性について興味を持った。そこで、金属イオンの抗菌性について調べることにした。これを明らかにするために、サブロー寒天培地を作りそこに金属イオン(ナトリウム、アルミニウム、カリウム、鉄(II)、ニッケル、銅(II)、ストロンチウム、銀)を含む水溶液を塗布した。更にその上に、学校で採取した青カビの菌液を塗布し、インキュベーターで25°C、72±1時間培養した。観察の結果、銀とニッケルに抗菌性が認められた。さらに、銅、ニッケル、銀の抗菌性の強さを比較するため、試薬濃度を変えて実験を行い、カリウムを比較対照試薬として使用した。その結果、銀、ニッケル、銅の順に強い抗菌性を示すことが明らかになった。今後の展望として、陰イオンが抗菌性に与える影響を調査したいと考えている。

JRS-9

金属イオンの観点から切り花延命について議論する

○今井 仁美、○遠藤 紗代、○松田 杏月（京都府立嵯峨野高等学校）

Discussing Life Extension of Cut Flowers from the Perspective of Metal Ions

○Hitmi Imai, ○Sayo Endo, ○Azuki Matsuda (Kyoto Prefectural Sagano High School)

華道部員からの「夏場に切り花が長持ちしない」という課題に対し、我々は、細菌やカビの発生が生花の腐食を促進していると考え、「銀イオンには細菌の活動を阻害する作用がある」という先行研究をもとに、切り花の延命を目的とした3つの実験を行った。まず、金属イオンの効果を確認するため、リンドウを用いてペーパーディスク法を実施した。その結果、 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} が細菌の発生を抑制することを確認した。次に、生花の種類ごとに有効な金属イオンを探るため、生花5種（デルフェニウム、リンドウ、ガーベラ、バラ、カーネーション）と金属イオン5種を組み合わせ、計25パターンの実験を行った。その結果、それぞれの生花で特に阻止円の大きさが顕著な金属イオンがあることがわかった。このことから生花の種類によって効能のある金属イオンは異なり、また発生する細菌も複数種類存在すると考えた。最後に、金属イオンの抗菌作用が切り花でも応用可能かを検証した。実験2で効果が見られた生花と金属イオンの組み合わせに着目し、実際に切り花を金属イオンを含む溶液に浸して観察した。生花の状態は、花卉生産流通システム研究会「切り花と日持ちの評価マニュアル」を用いて評価した。また、使用した溶液を培地で観察したところ、金属イオンを含む溶液の方が細菌のコロニー数が明らかに減少した。しかし、金属イオンの毒性が強かったためか、花の評価は低く、延命効果は見受けられなかった。今後は生花への安全面も考慮しつつ、花や細菌の種類に応じた最適な金属イオンとの組み合わせを探究していきたい。

JRS-10

緑膿菌のバイオフィーム形成を抑制する植物エキスの探索

○大西 未海¹、○中村 裕愛¹、○野上 馨太¹、○三田村 和奈¹、久保 美和²、村上 圭史³（¹就実高等学校、²徳島文理大学薬学部薬品物理化学講座、³川崎医療福祉大・医療技術・臨床栄養）

Exploration of plant extracts that inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

○Miu Onishi¹、○Yuua Nakamura¹、○Keita Nogami¹、○Nana Mitamura¹、Miwa Kubo²、Keiji Murakami³（¹Shujitu High School、²Fac. Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri Univ., ³Dept. Clinical Nutrition, Fac. Health Science and Technology, Kawasaki Univ. Medical Welfare）

私達は、「総合的な探究の時間」と「川崎医療福祉大学臨床栄養学科高大接続プログラム」を活用し、細菌のバイオフィームを抑制する植物エキスの探索について研究を行った。今回は、ヒトの常在菌であり、水回りや河川など広く環境中に生息し、バイオフィーム形成能が高いことから、しばしば慢性感染症の原因となる緑膿菌に着目した。そこで、緑膿菌に対する抗菌活性やバイオフィーム形成を抑制する効果を有する植物エキスの探索を行った。使用した菌株は、緑膿菌 PAO1 株と臨床由来の研究室保存株 3 株を使用した。植物エキスを、徳島文理大学薬学部薬品物理化学講座で抽出された 192 種類のエキスを使用した。培地は、LB 培地と Vogel-Bonner minimal medium (VBMM 培地) の 2 種類を使用した。バイオフィーム試験は、96 ウェル U 底プレートを使用し、500 µg/mL 濃度の植物エキスを含む培地に、前培養した菌液を加え、30°C で 24 時間培養を行いバイオフィームを形成させた。次に蒸留水で洗浄を行い、0.1% クリスタルバイオレット溶液を加え 10 分間バイオフィームを染色した。蒸留水で洗浄後、エタノールを加えクリスタルバイオレットを溶出し、吸光度 (570nm) を測定することにより、バイオフィーム量を定量した。培養 24 時間後に、細菌の増殖の見られないウェルがあり、緑膿菌対し、抗菌活性を有している可能性がある植物エキ스가観察された。また、増殖には影響を与えないものの、バイオフィーム形成を抑制している可能性のある植物エキ스가観察された。しかし、バイオフィームの定量は、洗浄のやり方などにより結果が大きく影響されることから、今後、実験を繰り返し行い、さらなる検討を行う予定である。

JRS-11

酢酸菌のセルロースバイオフィームの厚み一定化の理由

○米田 拓真（横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校）

The reason why the cellulose biofilm of *Acetobacter xylinum* stops growing

○Takuma Yoneda (Yokohama Municipal Yokohama Science Frontier High School)

酢酸菌(*Acetobacter xylinum*)はセルロースを合成しバイオフィームとして体外に排出する。このセルロースはバクテリアセルロースとして工業的に利用されている。バイオフィームとは主に菌体外多糖と細菌によって構成される生物膜である。バイオフィームは保水状態を保つなどして最近の生育に適する環境を提供する。菌体外多糖には様々な糖類があり、酢酸菌の場合はセルロースを生産する。以降酢酸菌の生産するセルロースフィルムを「バイオフィーム」と表記する。酢酸菌の培養を開始してから数週間経つとバイオフィームの厚みが一定になる。この厚みはグルコース濃度などに依存するが、NBRC350 培地では 4mm 程度である。本研究ではこの現象が起こる理由を調査した。厚みが一定になる理由としては、酢酸菌が栄養不足などによって死滅してしまったという「酢酸菌の死滅」、培地水面上に形成されたバイオフィームが酢酸菌への酸素の供給に影響を与えるなどしてバイオフィームの生産が止まる「バイオフィームの物理的影響」や、培養により培地内の物質の組成が変化したという「培地の化学的性質・組成の変化」などの要因が考えられる。これを検証したところ、厚みが一定になった培地には、酢酸菌がまだ生きていて、バイオフィームを除去したのちに再度バイオフィームは形成されることがわかった。それにより、厚みが一定になる理由は「培地の化学的性質・組成の変化」だと結論づけられた。

JRS-12

ジャイアント ミルワームによるプラスチック分解と分解に関わる微生物の検索について

○疋田 匠, ○渡邊 陽斗, 中山 大智, ○内山 虎之介, ○田上 調, ○増永 大輝 (熊本県立熊本北高等学校)

Plastic degradation by giant mealworms and the search for microorganisms involved in the decomposition

○Takumi Hikita, ○Haruto Watanabe, Daichi Nakayama, ○Toranosuke Uchiyama, ○Shirabe Tanoue, ○Daiki Masunaga (Kumamoto Prefectural Kumamoto Kita High School)

私たちは、環境に影響する廃棄プラスチックの問題に興味があります。現在、海洋に投棄されたプラスチックが環境問題になっています。また、プラスチックは分解されにくく、細かく分解されたマイクロプラスチック自体が生態系に影響を及ぼしています。そのような中、ツヤケシオオゴミムシダマシ (*Zophobas atratus*) の幼虫であるジャイアントミルワームがプラスチックを食べ、エネルギー源として使うことを知りました*。このジャイアントミルワームを使い、プラスチックの分解及び捕食能力について調べました。実験では、まずプラスチックの種類による分解能力の違いを調べました。その結果、特定のプラスチックを捕食することが明らかにしました。さらに、投棄されているプラスチックにおいても捕食することが分かりました。現在、実験に用いたポリスチレンを捕食した際に出た糞を培養し、プラスチック分解酵素をつくる微生物を検索しようとしています。さらに、通常の食物で飼育したものとプラスチックのみで飼育した個体の糞に含まれる微生物を比較し、両者に違いがあるのか比較します。その際、グラム染色を用いる予定です。これらの結果から、ジャイアントミルワームを用いてプラスチックを分解することができる可能性や分解に関わる微生物について研究した内容を発表します。*「シヨナルジオグラフィック」「プラスチック食べる虫を発見、ごみ処理には疑問 現状ではプラスチックを再利用するほうが有用という意見も」 <https://natgeo.nikkeibp.co.jp/atcl/news/17/042600162/?P=2>

JRS-13

乳酸菌と大腸菌による培地の pH 変化の測定

○中嶋 悠人, ○吉田 伊吹 (東京都立科学技術高等学校)

Measurement of pH change in culture medium with lactobacilli and E. coli

○Yuto Nakajima, ○Ibuki Yoshida (Tokyo Metropolitan High School of Science and Technology)

善玉菌により、腸内の pH が下がり腸内の環境が酸性に変化することで、腸の活動が活発になり、腸内環境が整えられる。一方で、悪玉菌は、腸内の pH が上がり腸内の環境がアルカリ性に変化させることで、便秘や下痢などの症状を引き起こす。そこで、善玉菌と悪玉菌それぞれがどのように pH を変化させるのかを調べた。また、日数の変化に伴う、大腸菌数の変化を血球計算盤を用いて計測した。善玉菌は乳酸菌を使い、悪玉菌は大腸菌を用いて LB 液体培地と BCP 固体培地それぞれに培養した。pH の測定は pH メーターと pH 試験紙を用いて測定した。乳酸菌の測定実験を 3 回、大腸菌の測定実験を 2 回行った。1 度目の乳酸菌の測定実験では、うまく pH が下がらなく、コンタミネーションしたと考えられるため、改めて測定実験を行った。結果、1 回目の測定時よりも下がったが、2 回目以降の 3 日目、4 日目の pH が上がった。そして、乳酸菌は乳酸発酵により乳酸を出し、培地を酸性にしているため、3 回目の実験では、乳酸発酵がよく行われるように、乳酸菌以外にグルコースを培地に加え、無酸素状態に近い状態にして、30℃ の温度で 4 日間培養した。結果、4 日間培地の pH は 3.90 まで下がり続けた。一方、大腸菌は培地に何も加えず、30℃ で 4 日間培養した実験を 3 回行った。結果、3 回とも 1 日目の pH は下がったが、その後は pH が上がっていた。そして、血球計算盤を用いて大腸菌の数を測定する実験では、日数が経つにつれて大腸菌の数が増えることがわかった。そのため、大腸菌の数が増えることによって pH が上がり、培地がアルカリ性に変化すると考えられる。これらのことから、乳酸菌と大腸菌は腸内の pH 変化に関与していると考えられる。

JRS-14

麴の有無による乳酸発酵促進の検証

○庄司 空羅, ○石井 沙也加, ○磯 ふみか, ○竹中 咲綺 (茨城県立緑岡高等学校)

Verification of the promotion of lactic acid fermentation with or without Koji

○Sora Shouji, ○Sayaka Ishi, ○Fumika Iso, ○Saki Takenaka (Ibaraki Prefectural Midorioka High School)

近年、食生活の改善に意識を向けることが多くなってきている。その中でも私たちは、ヨーグルトやチーズ等に含まれる乳酸菌に着目した。乳酸菌について調べていく中で、「乳酸菌が体に良い影響を与える」ということを証明する先行研究を多数目にした。そこで私たちは、日々の生活で摂取している乳酸菌を、より効果的に取り入れたいと思った。麴の酵素が糖を、乳酸菌が作用しやすい単糖類まで分解するため、その「糖を分解する働き」によって、乳酸菌の活動を促進することができのではないだろうかと考えた。実験内容としては、先行研究をもとに寒天培地を作成し、ヤクルト、R-1 から乳酸菌を単離する。米麴より単離した麴と乳酸菌をでんぷんの入ったシャーレに入れる。また、乳酸菌を加えていないでんぷんの入ったシャーレ (コントロール) を用意し、そこに加えて、でんぷんの減り具合や乳酸菌のコロニーの数、生成された乳酸の濃度を計測し、比較する。現時点では、乳酸菌の単離までは安定して行えているが、麴の投与方法がまだ確立していないため思考を固めていく必要がある。研究のテーマを「身近で日常的に取り入れている健康食品」から着想を得たため、研究を進める上で乳酸菌や麴は、市販の乳酸菌飲料や米麴から単離させたものを使用している。したがって、日常に密接に関わっている研究だといえるのではないだろうか。また、乳酸菌や麴の種類は多種多様であり、含有する酵素も異なるため、より効果的な組み合わせを探していくこともできると思われる。

JRS-15

納豆菌が失活する時間と温度について

○栗田 康夫, ○野路 大悟, ○竹内 正晴 (大阪府立千里高等学校)

Regarding the temperature and time at which natto bacteria are inactivated

○Yasuo Awata, ○Daigo Noji, ○Masaharu Takeuchi (Osaka Prefectural Senri High School)

まず私達が納豆菌の高温での加熱に対する体制持続の時間を調べた背景・目的は以前納豆を食べる際に暑い白米や味噌汁などに入れて加熱すると納豆が私達にもたらす健康的作用を失うことになるという記述を目にしたからである。しかし納豆の働きとして納豆菌による腸内環境改善(ここでの腸内環境改善は腸内フローラのバランスを改善して便秘の解消や消化の促進に役立つという意味)や納豆独自のタンパク質であるナットウキナーゼによる血栓溶解作用、更にはカルシウムとビタミン K2 を豊富に含むため骨粗しょう症予防にもつながる他沢山の働きを持っている。しかし、加熱で働きを損なうのはタンパク質であるナットウキナーゼだけでありその他納豆菌などについての記述はなかった。よって私達は納豆菌の耐熱性を調べようとした。実験方法としては納豆菌を LB 寒天培地にて 1 日培養したものを更に液体培地で 1 日培養した。納豆菌を培養した液体培地からマイクロビペットで 1ml とり、3D プリンターで作った穴の空いた円盤を浮きのように用いて沸騰水で加熱した。規定時間加熱した納豆菌の入った液体培地をさらに LB 寒天培地にて 1 日培養して様子を見た。結果は 1 分、5 分、10 分、20 分、30 分加熱しても納豆菌が死滅することはいなかった。観察として加熱工程においてピーカーの中の水が常温の状態の時から納豆菌を培養した液体培地を入れていたため納豆菌が芽胞を形成する余裕ができて死滅しなかったと考えた。次の実験では温度の急激な変化による納豆菌の耐熱性を調べたいと考えている。

ICD

感染症・感染対策の現在を学ぶ

司会：明田 幸宏（国立感染症研究所）

ICD-2

ケセラセラで終わらせない薬剤耐性菌対策

○萩谷 英大（岡山大病院・感染症内科）

薬剤耐性菌は古今東西を通して喫緊の課題である。日本は物理的に他国と国境線を共有しておらず、海外からの持ち込みとして薬剤耐性菌が流入する機会が比較的少ないという地の利がある。実際に高度かつ多剤耐性化した薬剤耐性菌の検出率は他の先進国に比べて圧倒的に低く、日本国内で診療・研究をしていると薬剤耐性菌問題を過小評価しがちである。しかし、インバウンド増加に伴い、この状況はいつまでも続かないという確信に近い不安を演者は感じている。本講演では国内外における薬剤耐性菌の現状についてサマライズするとともに、様々な視点で筆者が考える対策（手指衛生・標準予防策・抗菌薬適正使用・人材育成・地域連携の在り方・感染対策向上加算 etc）を共有したい。

ICD-1

感染対策に関する最近の知見アップデート

○関 なおみ（国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所）

新型コロナウイルス感染症流行の経験を踏まえ、日本が取り組んでいる感染症対策の進捗をご紹介します。
2022年12月に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下、感染症法）をはじめとした関係法律が改正され、感染症発生・まん延時における保健・医療提供体制の整備等を充実するため、国の定める「基本指針」に即して、各自治体は「感染症予防計画」や「健康危機対処計画」を策定することとされた。
また2024年7月には「新型インフルエンザ等政府行動計画」が抜本的に改定された。感染症が長期に渡り流行が複数回繰り返す可能性も見据え、全体を3期（準備期、初動期、対応期）に分けて記載するとともに、対策項目も13項目へと拡充し、特に情報収集・分析や検査、ワクチン等について内容を精緻化、偏見・差別等の防止や偽・誤情報対策も含めたリスクコミュニケーションの在り方等も整理された。
国の組織体制としては、2023年9月に「内閣感染症危機管理統括庁」が設置されると同時に、厚生労働省には「感染症対策部」が設置された。2025年4月にはこれらに科学的知見を提供する「新たな専門家組織」として、国立感染症研究所と国立国際医療研究センターを一体的に統合した「国立健康危機管理研究機構（Japan Institute for Health Security, 略称 JIHS）」を設置し、感染症等の情報分析・研究・危機対応、人材育成、国際協力、医療提供等を一体的・包括的に行うこととなった。
感染症発生動向調査については、健康危機に繋がる可能性の高い急性呼吸器感染症に対し、定点サーベイランス事業が2025年4月から始まり、また薬剤耐性菌感染症についても、感染症法に基づく届出基準の見直しが行われることとなっている。

ICD-3

感染管理認定看護師の視点から考える、コロナ禍を経た感染対策

○太田 悦子（大阪大・医・附属病院・感染制御部）

私達は2020年初頭から新型コロナウイルス感染症パンデミックを経験した。当初、感染経路やウイルスの毒性について不明なことが多く、社会全体で混乱した対応が続いた。医療機関においても情報が錯綜する中、院内感染対策の在り方や方針を公的機関が発出するガイドラインやマニュアルを参考に作成し対応していた。新型コロナウイルス感染症は、飛沫感染、接触感染、エアロゾル感染により伝播することがわかってきた。しかし、「エアロゾル感染」という空気感染でも飛沫感染でもない従来あまり使用されなかった定義の感染経路は、医療機関での感染対策に混乱を生じた。そもそも飛沫というものの粒径も均一ではなく、大小不同であることや、飛沫の大きさは事前に把握できるものではない。そこで、発生する飛沫の大きさを処置ケアによって想定し、サージカルマスクまたはN95マスクの使い分けを行うという対策を初めて実施した感染症ではないかと思われる。本来、標準予防策においても、湿性生体物質がどの部分に曝露するか考えて個人防護具（Personal Protect Equipment: PPE）は選択するものである。感染対策は伝播経路の遮断の目的でPPEの装着、手指衛生、隔離を医療者が考えて実践するものであるが、臨床現場では考えて実践ということは大変難しい現状がある。しかし、考えずに行われる感染対策は、本来の目的や意味を失い、患者が不要な隔離を受けたり、必要な診療ケアを受けることができない状況が発生している。特に、新型コロナウイルス感染症対策は、従来からの経路別感染対策とは異なり、「コロナ対策」として実施されていた医療機関が多く、厳重な隔離が継続されていることも少なくない。そして、コロナ禍の隔離や行動制限に伴う、フレイルや認知症などの発生が増加していることも報告されている。感染管理認定看護師の立場で、コロナ禍を経た医療や福祉施設の現場における感染対策について、再考する機会として報告を行う。

ICD-4

多剤耐性菌の検査・遺伝子解析に関する知見アップデート

○原田 壮平 (東邦大・医・微生物・感染症学)

医療機関において多剤耐性菌の感染対策を進める上で、微生物検査室における適切な検査体制の準備が肝要である。近年では多剤耐性菌に対する新規治療薬が複数承認され、それらを耐性機序に応じて使い分ける場合もあるため、多剤耐性菌に特化した特殊検査の準備も求められる。

また、アウトブレイクを疑う状況では菌株の遺伝子解析が重要な分析ツールとなる。遺伝子解析の方法としては、病院の検査室でも実施可能なキット化された手法、従来 **gold standard** とされていたパルスフィールドゲル電気泳動、さらには近年その重要性を高めつつある全ゲノム解析まで多様な選択肢がある。これらの解析方法それぞれの特徴を理解し、適切に使い分けることが求められる。全ゲノム解析については、菌株間の遺伝学的相同性に加え、耐性遺伝子や病原遺伝子の保有状況など幅広い遺伝学的情報が得られるという利点がある。しかし、その一方で、得られた情報の臨床的解釈に悩む場合もある。

本講演ではカルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) を中心に、演者が経験した事例を基に、多剤耐性菌に対する微生物検査室での対応や、アウトブレイク時の遺伝子解析について最近の知見を共有したい。

FL1-01/P1-004

日本の土壌から単離された *Lysobacter claricitrinus* の新菌種提案
○森 亮太, 久綱 僚, 富田 純子, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物学)

Proposal of *Lysobacter claricitrinus* sp. nov., isolated from soil in Japan

○Ryota Mori, Ryo Kutsuna, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【背景・目的】土壌環境には多様な細菌が存在しているが、栄養豊富な培地を使用すると、増殖速度の遅い細菌は速い細菌に競り負けてしまい、培養が難しくなる可能性がある。本研究では、0.1×TSA 培地を使用し、土壌中から *Lysobacter* 属の菌株を単離したので、近縁種株と比較解析を行い分類学的位置を確認した。

【方法】土壌サンプルを 10 倍に希釈した TSA 培地で分離培養後、16S rRNA 遺伝子配列の BLAST 相同性解析を用いてスクリーニングを行い、*Lysobacter* 属菌を単離した。本菌株を 16S rRNA 遺伝子配列による系統学的解析、形態学的解析、生化学的解析、全ゲノム解析を行い、近縁種株と比較した。

【結果・考察】本株は黄色色素を産生し、グラム陰性で、鞭毛を持たず非運動性の好気性桿菌である。また、30℃ および pH7.0 付近で最適に増殖し、一般的な *Lysobacter* 属の細菌と比較してやや遅い増殖速度を示すことが確認された。16S rRNA 遺伝子の系統解析の結果、近縁種株との相同性は 98.1% であった。全ゲノム解析による DNA の塩基配列全長は 3,091,000bp, G + C 含量は 67.8 mol% であった。さらに、近縁種株との OrthoANIu 値は 82.66%, dDDH 値は 27.3% であり、新菌種と判定される基準を満たしていた。生化学試験ではエスクリン加水分解が陽性で近縁種株と違いがみられた。これらの結果から、本株は *Lysobacter* 属の新菌種であると考えられ、*Lysobacter claricitrinus* sp. nov. を提案する。今後は、本株の有用物質産生の可能性についても探求していきたい。

FL1-02/P1-005

国内で市販される食用昆虫由来セレウス菌の毒素関連遺伝子および MLST 解析

○下島 優香子¹, 岡 胡桃¹, 土屋 響己¹, 岡田 由美子², 森田 幸雄³ (¹東洋大・食環境・食環境, ²国立衛研・食管, ³麻布大・獣)

Toxin-related genes and MLST analysis of *Bacillus cereus* from edible insects retailed in Japan

○Yukako Shimojima¹, Kurumi Oka¹, Hibiki Tsuchiya¹, Yumiko Okada², Yukio Morita³ (Dept. Food Life Sci., F. Food Nutr. Sci., Toyo Univ., ²Div. Biomed. Food Res., Nat. Inst. Health Sci., ³Sch. Vet. Med., Azabu Univ.)

昆虫食は優良なたんばく質源として期待されており、安全性評価に関するデータが求められている。我々は国内で市販される食用昆虫の細菌学的実態調査を行い、セレウス菌が分離されることを報告した。今回は食用昆虫由来セレウス菌の毒素関連遺伝子および MLST 解析を実施した。

2023 年に国内のインターネット通販 3 社から購入した冷凍生昆虫 29 検体 (国産品 21 検体, 輸入品 8 検体), 粉末昆虫 10 検体 (輸入品), 加工昆虫 2 検体 (国産品) の計 41 検体中 37 検体 (90.2%) から分離された 47 株を供試した。なお、MYP 寒天培地で定型集落を形成し、羊血液寒天培地で溶血を示す株をセレウス菌とした。セレウリド合成酵素遺伝子 (CRS, TaKaRa), *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK*, *entFM* (Kim et al., 2015) を検出する PCR の結果、CRS は 1 株 (2.1%), *nheA*+*nheB*+*nheC* は 42 株 (89.3%), *hblA*+*hblC*+*hblD* は 31 株 (70.0%), *cytK* は 36 株 (76.6%), *entFM* は 45 株 (95.7%) が陽性であった。1 株はレンチナーゼ遺伝子 (TaKaRa) が陰性で、16SrRNA 解析の結果 *Bacillus cytotoxicus* であった。本株は *cytK* の他、*B. cytotoxicus* に報告される *nhe* variant (Burtscher et al., 2021) が陽性であった。本菌は食中毒事例や粉末昆虫からの分離報告があり、今回は冷凍生昆虫 (オケラ) から分離された。MLST 解析 (PubMLST) の結果、決定された 45 株は ST3326 (新規登録) が 4 株, ST26, ST1668, ST3331 (新規登録) がそれぞれ 2 株でそれ以外は全て異なり、全 39 種の ST 型 (内 20 種は新規登録) に分類された。食用昆虫は嘔吐毒や下痢毒の遺伝子を保有するセレウス菌等が存在すること、MLST 型は既報とは異なる型を含む多様な型を示すことが明らかになった。

FL1-03/P1-008

Upstream Genetic Structures (UGS) とレプリコンタイプを用いたプラスミド構造推定

○宮里 宙来¹, 屋宜 宣慶², 平井 到¹ (¹琉球大・保健・微生物, ²琉球大・保健・生理機能)

Plasmid structure prediction using Upstream Genetic Structures (UGS) and replicon types

○Sora Miyazato¹, Nobuyoshi Yagi², Itaru Hirai¹ (¹Lab. Microbiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus, ²Lab. Clin. Physiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus)

薬剤耐性菌は医療関連施設だけでなく市中や環境からも検出される。薬剤耐性遺伝子は主にプラスミドにより伝播することが知られており、その経路を知ることが薬剤耐性菌の感染制御を考える上で重要である。プラスミドの伝播経路の推定には主に遺伝系統を比較する方法が用いられるが、プラスミドは移送中に変異が入りやすいため ORF (Open reading frame) での推定が困難となる場合がある。当研究室ではこれまでに、薬剤耐性遺伝子の上流構造 (Upstream genetic structures, UGS) を用いた解析法を確立した。しかし、薬剤耐性遺伝子はプラスミド上の一領域に集積して存在することが多く、プラスミド全体の構造推定という点では不十分である可能性がある。そこで本研究では、UGS とプラスミドレプリコンタイプを組み合わせ、より正確にプラスミド配列を推定する方法の確立を目指した。沖縄県内の医療関連機関から検出されたセフォタキシム耐性大腸菌株を、Nanopore シーケンサーを用いて全ゲノム解析し、得たシーケンスリードから薬剤耐性遺伝子の UGS とプラスミドレプリコンタイプを検出した。UGS を検索キーとしてデータベース上からプラスミド配列を抽出し、プラスミドレプリコンタイプによって絞り込み候補配列とした。全ゲノム解析で得られたシーケンスリードを再度アライメントし、候補配列に対するシーケンスリードのカバー率を評価した。その結果、UGS とプラスミドレプリコンタイプを組み合わせた方法を用いると、プラスミド全体の構造を予測できる可能性が示唆された。現在菌株数を増やして検討中であり、その結果も併せて発表する予定である。

FL1-04/P1-012

Virulence-type IV secretion system and cell wall-anchored protein folding structures in CA-MRSA/J

○Tsai-Wen Wan^{1,2}, Lee-Jene Teng², 山本 達男¹ (¹国際医学教育研究センター・疫学ゲノム進化解析部, ²国立台湾大・医)

○Tsai-Wen Wan^{1,2}, Lee-Jene Teng², Tatsuo Yamamoto¹ (¹Dept. Epidemiol. Genomics Evol., Intl. Med. Edu. Research Center, ²Dept. Clin. Lab. Sci. Med. Biotechnol., National Taiwan Univ.)

Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) exhibits phase switching, epidemic skin infections versus severe invasive infections. Molecular mechanisms for the phase switching are not fully understood. In this study, we investigated CA-MRSA/J (ST8/SCC *mecIV*), through genome sequencing, plasmid analysis, protein folding structure prediction, and HEp-2 cell infection assay. CA-MRSA/J possessed conjugative plasmid pWtra, encoding type IV secretion system (T4SS), and non-conjugative p32kb, carrying toxin genes *citA*-*B*-*C*; pWtra/p32kb exhibiting high frequency mobilization. The CA-MRSA/J core-genome encoded large cell wall-anchored (CWA) protein SPJ, with novel folding structures, possibly reinforcing the cell wall compartment. CA-MRSA/J achieved the clinical phase switching through mutations of the virulence-T4SS system pWtra/p32kb and changes of hypervariable SPJ structures. Epidemic skin infection cases had pWtra/p32kb and long SPJ; long SPJ acted as adhesin and T4SS enhanced SPJ adherence. In contrast, a severe iliopsoas abscess case possessed p32kb only and short SPJ (a strong invasion factor). A necrotizing pneumonia case possessed *citA*⁺ (*citB*⁻, *citC*⁻) p32kb mutant and long SPJ, suggesting crucial action of superantigen *CitA* and lung adherence. SPJ (novel class of CWA protein) and pWtra/p32kb (novel virulence-T4SS system) open new research fields.

FL1-05/P1-018

緑膿菌の国内臨床分離株における病原因子に基づくグルーピング

○佐野 隆之¹, 山崎 浩平¹, 北川 浩樹², 今井 一男³, 市村 辰太郎³, 萩谷 英大⁴, 柏本 孝茂¹ (¹北里大・獣医・獣医公衆衛生, ²広島大病院・感染症科/感染制御部, ³埼玉医科大病院・中央検査部, ⁴岡山大病院・感染症内科)

Classification of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* based on virulence genes

○Takayuki Sano¹, Kohei Yamazaki¹, Hiroki Kitagawa², Kazuo Imai³, Shintarou Ichimura³, Hideharu Hagiya⁴, Takashige Kashimoto¹ (¹Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., ²Dept. Infect. Dis., Hiroshima Univ. Hosp., ³Central Lab., Saitama Med Univ. Hosp., ⁴Dept. Infect. Dis., Okayama Univ. Hosp.)

緑膿菌は病原性遺伝子の保有状況により、グループ 1; 孔形成毒素 *exlA* (−), T3SS machinery *pscL* (+), T3SS effector *exoU* (−), グループ 2; *exlA* (−), *pscL* (+), *exoU* (+), グループ 3; *exlA* (+), *pscL* (−), *exoU* (−) の 3 つのグループに分けられる。グループ 2 はホスホリパーゼ A2 活性を持つ ExoU を有しており、本グループに属する緑膿菌に感染した患者では、早期の敗血症リスクが高まることが報告されている。グループ 3 は検出例が少ないものの、代表株を用いたマウス実験系において、ExlA が出血性肺炎を引き起こすことが示され、患者で認められる症状を再現できたとの報告がある。グループ 1 は、グループ 2, 3 以外であり、他のグループと比較して特徴的臨床症状を示さない、いわゆる一般的緑膿菌とされている。以上のように各グループの緑膿菌に感染しているのかを知ることは有益な情報となりうる。本研究では、グルーピングに必要な遺伝子の検出系を確立し、大学病院において血液から分離された緑膿菌 120 株についてグルーピングを実施した。結果、グループ 1 は 82.5%, グループ 2 は 17.5%, グループ 3 は 0% であった。早期敗血症に陥るリスクが高いとされているグループ 2 に属する株が約 2 割の確率で検出され、注意を要すると考えられた。グループ 3 に属する株は検出されず、国内における存在率あるいは感染率が低い可能性が示唆された。今後、血液以外からの分離株も収集し、検体数を増やして調査を継続すると共に、患者情報との照合を進め、各グループにおける重症化率等に違いが認められるか否か解析する予定である。

FL1-06/P1-023

等温核酸増幅法を用いた *Streptococcus intermedius* 検出システムの開発

○芝藤 あす香¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Development of detection system for *S. intermedius* with isothermal nucleic acid amplification assay

○Asuka Shibata¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (¹Dept. Biosci & Bioindust., Fac. Biosci & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】アンギノサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内常在性の目と見レンサ球菌である。この AGS の一構成菌種である *Streptococcus intermedius* は、主要な病原因子としてヒト細胞に特異的な作用を示す細胞溶解毒素である Intermedilysin (ILY) を産生する。この ILY のコード遺伝子を *S. intermedius* のマーカー遺伝子として選択し、核酸増幅法による高感度で迅速な検出システムの構築を目的とした。特に等温核酸増幅法は、迅速性に加え、特別な装置が不要なため簡易検査が可能な点で注目されている。そこで本研究は、ILY を分子標的とした等温核酸増幅法による *S. intermedius* 検出システムの構築を目的とし、検出感度や検出限界を PCR と比較検討した。【方法】検出対象の *S. intermedius* において高度に保存されている ILY のコード遺伝子から、各核酸増幅法に適したプライマーを設計した。核酸増幅反応の鋳型として ILY 遺伝子全長の精製断片および精製ゲノム DNA 等を選択し、各核酸増幅反応を実施して、アガロースゲル電気泳動の結果に基づき、目的断片の増幅性や検出感度を PCR と比較評価した。

【結果・考察】等温核酸増幅法である Recombinase polymerase amplification (RPA) 法と PCR 法を比較すると、検出感度について PCR の方が高い結果が得られたが、RPA は反応時間が大幅に短縮でき、さらに 40°C 程度の一定温度で反応が進行することより、迅速性と簡便性に優れていた。よって、RPA 法による検出システムはオンサイトでの汎用性が高い検査系としての実用化が期待できる。現在、RPA の検出感度や反応特異性を向上させるための検討を進めている。

FL1-07/P1-024

血清中 Ag85B 抗体価検出による結核診断法の有用性評価と最適化

○山崎 智也¹, Desak Nyoman Suria Suametrica Dewi^{1,2}, 吉田 豊¹, 石川 智史^{1,3}, Ni Made Mertaniasih⁴, 尾関 百合子¹, Amina Shaban¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (¹新潟大院・医歯学総合・細菌学, ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³福山市立動物園, ⁴Dept. Microbiol., Sch. Med., Airlangga Univ.)

Evaluation of the usefulness of tuberculosis diagnostic method by detection of Ag85B antibody titer

○Tomoya Yamazaki¹, Desak Nyoman Suria Suametrica Dewi^{1,2}, Yutaka Yoshida¹, Satoshi Ishikawa^{1,3}, Ni Made Mertaniasih⁴, Yuriko Ozeki¹, Amina Shaban¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (¹Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³Fukuyama Zoo, ⁴Dept. Microbiol., Sch. Med., Airlangga Univ.)

現在世界人口の約 4 分の 1 に上ると推定されている結核菌の無症候感染者における結核発症を早期に検出し、治療につなげることが結核菌の感染拡大防止において肝要である。結核菌の感染診断法として利用されている IFN-gamma 遊離試験法 (IGRA) は感染の有無を判別できるが、無症候感染者の発症検知はできない。先行研究において、ヒトおよびゾウにおいて一部結核菌抗原に対する血清中抗体価検出により、結核菌の無症候感染時の発症リスクを検出しうることが示唆された。本研究では結核菌診断候補抗原の Ag85B に着目し、血清中抗体価による活動性結核診断の有用性を確かめるとともに、その方法の最適化を図った。先行研究において、Native 抗原と異なる精製タグ等の余剰の配列を持つ場合、抗体反応を阻害する可能性が示唆された。そこで我々は精製タグをエンテロキナーゼによって取り除くことによって Native 抗原と同一の配列をもつ大腸菌組換え抗原を構築した。この組換え抗原と Native 抗原に対する健康者および結核患者血清中 IgG の反応性を ELISA およびマルチプレックス解析である MAGPIX システムで比較した。タグなしの組換え抗原は結核患者血清において Native 抗原と同等の反応性を示した。大腸菌組換え抗原を用いた診断は Native 抗原と同程度の高い特異度を示した。また WHO により使用が推奨されていない既存の血清診断キットと比較して高い感度を示した。結核菌 Native 抗原と同様の配列をもつ大腸菌組換え抗原はエビトープの構造が共通し、同様の反応性を示すことから、活動性結核患者の検出に有用であると考えられる。

FL1-08/P1-025

Development of anti-*Helicobacter cinaedi* antibody titer assay

○深井 俊宏¹, 吉田 翔¹, 村上 裕輔¹, 佐藤 正樹¹, 青木 沙恵², 林原 絵美子², 荒岡 秀樹³, 齊藤 慈円⁴ (¹栄研化学株式会社, ²感染研・細菌第二部, ³虎の門病院・臨床感染症科, ⁴名市大・東部医療センター・心臓血管外科)

○Toshihiro Fukai¹, Sho Yoshida¹, Yusuke Murakami¹, Masaki Sato¹, Sae Aoki², Emiko Rimbara², Hideki Araoka³, Jien Saito⁴ (¹EIKEN CHEMICAL CO., LTD., ²Dept. Bacteriol. II, NIID, ³Dept. Infect. Dis., Toranomon Hospital, ⁴Dept. Cardiovasc. Surg., Nagoya City Univ., NEMC)

Helicobacter cinaedi is a bacterium that infects the human gut and is associated with infected aortic aneurysms. Diagnostic tools for *H. cinaedi* infection are currently limited to culture-based methods or PCR assays. In this study, we identified target antigens of *H. cinaedi* and developed an antibody titer assay for its detection.

Target antigens were isolated using immunoprecipitation with antibodies generated in mice immunized with whole bacterial cell lysates. The target antigens were identified through proteomic analysis and were subsequently produced using the *E. coli* expression system. An antigen solid-phase ELISA was performed to assess sera from individuals infected with both *H. cinaedi* and *H. pylori*.

Proteomic analysis revealed four target antigens. Among these, the neutrophil-activating protein (NapA) and one other antigen showed significantly higher reactivity in sera from individuals infected with *H. cinaedi* compared to those with *H. pylori*.

These findings suggest that our assay is capable of specifically detecting serum antibodies against *H. cinaedi* target antigens. Based on previous reports and proteomics analysis in this study, these target antigens are likely outer membrane proteins or secreted proteins, potentially associated with antibody response following infection.

FL1-09/P1-026

ケニア・クワレ地区における横断的研究から得られた潜在性結核感染(LTBI)診断に関する知見

○尾関 百合子¹, 山崎 智也¹, Amina Kaboso Saban¹, 立石 善隆¹, 西山 晃史¹, 阿部 透¹, 濱野 真二郎², 松本 壮吉¹ (¹新潟大院・医歯学総合・細菌,²長崎大・熱研・寄生虫)

Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Insights from a Cross-Sectional Study in Kwale, Kenya

○Yuriko Ozeki¹, Tomoya Yamazaki¹, Amina Kaboso Saban¹, Yoshitaka Tateishi¹, Akihito Nishiyama¹, Thoru Abe¹, Shinjiro Hamano², Sohkiichi Matsumoto¹ (¹Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., ²Dept. Paragitol., Nekken, Nagasaki Univ.)

結核は、年間1,000万人が新規に発症し、150万人が死亡する、世界最大級の細菌感染症である。サハラ以南のアフリカ (Sub-Saharan Africa) は、世界で最も結核の発生率が高い地域の一つである。この地域では結核に加えて HIV や寄生虫感染も高頻度で見られ、これらはしばしば重複して発生する。結核には排菌を伴う活動性結核と、感染しても症状が現れない潜在性結核 (LTBI) があり、LTBI 患者の 5-10% が生涯のうちに活動性結核へ移行する。しかし、HIV や寄生虫感染との併存が活動性結核への移行を促進することが知られている。そのため、活動性結核の母体となる LTBI の集団を正確に特定することが必要不可欠である。現行の LTBI 診断法では、結核菌抗原である ESAT6 と CFP10 を用いた IFN-gamma release assay (IGRA) が広く用いられているが、HIV や寄生虫感染が重複する場合、偽陰性が生じるなど、正確な診断が難しいという課題がある。私たちは LTBI の実態を把握し、そのリスク因子を探ることを目的としてケニアのクワレ地区にある 6 校の小学生を対象に調査研究を実施した。具体的には IGRA の標準抗原である ESAT6 や CFP10 に加え、他の結核菌抗原についても IFN-gamma の産生を調査した。また、寄生虫感についても並行して調査を行った。その結果、ESAT6 や CFP10 と非常に強く関連する抗原がみつかり、これらの抗原を併用することで、LTBI 診断の精度が向上する可能性が示唆された。さらに、特定の抗原が寄生虫感染と強く相関していることも明らかとなった。

FL1-10/P1-027

Development and application of PCR-based *Leptospira* serogroup identification for Japanese isolates

○及能 和輝¹, 柿田 徹也², 高部 響介³, 高野 愛⁴, 小泉 信夫³, 下田 宙¹, 早坂 大輔¹ (¹山口大・獣医微生物, ²沖縄衛研・感染症研究センター, ³感染研・細菌第一, ⁴山口大・獣医疫学)

○Kazuki Kiuno¹, Tetsuya Kakita², Kyosuke Takabe³, Ai Takano⁴, Nobuo Koizumi³, Hiroshi Shimoda¹, Daisuke Hayasaka¹ (¹Dept. Micro., Vet. Med., Yamaguchi Univ., ²Inst. Health & Environ., Okinawa Pref., ³Dept. Bacteriol. I, Nati. Inst. Infect. Dis., ⁴Dept. Epi., Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Introduction: *Leptospira* spp. are the causative agents of a zoonotic disease, leptospirosis, and are classified into various serogroups. Although a PCR-based molecular serogroup typing (MST) has been reported by Wenderlein et al., it is uncertain whether this method can be applied to *Leptospira* isolates in Japan. The aim of this study was to develop a MST using multiplex PCR for *Leptospira* spp. isolated in Japan. **Methods:** The results of serogroup identification by microscopic agglutination test and whole genome data for 201 Japanese isolates including eleven serogroups were used in this study. As a result, the MST reported by Wenderlein et al. was not applicable for three serogroups (Autumnalis, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae) on whole genome data. New primers were designed for three serogroups, Autumnalis, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae, based on the sequence of the *rflB* locus. The reported and newly designed primers were evaluated by using DNA extracted from isolates. **Results:** A multiplex PCR for five serogroups including Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae and that for six serogroups including Ballum, Cynopteri, Grippotyphosa, Javanica, Pomona and Pyrogenes successfully amplified target sequences from Japanese isolates. **Conclusion:** We could establish new MST methods using multiplex PCR for Japanese isolates.

FL1-11/P1-028

Streptococcus 属の口腔常在菌が眼感染症リスクに与える影響について

○木村 優那, 渡邊 愛, 角出 泰造 ((株) メニコン)

Effects of oral resident bacteria in the genus *Streptococcus* on risk of ocular infections

○Yuna Kimura, Ai Watanabe, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

オルソケラトロジー (OK) は、内面形状が特殊なハードコンタクトレンズを就寝時に装着し、角膜前面が平坦化することで一時的に近視を軽減させる治療法である。OK レンズ装着時、レンズケースは洗面台で乾燥・保管される場合が多い。先行研究で実使用 OK レンズケースから *Streptococcus* 属の口腔常在菌が複数検出された。その中でも *Streptococcus salivarius* 共存下で結膜嚢常在菌 *Staphylococcus epidermidis* のバイオフィルム (BF) 形成能の増大及び角膜感染症の原因微生物 *Acanthamoeba castellanii* 増殖性の促進が明らかとなった。本研究では、*Streptococcus* 属の口腔常在菌 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis* に着目し、共存による *S.epidermidis* の BF 形成能及び *A.castellanii* 増殖性を評価した。

1. *S.epidermidis* BF 定量評価: *S.epidermidis* 播種後、培養用インサートを介して共存菌と共培養させ、クリスタルバイオレット染色法により、*S.epidermidis* の BF 形成量を定量した。

2. *A.castellanii* 増殖性評価: 共存菌を播種した翌日に *A.castellanii* を播種し、7 日間培養後、*A.castellanii* 数を計数した。

S.mutans および *S.parasanguinis* 共存下において、*S.epidermidis* の BF 形成量は増加し、*A.castellanii* 増殖性も促進した。これまでの結果より、*Streptococcus* 属の口腔常在菌は *S.epidermidis* の BF 形成能や *A.castellanii* の増殖性に影響を与える可能性が示唆された。レンズケースの洗面台での乾燥・保管は、飛沫による口腔常在菌混入により眼感染症起炎微生物増殖の可能性があり、眼感染症のリスクが懸念される。眼感染症を防ぐため、レンズケースの保管場所にも考慮する必要がある。

FL1-12/P1-029

微生物有害情報リスト：学名の変更に対応したリニューアル

○木村 明音, 魚原文, 石田 亜紀子, 黄地 祥子, 中谷 諒介, 仲里 猛留, 市川 夏子 (NITE-NBRC)

Redesigning of the Microorganism Risk Information List to consider changes in scientific names

○Akane Kimura, Aya Uohara, Akiko Ishida, Shoko Ohji, Ryosuke Nakatani, Takeru Nakazato, Natsuko Ichikawa (NITE-NBRC)

微生物を安全に取り扱うには、法令文書やバイオセーフティレベル (BSL) 分類リスト等様々な資料を参照して利用微生物の危険度／有害性を判断しなければならない。一方、次世代シーケンス技術の急速な発展に伴い、微生物のゲノム配列の分類への応用が進展している。さらに真菌については、2012 年の命名規約の改訂により二重命名法が廃止され学名統一の議論が進められており、これらの分類体系の再編成や学名の変更も、微生物の安全性の判断を難しくしている。

NITE は、微生物の安全かつ適切な利用を支援するために、細菌や真菌の散在するリスク情報を一元化したデータベース「微生物有害情報リスト」を公開している。微生物有害情報リストは、微生物の取扱いに関する国内法令や BSL 分類等の出典資料のリスク情報を収集し、種・亜種に指定されたリスク情報 (属・株等に指定されている場合はそれらを含む) を集約して提供している。この中で、真菌のリスク情報を一元化した「真菌リスト」を 2018 年から Excel 形式で公開しており、この度本リストについて、ユーザーの利便性、操作性向上を目的としたリニューアルを予定している。リニューアルでは、真菌の学名データベースである Mycobank などの情報を参照して異名同士の関係に対応付け、出典資料には記載情報がない学名でもその異名が出典資料に記載されている場合には、異名のリスク情報を参照できるように補足記号を記載する予定である。また、Excel のフィルタ機能を用いてこれらの関連する学名の情報をまとめて表示できるように検討を行っている。本発表ではリニューアル内容について紹介する。

FL1-13/P1-030

バンコマイシン耐性腸球菌感染マウスにおけるファージ療法の検討

○小島 新二郎¹, 山下 和可奈^{1,2}, 氣賀 恒太郎¹ (¹感染研・治ワク, ²早大・先進理工・生命医科)

Evaluation of phage therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in mice

○Shinjiro Ojima¹, Wakana Yamashita^{1,2}, Kotaro Kiga¹ (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Sch. Adv. Sci. Engr., Waseda Univ.)

腸球菌はヒトや動物の腸管内に常在するグラム陽性球菌である。近年、術後患者や基礎疾患を持つ患者に対して敗血症や腹膜炎、心内膜炎等の重篤な感染症を引き起こす、バンコマイシン耐性腸球菌（以下VRE）による院内感染が問題となっている。最近では、VREに対して有効とされていたリネゾリドに対する耐性菌も報告され始めており、使用可能な薬剤の選択肢が減少している。そのため、腸球菌感染症は、バクテリオファージを用いたファージ療法の適応が望まれる感染症の一つとなっている。本研究では、腸球菌を対象にファージを採取し、マウス感染モデルを用いて治療効果を比較検討した。腸球菌感染マウス腹膜炎致死モデルにおいて、採取した3種類の異なる科に属する腸球菌ファージの治療効果を比較検討したところ、*in vitro* で溶菌活性の高かった Efm7 ファージが、腹腔内投与、静脈内投与のいずれにおいても、他2種のファージと比較して高い生存率を示し、治療効果が認められた。次に、腸球菌への感染性を高める改変を行い、その治療効果を検討した。腸球菌感染マウス腹膜炎致死モデルにおいて、改変ファージは親株ファージよりも有意に生存率を向上させた。本研究で得られた結果は、VREによる感染症において、治療確度の高いファージ療法を行うための重要な知見を提供する。

FL1-14/P1-033

Evaluation of the anti-obesity effect of *Christensenella minuta* feeding using *Caenorhabditis elegans*

○筑波 叶夢^{1,2}, 谷本 佳彦^{1,2,3}, 中台 枝里子^{1,2,3} (¹大公大院・生科, ²京大院・生命, ³京大・医研研)

○Kaname Chikuba^{1,2}, Yoshihiko Tanimoto^{1,2,3}, Eriko Nakadai^{1,2,3} (¹Grad. Sch. Human Life & Ecology, Osaka Metropolitan Univ., ²Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., ³LiMe. Kyoto Univ.)

Christensenella minuta is an obligate anaerobic gram-negative bacterium that has been reported to be particularly abundant in the intestines of humans with low BMI, suggesting an anti-obesity effect. However, the detailed mechanisms of its interaction with the host are still unclear. In this study, the anti-obesity effects of *C. minuta* were evaluated using *Caenorhabditis elegans* as a model host. One-day-old larvae of wild-type *C. elegans* N2 were reared until 3-day-old using *E. coli* strain OP50, and then divided into OP50 control group, *C. minuta* fed group (Cm), and mixed fed group of OP50 and *C. minuta* (OP&Cm), and their survival were checked and counted daily. Fat accumulation was assessed that N2 larvae were reared on OP50 until 3-day-old and then fed for 3 days in 4 groups: OP50 group, Cm group, OP&Cm group, and a mixed feeding with OP50 and Orlistat (anti-obesity drug) group. Each nematode was stained with Oil Red O stain solution, and quantified the red intensity. As a result, the lifespan of Cm group was significantly shorter than OP50 group, while the OP&Cm group showed no difference compared to OP50 group. Oil Red O staining intensity was significantly reduced in the Cm and OP&Cm groups to the same level as in the Orlistat group compared to OP50 group. These results suggest that *C. minuta* has some detrimental effects and has anti-obesity effects.

FL1-15/P1-034

An investigation into the benefits of *Legionella* to their protist hosts

○渡邊 健太, 清水 隆, 度会 雅久 (山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○Kenta Watanabe, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai (Dept. Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' disease, replicates within protist hosts. Many protist species including *Paramecium* spp. are potential hosts for *Legionella*. However, the advantages in *Paramecium* hosts when they maintain *Legionella* have not been confirmed. In this study, the growth rate, temperature tolerance, and salt tolerance of *Paramecium* maintaining *Legionella* were analyzed, yet no such acquisition of advantages was identified. Meanwhile, phagocytosis was strongly inhibited in *Paramecium* cells fed with *Legionella*, indicating that this relationship can prevent the uptake of harmful organisms. Similar phagocytosis inhibition was observed when *Paramecium* cells were treated with *Legionella* culture supernatant. Even when phagocytosis was inhibited, if live *Legionella* cells were present within the host cells, *Paramecium* did not starve to death. Rather, their cellular numbers exhibited a tendency to increase. These results suggest that *Legionella* has some mechanisms that can nutritionally support the survival of *Paramecium* cells. Although it is difficult to definitively state whether the relationship between *Legionella* and *Paramecium* host is completely mutualistic symbiosis, the data provided the first evidence of a mutualistic relationship between *Legionella* and *Paramecium*.

FL1-16/P1-035

ウェルシュ菌バイオフィーム形成時の細胞外 DNA 放出機構の解析

○安東 剛¹, 尾花 望^{2,3}, 野村 暢彦^{2,4} (¹筑波大・生命地球科学研究群, ²筑波大・MiCS, ³筑波大・医・TMRC, ⁴筑波大・生命環境系)

Analysis of the mechanism of eDNA release during biofilm formation in *Clostridium perfringens*

○Takeshi Ando¹, Nozomu Obana^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,4} (¹Degree. Programs. Life. Earth. Sci., Univ. Tsukuba, ²MiCS, Univ. Tsukuba, ³TMRC, Inst. Med., Univ. Tsukuba, ⁴Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は温度に反応してバイオフィーム形態を変化させて、環境に適応して生存している。宿主体内温度である 37°C では付着型のバイオフィームを形成するのにに対し、外界環境温度の 25°C では粘弾性に富んだベリクル状のバイオフィームを形成し、酸素や抗生物質に対する耐性が向上する (Obana *et al.* (2020) npj biofilm and microbiomes)。ベリクル状バイオフィーム中では細胞外タンパク質 BsaA と細胞外 DNA (eDNA) が細胞外マトリクスとして構造形成に寄与するが、本菌の eDNA 産生機構は明らかになっていない。そこで本研究では、eDNA 産生に関与する遺伝子の同定を目指した。細胞外マトリクス中の eDNA のシーケンス解析の結果、ゲノムの全領域がほぼ均一に検出された。このことより、本菌ではプロファージなどの可動性因子が eDNA 産生に関与する可能性は低いと考えられた。また、細胞外マトリクス中には eDNA のみならず eRNA が多量に検出された。このことより、eDNA 産生は溶菌を介しており、放出された細胞内容物には RNA 分子も含まれていると考えられた。eDNA を放出した細胞の遺伝子発現パターンが eRNA に反映されると予想し、RNA-seq によって eRNA を解析した。その結果、グリコーゲン代謝に関与すると予想される遺伝子群の転写産物が細胞内と比較して細胞外で高度に蓄積していた。これらの遺伝子の破壊株は野生株と同等の生育を示したが、ベリクル状バイオフィームの構造が脆弱になった。以上の結果より、同定した遺伝子群はバイオフィーム構造に寄与する新規遺伝子であると考えられる。また、本菌では糖代謝が溶菌と eDNA 産生に関連する可能性が示唆された。

FL1-17/P1-042

Cross-feeding analysis of *Streptococcus* and *Rothia* isolated from the oral cavity

塙 莊太郎^{1,2}, ○孫 安生², 野口 一馬¹, 大前 堯之¹, 吉川 恭平¹, 松尾 禎之³, 加藤 完⁵, 山根 康嗣⁴, 石戸 聡², 岸本 裕充¹ (¹兵庫医大・医・歯科口腔外科, ²兵庫医大・医・病原微生物, ³関西医大・医・綜研, ⁴兵庫医大・医・病理学, ⁵理研・IMS)

Soutaro Hanawa^{1,2}, ○Aoi Son², Kazuma Noguchi¹, Takayuki Ohmae¹, Kyohei Yoshikawa¹, Yoshiyuki Matsuo³, Tamotsu Kato⁵, Koji Yamanegi⁴, Satoshi Ishido², Hiromitsu Kishimoto¹ (¹Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ³Dept. Inst. Biomedical Science, Kanazawa Med. Univ., ⁴Dept. Pathology, Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ⁵IMS, Riken)

Microbiota commensally inhabit through biological correspondences; so-called cross-feeding. In oral cavity, nearly 750 species of bacteria reside and could maintain oral ecology. Although it has been intensively addressed how pathobionts potentially lead to oral diseases, it is not yet fully understood how oral ecosystem is maintained through interbacterial communication among beneficial symbionts. To address it, we mined beneficial symbiont candidates by comparison of microbiota from healthy volunteers and oral cancer patients and examine possible interaction of beneficial symbiont candidates. Cancer patients showed different index of beta diversity and decreased relative abundance of genera *Rothia* and *Streptococcus* compared with healthy volunteers. In addition, both genera further decreased in cancer patients with cervical metastasis, highlighting them as beneficial candidates in oral cavity. Further mining microbes showing co-occurrence with genus *Rothia* demonstrated genus *Streptococcus* as the candidate with positive fitness impact. These results suggest that *Streptococcus-Rothia* interaction is one of machineries for the maintenance of oral ecosystem.

FL1-18/P1-043

ホスホフルクトキナーゼの欠損は植物抽出液中の大腸菌の増殖能を増大させる

○山口 咲季, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大・院医歯薬・分子生物学)

Phosphofructokinase deficiency enhances growth of *Escherichia coli* in plant extracts

○Saki Yamaguchi, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

大腸菌は生野菜に付着してしばしば食中毒の原因となるが、大腸菌と植物の関係については未だほとんど解明されていない。本研究では、野菜ジュースを原料とした培地 (V8 培地) を用いて、大腸菌の野菜環境中での増殖に関わる遺伝子を探索した。その結果、V8 培地において、ホスホフルクトキナーゼ 1 (PfkA) の欠損株が野生株に比べて高い増殖能を示すことを見出した。さらに、PfkA と PfkA のアイソザイムとして知られる PfkB の二重欠損株 (Δ pfkAB) は pfkA 単欠損株に比べて V8 培地での増殖能が上昇した。また、 Δ pfkAB に対して pfkA もしくは pfkB のどちらかを相補することで V8 培地での増殖能上昇が失われたことから、ホスホフルクトキナーゼ活性の喪失が V8 培地での大腸菌増殖能の上昇をひき起こすことが示唆された。 Δ pfkAB においては、ホスホフルクトキナーゼの基質であるフルクトース-6-リン酸 (F6P) が蓄積し、F6P が機能性 RNA である SgrS を発現誘導していると推定された。 Δ pfkAB において、SgrS の転写促進因子である sgrR を欠損させたところ、V8 培地における増殖能の上昇がみられなくなった。以上の結果から、ホスホフルクトキナーゼの欠損は SgrR の活性化を介して V8 培地での増殖能上昇を引き起こすことが示唆された。LB 培地と比較して V8 培地ではグルコースとフルクトースが多く含まれているため、V8 培地における Δ pfkAB の増殖能の増大には SgrS を介した糖利用能の変化が関わっている可能性がある。

FL1-19/P1-046

Cleavage cascade of the sigma regulator FecR orchestrates TonB-dependent signal transduction

○横山 達彦¹, 宮崎 亮次², 鈴木 健裕³, 堂前 直³, 永井 宏樹¹, 塚崎 智也², 久堀 智子¹, 秋山 芳展⁴ (¹岐阜大・医学系研究科・病原体制御学, ²奈良先端大・バイオ, ³理研・CSRS, ⁴京大・医歯研)

○Tatsuhiko Yokoyama¹, Ryoji Miyazaki², Takehiro Suzuki³, Naoshi Dohmae³, Hiroki Nagai¹, Tomoya Tsukazaki², Tomoko Kubori¹, Yoshinori Akiyama⁴ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, ³CSRS, RIKEN, ⁴Inst. Life Med. Sci., Kyoto Univ.)

TonB-dependent signal transduction is a versatile mechanism widely observed in gram-negative bacteria, coupled with the energy-dependent substrate transport. In the iron acquisition system of *Escherichia coli*, the cytoplasmic membrane-anchored TonB-ExbBD motor complex energizes the TonB-dependent transporter FecA to facilitate ferric citrate uptake. FecA also acts as a ferric citrate sensor, transmitting the signal to the cytoplasmic membrane protein FecR. We previously demonstrated that FecR undergoes three successive cleavage steps, with the final cleavage product targeting the cytoplasmic sigma factor FecI to induce transcription of the *fec* genes. Here, we describe the comprehensive mechanism by which the progression of the FecR cleavage cascade mediates ferric citrate signaling, involving both FecA and TonB. FecR undergoes an initial cleavage by autoproteolysis prior to membrane integration. In the periplasm, the soluble C-terminal domain (CTD) fragment of FecR, co-translocated with the N-terminal domain (NTD) via the Tat system, prevents the second cleavage through its physical interaction with the NTD. TonB-dependent alterations in FecA properties enable FecA to bind the FecR CTD, allowing the ferric citrate signal to release the CTD blockage from the NTD. This release permits the FecR cleavage cascade to proceed, which is essential for inducing *fec* gene expression.

FL1-20/P1-050

Characterization of novel actin-like protein Mad28 encoded in magnetotactic *Thermodesulfobacteriota*

○下茂 梨乃¹, 下重 裕一², 福森 義宏³, 田岡 東^{3,4} (¹金沢大・院・自然科学, ²東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター, ³金沢大・理工・生命理工, ⁴金沢大・ナノ生命)

○Rino Shimoshige¹, Hirokazu Shimoshige², Yoshihiro Fukumori³, Azuma Taoka^{3,4} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ., ³Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ⁴NanoLSI, Kanazawa Univ.)

Magnetotactic bacteria (MTB) synthesize magnetic organelles called magnetosomes. Actin-like MamK cytoskeletal filaments are associated with magnetosomes and organize their positioning. MTB belong to the phyla *Nitrospirota* and *Thermodesulfobacteriota*, which have two actin-like proteins, MamK and Mad28. We searched to understand the molecular features and function of Mad28. At first, we purified *Solidesulfobacillus magnificus* RS-1 Mad28 and MamK are generated polyclonal antibodies. We confirmed expressions and localizations of Mad28 and MamK in RS-1 and *Fundidesulfobacillus magnetotacticus* FSS-1. We confirmed that both MamK and Mad28 were expressed in RS-1 and FSS-1. Immunofluorescence microscopy showed that Mad28 localized in linear structures along the long axis of the RS-1 and FSS-1 cells. Furthermore, to determine whether Mad28 has a similar function with MamK, we expressed either Mad28^{RS-1} or MamK^{RS-1} in the *mamK* deletion mutant of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 and examined whether Mad28 could rescue proper magnetosome positioning that MamK^{AMB-1} maintains. According to live-cell imaging, MamK^{RS-1} could rescue magnetosome positioning, whereas Mad28^{RS-1} expression did not affect magnetosome positioning. These results suggested that Mad28 does not have a function that overlaps with MamK but has an alternative function in MTB belonging to the phylum *Thermodesulfobacteriota*.

FL1-21/P1-052

原子間力顕微鏡を用いたウリ類炭疽病菌の付着器の細胞壁のナノスケール構造計測

○田中 准¹, 宮澤 佳甫^{1,2}, 熊倉 直祐³, 松森 海晴¹, 白須 賢³, 福岡 剛士^{1,2} (¹金沢大・院・自然科学, ²WPI-NanoLSI, ³理化学研究所)

Nanoscale AFM measurement of cell wall of *Colletotrichum orbiculare*

○Jun Tanaka¹, Keisuke Miyazawa^{1,2}, Naoyoshi Kumakura³, Kaisei Matsumori¹, Ken Shirasu³, Takeshi Fukuma^{1,2} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²WPI-NanoLSI, ³RIKEN)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中で微生物表面構造を直接観察できる手法である。近年、グラム陽性菌のペプチドグリカン層 (Nature, 2020) やグラム陰性菌の外膜 (PNAS, 2021) を 10-30 nm 程度の空間分解能で可視化した例が報告されており、AFM を用いた微生物表面構造解析が注目されている。一方で、細胞壁における原子レベル AFM 構造観察は達成されておらず、空間分解能の向上が求められている。そこで、我々は AFM を用いた微生物の細胞壁の原子スケール構造解析手法の開発を目指している。

本研究ではウリ類炭疽病菌の付着器をモデル系として扱った。ウリ類炭疽病菌は、植物細胞の表面に付着した孢子から感染の専門細胞である付着器を分化し、付着器が発生する極めて高い膨圧により硬い植物表面に穴を開けて植物細胞に侵入する。付着器の細胞壁は水分子より大きな分子を通さない直径 1 nm 程度の細孔を持つ半透膜として機能し、浸透圧により内部に水分子を取り込むことで膨圧を形成する (PNAS, 1991; Nature, 1997)。しかしながら、この細孔を可視化する技術はこれまで報告されていない。

そこで我々は、AFM を用いて付着器の細胞壁を観察し、内側に半透膜として機能しうる高密度の充填構造を確認した。一方で、本実験で用いた AFM (NanoWizard 4, Bruker) では原子レベルの計測は達成されておらず、直径 1 nm 程度の細孔の可視化には至っていない。今後は、これを可視化するために、我々が独自に開発している超解像液中 AFM 技術を用いて細胞壁の原子スケール構造解析に取り組む。これにより、細胞壁内部で水分子の半透膜をどのように形成して強固な膨圧に耐えるのか、その詳細を構造学的に明らかにする。

FL1-22/P1-056

Streptococcus mutans が放出する膜小胞 (MV) が歯科矯正力をかけた際の骨吸収に与える影響についての研究

○松浦 孝将¹, 根岸 慎一¹, 泉福 英信² (¹日本大松戸・歯・歯科矯正, ²日本大松戸・歯・感染免疫)

Effects of membrane vesicles released by *S.mutans* on bone resorption during orthodontic force

○Kosuke Matsuura¹, Shinichi Negishi¹, Hidenobu Senpuku² (¹Dept. Orthodontics., Sch. Dent., Nihon Univ. Matsudo, ²Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Nihon Univ Matsudo)

口腔内には 700 種類を超える細菌が存在するため、矯正歯科治療を行う際に口腔細菌の影響を受ける可能性が高い。中でも *Streptococcus mutans* は歯表面にバイオフィームを形成し矯正歯科治療中に齲蝕を発生させ、治療の障害になることがある。近年、*S. mutans* が放出する膜小胞 (MV) がバイオフィーム形成に大きく関わる事やワクチン抗原として有用であることが明らかになった。MV は抗原性が高くナノサイズであることから歯根膜へ侵入し免疫原性を発揮する可能性がある。そこで本研究では歯科矯正力による骨及び歯根吸収に関して *S. mutans* の MV がどのように影響を与えるか明らかにするために、歯科矯正力をかけた際のこれらの関連サイトカインである IL-6 の増加が *S. mutans* の MV の添加によってどう変化するか検討を行った。荷重実験：歯根膜細胞を 100 mm dish で 10%FBSaMEM により培養後、荷重をかけない群 (NC), 直径 80 mm MICRO COVER GLASS を乗せる群 (PC), ガラスの上に分銅 60 g (1.0g/cm²) を荷重する群, 200g (4.0g/cm²) を荷重する 4 群に分けた。さらにそれぞれの群を二つに分け、片方の dish には MV を 0.2µg/ ml 加えた。1%FBSaMEM により 20 時間培養後、培養上清を採取した。これらの試料における IL-6 の分泌量を、Western blotting と ELISA を行い測定した。対照群として *S. sanguinis* の MV を加えて同一の実験を行った。*S. mutans* の MV を加えた群は、IL-6 の濃度が NC, PC および荷重のみの群よりも有意に高かった。しかし *S. sanguinis* の MV は荷重をかけても IL-6 の濃度に変化はなかった。これらのことから、歯科矯正力をかけた際 *S. mutans* の MV の影響で骨及び歯根吸収が増強される可能性があることが考えられた。

FL1-23/P1-058

Unraveling Biofilm Initiation through Active Matter Physics and Microfluidics Engineering

○横山 文秋, 竹内 一将 (東大・理・物理)

○Fumiaki Yokoyama, Kazumasa Takeuchi (Dept. Phys., Sch. Sci., UTokyo)

When do bacterial cells form a biofilm, and where does it start within a population? Understanding the entire biofilm formation process is not only of biological interest but also crucial for its regulation. While much is known about the pre-biofilm and maturation phases, where cell attachment and extracellular matrix production play key roles, the initial steps of structural design in biofilm formation remain poorly understood. We show that active matter physics offers a new perspective on biofilm initiation, where bacterial cells begin producing extracellular matrix to rigidify their structure and adopt vertical alignment as the first step in forming a 3D biofilm. Active matter physics studies the collective behavior of energy-consuming particles, such as bacterial cells, which display activities like locomotion and proliferation with orientational order. Using *Escherichia coli* confined in a microfluidic device, we found that spatial matrix production aligned with cell orientation patterns. By altering the microfluidic confinement structure, we controlled these orientation patterns and localized matrix production. Our findings suggest that bacterial cells accumulate at specific points defined by orientation and experience mechanical stress due to crowding, which triggers extracellular matrix production to initiate biofilm formation.

FL1-24/P1-064

ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンの細胞壁結合部位の機能解析

○白神 望夢¹, 青野 りよ², 成谷 宏文³, 松永 望⁴, 関谷 洋志⁵, 玉井 栄治⁵, 片山 誠一⁴ (¹岡山理科大学・理工・自然科学, ²香川県立保健医療大・臨床検査, ³十文字学園女子大・人間生活学・食品開発学科, ⁴岡山理科大・理・臨床生命科学, ⁵松山大・薬・感染症学)

Functional analyses of the cell wall-binding domain of autolysin in *Clostridium perfringens*

○Miyu Shiraga¹, Riyo Aono², Hirofumi Nariya³, Nozomu Matsunaga⁴, Hiroshi Sekiya⁵, Eiji Tamai⁵, Seiichi Katayama⁴ (¹Dept. Natural Sci., Grad. Sch. Sci. and Technol., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. of Health Sci., ³Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ., ⁴Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ⁵Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ.)

自己溶解酵素 (オートリシン) は、ペプチドグリカンを分解する酵素であり、細菌の細胞分裂に必須の酵素である。ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、ヒトにガス壊疽と食中毒を起こす偏性嫌気性芽胞細菌であり、オートリシンである Acp が細胞分裂に大きく関与していることが知られている。Acp は、シグナルペプチドと 10 個の SH3 サブドメイン (CWB) からなる細胞壁結合ドメインと N-アセチルグルコサミダーゼドメイン (AcpCD) からなる分子量 120 kDa の酵素である。我々は、Acp の 3 番目と 4 番目の CWB の間で切断された 7 つ CWB を持つ Acp (95 kDa) が隔壁および極に局在すること、CWB が無い AcpCD を持つ菌では細胞分裂に異常をきたし菌体が長くなることを明らかにしてきた。本研究では、Acp の機能に CWB がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。さまざまな長さの CWB を持つ Acp の遺伝子をキシロース誘導型プロモーターを持つ発現ベクターにクローニングし、*acp* 遺伝子欠失株 (NH13 *acp::erm*) に形質転換した。0.05%キシロース存在下において、これらの遺伝子を発現させ菌体の長さを測定した。その結果、5 つの CWB を持つ Acp (6-10 CWB+CD) は完全な Acp (1-10 CWB+CD) とほぼ同じであったが、2 つの CWB しか持たない Acp (9-10 CWB+CD) では長くなっていた。CWB の数がある一定以上少なくなると細胞分裂に異常をきたすことから、CWB の数が Acp による細胞分裂に影響を与えることが示された。

FL1-25/P1-069

TsrA-mediated gene regulation in *Vibrio parahaemolyticus*

○Tan Paramita Wibowo Sutanto, Andre Pratama, 石井 英治, 飯田 哲也, 松田 重輝 (阪大・微研・細菌感染)

○Tan Paramita Wibowo Sutanto, Andre Pratama, Eiji Ishii, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda (Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ.)

Nucleoid-associated proteins (NAPs) in bacteria play important roles not only in chromosome organization but also in modulating virulence gene expression. The best-studied NAP is the histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS), which often functions in concert with co-regulators. We have reported that H-NS regulates virulence gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*, a major cause of seafood-borne gastroenteritis. TsrA, a small protein conserved among *Vibrio* species, has been implicated as a co-regulator of H-NS in *V. cholerae* even without a DNA-binding motif, but remains poorly characterized. Here, we show the negative regulatory role of TsrA for virulence gene expression in *V. parahaemolyticus*. In our transcriptome analysis, genes with increased expression in the *tsrA*-deleted strain compared to the parental strain RIMD2210633 were exclusively located in the pathogenicity island region. Further studies are underway to elucidate the detailed mechanism of TsrA regulation. In this poster presentation, I would like to discuss the regulatory mechanism of TsrA and how it compares to H-NS in *V. parahaemolyticus*.

FL1-26/P1-072

VirR/S, VR-RNA 欠損ウェルシュ菌における phased A-tracts の機能

○城 愛未¹, 松井 佐弥², 橋川 直也³, 佐藤 日南太², 相原 一欽², 田中 千春², 成谷 宏文⁴, 松永 望³, 片山 誠一³ (¹岡山理科大学・理工・自然科学, ²岡山理科大学・理・臨床生命科学, ³岡山理科大学・理・臨床生命科学, ⁴十文字学園女子大・人間生活学・食品開発)

Function of phased A-tracts on α -toxin gene expression of *Clostridium perfringens* *virRS* *vr* mutant

○Manami Jou¹, Saya Matsui², Naoya Hashikawa³, Hinata Sato², Kazuyoshi Aibara², Chiharu Tanaka², Hirofumi Nariya⁴, Nozomu Matsunaga³, Seiichi Katayama³ (¹Dept. Natural Sci., Grad. Sch. Sci. and Technol., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., ³Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ⁴Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ.)

ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は複数の毒素を産生する。その中の一つ α 毒素 (ホスホリパーゼ C) は、ガス壊疽の原因毒素として知られている。 α 毒素遺伝子(*plc*)の発現は、*vr* 遺伝子がコードする small RNA 分子である VR-RNA を介して二成分制御系である VirR/S によって制御されている。一方、 α 毒素遺伝子(*plc*)プロモーターの上流には、5 から 6 個のアデニンが連なった A-tracts が 3 つ周期的に現れる phased A-tracts (3A) が存在する。この配列によって低温依存的に *plc* 遺伝子の発現が促進されることが *in vitro* で明らかになっている。phased A-tracts の機能を明らかにするために、 Δ *vr* 変異株、および phased A-tracts を A-tracts が無い配列に置換した株 (0A) を作製した。これらの変異株の α 毒素 (PLC) 産生と *plc* 遺伝子発現量を調べると、HN13 Δ *vr* /pJIR418(3A)と HN13 Δ *vr* /pvr(3A)の両方で、*plc* 遺伝子の転写レベルは低温依存的に有意に上昇した。0A 株では、低温依存的な発現促進は認められなかった。以上のことから、phased A-tracts は *in vivo* においても *plc* 遺伝子の発現を低温依存的に促進していることが示された。さらに二成分制御系 VirR/S の影響を全く受けない HN13 Δ *virRS* Δ *vr* 変異株を作製し、その 3A 株、0A 株を、in-frame deletion 法を用いて作製した。これらの株で *plc* 遺伝子の転写レベルの変化を調べた。

FL1-27/P1-078

Phage Displayed Peptides: Exploring Cancer Specificity and Therapeutic Potentials

○Varsha Rani, Myat Thu, Vivekanandan Palaninathan, Srivani Veeranarayanan, Yoshifumi Aiba, Tan XinEe, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Varsha Rani, Myat Thu, Vivekanandan Palaninathan, Srivani Veeranarayanan, Yoshifumi Aiba, Tan XinEe, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Phage display has emerged as a powerful platform for targeted cancer therapeutics. Cancer is a serious illness because of its severity and tendency to recur. Unlike chemotherapy and radiotherapy, which are often limited by systemic toxicity and non-specificity, phage-displayed peptides offer high specificity and minimal toxicity by targeting dysregulated and overexpressed receptors on cancer cells. In this study, targeting-peptide sequences were engineered into the coding regions of phage capsid protein genes, allowing the display of targeting peptides on phage capsids with enhanced specificity. The targeting efficiency of these displayed peptides was evaluated in vitro using cancer cell lines (MCF-7 and HeLa) alongside normal cell lines. Biocompatibility, cytotoxicity and immunogenicity of the engineered phages were analyzed using hemocompatibility assay, cell viability assay (prestoblu method and live/dead cells imaging by confocal microscopy), and cytokine release profiles in THP-1-derived macrophages. Although these phage-displayed targeting peptides do not directly kill tumor cells, they modulate the tumor microenvironment by triggering favorable anti-tumor responses. The specificity, versatility, cost-effectiveness, and reduced systemic toxicity of phage display technique position it as a potential tool for revolutionizing current cancer therapeutic options.

FL1-28/P1-079

Engineering of Phage capsid with antibiofilm enzyme targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

○Esakiraj Palanichamy, 渡邊 真弥, Geoffrey Peterkins Kumwenda, 川口 智史, 崔 龍洙 (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Esakiraj Palanichamy, Shinya Watanabe, Geoffrey Peterkins Kumwenda, Tomofumi Kawaguchi, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium and a common cause of nosocomial infections such as pneumonia and cystic fibrosis especially in immunocompromised patients. Biofilm formation is a crucial initial step of pathogenesis, comprising macromolecules such as polysaccharides, proteins, lipids, and nucleic acids secreted by the bacteria. This matrix facilitates bacterial attachment to tissues, promoting further disease progression. The biofilm matrix also reduces antibiotic penetration, making infections difficult to treat. Enzymes that target biofilm macromolecules, especially polysaccharides, offer a promising approach to combating infections. This study aims to engineer *P. aeruginosa*-specific phage capsids that carry glycoside hydrolase enzyme to target the polysaccharide component of the biofilm. Preliminary experiments showed that glycoside hydrolase enzyme can inhibit the biofilm formation by 35-45% in the laboratory strain *P. aeruginosa* PAO1. Based on this, we constructed and purified a phage capsid carrying the glycoside hydrolase enzyme. This engineered phage capsid effectively inhibit the biofilm formation by 45-50% in *P. aeruginosa* PAO1 within 16 hours, compared to phage lacking the glycoside hydrolase. This study highlights the potential of enzyme-based phage engineering for targeting key components of pathogenic biofilms.

FL1-29/P1-081

Understanding Bacteriophage Internalization Kinetics in Mammalian Cells

○菅野 貴史, Veerananarayanan Srivani, 相羽 由詞, 宮永 一彦, Tan XinEe, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Takashi Sugano, Veerananarayanan Srivani, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyana, Tan XinEe, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Dept. Infection & Immunol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophages (phages) hold great potential as novel gene delivery vectors for medical applications due to their numerous advantages. Despite extensive research, the behavior of phages within human cells remains poorly understood. While it has been established that phages can be internalized by mammalian cells, their intracellular dynamics have not yet been fully elucidated. Gaining such insight is crucial for advancing phage-based applications. In this study, we investigated the dynamics of internalized phages within mammalian cells using two types of quantitative analysis: PFU (Plaque-Forming Unit) assay to count viable phage particles, and qPCR to quantify phage genome copies. Notably, the qPCR results were higher on average than those from PFU assay, which can be attributed to phages undergoing capsid degradation via the endo/lysosomal pathway, rendering them non-viable and thus undetectable by PFU assay. Since qPCR quantifies the phage genome, it remains effective even after capsid degradation. In conclusion, our study demonstrated that qPCR is a more suitable method for quantifying internalized phage numbers compared to PFU methods. A comprehensive understanding of phage dynamics within cells necessitates further investigation, including studies involving diverse phage types, cell types, cell lines, and endosomal inhibition pathways.

FL1-30/P1-083

新規ウェルシュ菌構成的発現ベクターの構築とキシラン分解酵素遺伝子の探索

○小泉 ありさ, 内山 奈奈香, 加藤 史帆, 森山 龍一, 宮田 茂 (中部大・院・応用生物)

Construction of novel expression vectors for *C. perfringens* and screening of xylan-degrading enzymes

○Arisa Koizumi, Nanako Uchiyama, Shiho Kato, Ryuichi Moriyama, Shigeru Miyata (Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】化石燃料源に代わる選択肢の一つとして水素の生物的生産が注目されている。ウェルシュ菌は、ヘミセルロース利用能はないが、比較的 aerotolerant で増殖能が高く、水素生産性の高い菌である。本研究では、ヘミセルロースの主要成分であるキシランを効率的に分解し、水素生産可能なウェルシュ菌の構築を目的とし、キシロース利用能の付与とキシラン分解酵素の探索を試みた。

【方法・結果】キシロース利用能を付与するために、*Clostridium beijerinckii* のキシロース利用オペロンを、ウェルシュ菌の θ 毒素遺伝子と置換した。得られた置換株をキシロース含有培地で培養した結果、野生株と比較して高い増殖性と水素生産性を示した。次に、ウェルシュ菌で高い発現量と酵素活性を示すキシラン分解酵素遺伝子をスクリーニングするために、当研究室で開発した各種ウェルシュ菌発現ベクターに、*C. acetobutylicum* 及び *C. cellulolyticum* 由来の候補遺伝子のクローニングを試みた。その結果、一部の分泌シグナルを有する酵素遺伝子は、T7 プロモーター下流にはクローニングできたが、構成的発現ベクター pCC11N にはクローニングできなかった。大腸菌で発現するためだと考えられたため、pCC11N のフェレドキシン・プロモーター下流に *lac operator* 配列を挿入した新規構成的発現ベクター pCC26 を構築した。pCC26 には、pCC11N にクローニングできなかった *C. acetobutylicum* のエンドグルカナーゼ遺伝子がクローニングでき、得られたプラスミドでウェルシュ菌を形質転換した結果、酵素の分泌生産に成功した。現在、キシランから直接水素生産可能な菌株の構築を目指して、キシロシダーゼ遺伝子の探索を進めている。

FL1-31/P1-086

Growth history under starvation influences subsequent reproduction in a clonal bacterial microcolony

○高野 壮太郎^{1,2}, 梅谷 実樹^{3,4,5}, 中岡 秀憲⁶, 宮崎 亮^{2,7,8} (¹理研・BRC・統合情報, ²産総研・生物プロセス, ³東大院・総合文化, ⁴東大・複雑系生命システム研究センター, ⁵東大・生物普遍性研究機構, ⁶徳島大・先端研究推進センター・バイオイメージング, ⁷筑波大・生命環境系, ⁸産総研・CBBD-OIL)

○Sotaro Takano^{1,2}, Miki Umetani^{3,4,5}, Hidenori Nakaoka⁶, Ryo Miyazaki^{2,7,8} (¹IBID, BRC, RIKEN, ²Bioprod. Res. Inst., AIST, ³Dept. Basic Sci., Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo, ⁴Res. Center for Complex Syst. Biol., The Univ. of Tokyo, ⁵UBI, The Univ. of Tokyo, ⁶Dept. Optical Imaging, Adv. Res. Promotion Center, Tokushima Univ., ⁷Fac. Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁸CBBD-OIL, AIST)

In natural environments including biofilms, most microbial cells barely receive nutrients, forcing them to be in a slow- or non-growing state. How quickly they can resume growth upon an influx of new resources is crucial to occupy niches. Isogenic microbial populations usually harbor only a fraction of cells with rapid growth resumption; however, the links between physiological characteristics and timing of growth resumption in individual cells are not well characterized yet. Here, we tracked the growth of individual *Escherichia coli* cells in microcolonies under fluctuating nutrient conditions using a microfabricated device. Shifting from high- to low-nutrient conditions caused stalling of cell growth with few cells continuing to divide extremely slowly, a process which was dependent on lipid turnover. Resuming high-nutrient inflow after low-nutrient conditions resulted in cells resuming fast growth, but with different lag times. Cellular genealogy and spatiotemporal analysis indicated the lag time was contingent on the growth history during low-nutrient conditions rather than intercellular interactions and thus inherited phenotype. Our study demonstrates the impact of epigenetic inheritance, growth history of individual cell, on emergence of rapid growing subpopulation, further implicating its role in the life cycle of bacterial population residing as biofilms.

FL2-01/P1-091

サルモネラは、マグネシウム飢餓時に低分子膜タンパク質 MgtU を介して細胞死を誘導する

○岩館 佑未, James Slauch (イリノイ大・分子細胞生物・微生物)

Salmonella induces cell death through a small membrane peptide MgtU under low Mg²⁺ stress

○Yumi Iwade, James Slauch (Dept. Microbiol., MCB, U. of I.)

サルモネラは主要な食中毒原因菌のひとつであり、マクロファージ内で増殖する能力を持つため、重篤な全身性感染症を引き起こす。サルモネラはマクロファージのファゴソームに侵入するとパーシスターの形成を誘導するが、その誘導機構等についてはよくわかっていない。これまでに我々は、ファゴソーム内でサルモネラが直面するマグネシウム飢餓に着目し研究を進めたところ、マグネシウム飢餓における生存には誘導性マグネシウム輸送体またはポリアミン合成のいずれかが必須であることを明らかにした。これらの両方を欠損した $\delta synth$ $\delta mgtA$ $\delta mgtB$ 株は、マグネシウムが枯渇した培地への移行時に急激な生存率の低下を示す。本研究では、この細胞死の分子機構の解明を目的とし、抑制変異株を単離した。その結果、低分子膜タンパク質 MgtU、マグネシウム飢餓に応答する PhoPQ 二成分制御系、または RNase III を不活性化する変異が、 $\delta synth$ $\delta mgtA$ $\delta mgtB$ 変異株の生存率の低下を抑制することを明らかにした。これらの結果と知見より、 $\delta synth$ $\delta mgtA$ $\delta mgtB$ 変異株では、マグネシウム飢餓時に MgtU が過剰産生され細胞死が起こることが示唆された。また、半許容のマグネシウム濃度下では、MgtU 依存的な増殖の遅延と抗生物質耐性の上昇が認められた。これは、マグネシウムが適度に枯渇した環境では、MgtU は集団レベルでの適応力を高める可能性を示唆した。現在、MgtU が細胞死を引き起こす分子機構と、野生株における MgtU の振る舞いと役割、集団レベルでの適応力における MgtU の役割を解明することに焦点を当て、研究を行なっている。

FL2-02/P1-104

肺炎球菌は複数のプラスミノーゲン結合タンパク質を発現しプラスミンへの変換を促進する

○安井 惟人^{1,2}, 平山 悟¹, 土門 久哲^{1,3}, 寺尾 豊^{1,3} (¹新潟大・院医歯・微生物, ²新潟大・院医歯・歯周, ³新潟大・院医歯・高口研セ)

S. pneumoniae expresses multiple plasminogen-binding proteins to convert plasminogen into plasmin

○Yoshihito Yasui^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Hisanori Domon^{1,3}, Yutaka Terao^{1,3} (¹Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ²Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ³Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【目的】 *Streptococcus pneumoniae* の病原因子は主に *in vitro* で同定されてきた。本研究では、感染時に生体内で発現する同菌のタンパク質を同定するため、感染モデルマウスの肺胞洗浄液を採取して *in vivo* 定量 MS/MS 解析に供し、機能解析を実施した。

【方法と結果】 *S. pneumoniae* 感染マウスの気管支肺胞洗浄液を定量 MS/MS 解析し、同菌タンパク質 15 種を同定した。そのうち 6 種はヒトプラスミノーゲン (Plg) 結合能を有すると報告されている。そこで、感染関連の機能が未解明である他の 9 種について、Plg との結合性を解析した。 *Brevibacillus* 及び大腸菌発現系により各タンパク質の組換え体を作製し、Far-Western blotting と Biacore 解析を通じて、SufC, AtpD, Vex3, Fba の 4 種が Plg に結合することを明らかにした。Plg は組織型 Plg 活性化因子 (tPA) によってプラスミンに変換されるが、この変換は SufC, AtpD, Vex3, Fba の添加量依存的に促進された。また、*S. pneumoniae* の自己溶菌酵素の遺伝子欠失株を用いて菌体表層画分を Western blotting により解析すると、野生株に比較して欠失株では SufC の検出量が少なかった。

【考察】 SufC, AtpD, Vex3, Fba の Plg の機能解析の結果、感染マウスの *in vivo* サンプルから同定した 15 種のタンパク質のうち、10 種が Plg 結合能を有することが示された。これらタンパク質の多くは菌体内に存在するが、自己溶菌に伴い菌体外へ放出され、一部は SufC のように菌体表層にも局在することが示唆された。*S. pneumoniae* は菌体表層に複数の Plg 結合タンパク質を局在させ、宿主の Plg を結合させるとともにプラスミンへの変換を促進し、プラスミンを組織侵入や免疫回避に活用する可能性が考えられた。

FL2-03/P1-107

アフリカツメガエルを用いたヒト病原性細菌感染モデルの確立

○栗生 綾乃¹, 石川 一也¹, 土屋 晃介², 古田 和幸¹, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬 (薬)・分子生物学, ²金沢大・がん進展制御研・免疫炎症制御)

Establishment of an infection model of human pathogenic bacteria using *Xenopus* frog

○Ayano Kuriu¹, Kazuya Ishikawa¹, Kohsuke Tsuchiya², Kazuyuki Furuta¹, Chikara Kaito¹ (¹Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Okayama Univ., ²Div. Immunol. Mol Biol., Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ.)

細菌の病原性発現機構とそれに対抗する宿主動物の免疫システムを理解するためには、感染モデル動物を使用した感染実験が必要不可欠である。感染実験に頻繁に利用されるマウスなどの哺乳動物は、倫理面とコスト面の問題から、多数の個体数を扱うことが困難である。本研究では、多数の個体数を扱うことが可能で、免疫システムがヒトと比較的近いアフリカツメガエルについて、ヒト病原性細菌の感染モデル動物として利用できるか検討を行った。黄色ブドウ球菌、緑膿菌、リステリア・モノサイトゲネスの腹腔内注射により、菌量依存的にアフリカツメガエルの生存率が低下した。黄色ブドウ球菌および緑膿菌によるアフリカツメガエルの生存率の低下は、それぞれの細菌株に有効な抗菌薬を投与することで抑制された。さらに、黄色ブドウ球菌の病原性に関わる *agr* 領域と *cvfA* 遺伝子、ならびにリステリア・モノサイトゲネスの病原性に関わる *LIPI-1* 領域の各欠損株は、アフリカツメガエルに対する病原性が低下していた。アフリカツメガエルにおける黄色ブドウ球菌の体内分布を検討したところ、腹腔内注射後 30 分の時点で、血液、肝臓、筋肉において黄色ブドウ球菌が検出され、死亡時刻までそれぞれの臓器における細菌数が維持されていた。以上の結果から、アフリカツメガエルはヒト病原性細菌の病原性遺伝子の評価や抗菌薬の有効性評価に使用可能な感染モデル動物であると考えられる。本感染モデルは腹腔から全身へ細菌が拡散する敗血症を模擬していると考えられ、敗血症における細菌と宿主の相互作用の研究において有用である。

FL2-04/P1-110

Prevotella intermedia suppresses the release of IL-1 β

○笠井 満知子¹, 高濱 みゆき¹, 李 智媛¹, 庄子 幹郎², 内藤 真理子², 鈴木 敏彦³, 長谷部 晃¹ (¹北大・院・歯・微生物学, ²長崎大・歯・口腔病原微生物学, ³東京科学大・医歯・細菌感染)

○Machiko Kasai¹, Miyuki Takahama¹, Ji-Won Lee¹, Mikio Shoji², Mariko Naito², Toshihiko Suzuki³, Akira Hasebe¹ (¹Microbiology, Dept. Oral Pathobiological Science, Fac. and Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ., ²Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sci., ³Dept. Bact. Pathogenesis, Science Tokyo)

Pro-inflammatory cytokine IL-1 β plays an important role in the progression of periodontitis. Therefore, the inflammasome, a mechanism that regulates the maturation and release of IL-1 β , is thought to be a key factor in the pathogenesis of periodontitis. The increase in IL-1 β is accompanied by the proliferation of periodontal pathogens, in periodontitis sites, and it has been suggested that periodontal pathogens trigger the activation of the inflammasome, which leads to the release of IL-1 β . *Prevotella intermedia* is one of the pathogens involved in human periodontitis. However, little is known about the relationship between *P. intermedia* and the inflammasome. In this study, we investigated the effect of *P. intermedia* on the inflammasome using immortalized mouse macrophages *in vitro*. First, cells were stimulated with *P. intermedia* after priming with *E. coli*-derived LPS. It was found that there was no effect of *P. intermedia* on the amount of IL-1 β and LDH induced in the cell culture supernatants. Next, cells were pre-treated with *P. intermedia*, primed with LPS and then stimulated with NLRP3 agonist. The amount of IL-1 β in the culture supernatant was reduced in *P. intermedia* treated cells compared to non-treated cells. Thus, *P. intermedia* was found not to cause IL-1 β production but rather to suppress it. This may suggest that *P. intermedia* has anti-inflammasome activity.

FL2-05/P1-113

Aggregatibacter actinomycetemcomitans-derived EVs promote pancreatic cancer malignancy

○山口 雄大¹, 塩田 正之², 中尾 龍馬¹, 安部 公博¹, 明田 幸宏¹ (¹国立感染症研究所・細菌第一部・第六室, ²大阪公立大・医・分子制御生物学)

○Takehiro Yamaguchi¹, Masayuki Shiota², Ryoma Nakao¹, Kimihiro Abe¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Mol. Bio. Med., Grad. Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ.)

Infection of periodontopathic bacteria, especially *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), correlates with pancreatic cancer (PAC) development. However, the detailed mechanisms by which these bacteria induce PAC development remain unclear. This study focused on the periodontopathic bacteria-derived extracellular vesicles (EVs), which may mediate the mechanism, and investigated the role of the EVs in the malignant transformation of PAC cells. When comparing different EVs from Pg, Fn and Aa, Aa-derived EVs (Aa-EVs) were found to induce cellular migration and invasion via cytolethal distending toxin (CDT)-mediated DNA damage. Aa-EVs-derived CDT also enhanced the activation of ERK1/2 and Akt, downstream of the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway, but not that of SMAD2/3, downstream of the transforming growth factor beta signaling pathway. Inhibitions of ERK1/2 and Akt attenuated the enhancement of cellular migration by Aa-EVs. Altogether, Aa-EVs induce malignant transformation of PAC cells via activation of the EGFR signaling pathway. Our results may provide a rationale for the applicability of EGFR-targeting molecular therapy against PAC associated with Aa infection.

FL2-06/P1-117

Genomic characteristics of *P. alcalifaciens* isolates causing a large foodborne outbreak in Japan

○Jayedul Hassan^{1,2,3}, 松田 重輝¹, 石井 英治¹, 飯田 哲也¹ (大阪・微研・細菌感染, ²JSPS, ³Dept. Microbiol. Hyg., Bang. Agric. Univ.)

○Jayedul Hassan^{1,2,3}, Shigeaki Matsuda¹, Eiji Ishii¹, Tetsuya Iida¹ (Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ., ²JSPS, ³Dept. Microbiol. Hyg., Bang. Agric. Univ.)

Providencia alcalifaciens, a member of the family *Morganellaceae*, was associated with a large foodborne outbreak in Fukui, Japan, in 1996. Our previous study had shown that the outbreak strains uniquely carried a large plasmid, which is associated with the invasiveness and diarrheagenicity of this bacterium. However, the mechanisms underlying this pathogenicity remain unknown. In this study, we investigated the genomic features of three representative outbreak isolates through whole-genome sequencing. The outbreak strains carried one chromosome (~3.8 Mb) and a large plasmid (~168 kb). In addition, two strains carried a small plasmid of ~50 kb. All three strains carried two type III secretion system (T3SS) gene clusters, one on the chromosome and another on the large plasmid, while no discernible virulence factors were found on the small plasmid. Comparative genomic analysis with other *Providencia* species revealed that the chromosomal T3SS is ubiquitous in *Providencia*, but the plasmid-encoded T3SS is distributed only in a subset of *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* associated with clinical cases in humans and animals. We also provide experimental evidence for the critical role of the plasmid-encoded T3SS in the invasiveness and diarrheagenicity of the *P. alcalifaciens* outbreak strain, and the evolution and potential spread of the large plasmid in *Providencia* will be discussed.

FL2-07/P1-120

Optimizing Phage Production: Streamlined Propagation and Purification for Enhanced Phage Therapy

○Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thititanapakorn, 相羽 由詞, Tan XinEe, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thititanapakorn, Yoshifumi Aiba, Tan XinEe, Kazuhiko Miyanaaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophages (phages) are viruses that specifically target bacteria, causing cell lysis by injecting their genetic material. While phage therapy declined in the West with the advent of antibiotics, it persisted in the East and is now regaining global attention due to rising antibiotic resistance. However, challenges in standardizing phage production and purification hinder their clinical use, with experimental and technical stresses potentially affecting phage recovery. In this study, we aimed to produce therapeutic-grade phages with minimal impurities by optimizing the propagation and purification of engineered OVA peptide-displaying phages, developed for immunological studies. Using plate propagation, phage titers of 10^{11} to 10^{13} PFU/ml were achieved. Purification involved PEG precipitation, 0.2µm filtration, and 100kDa MWCO membrane filtration to remove host toxins, proteins (e.g., hemolysins, LTA), nucleic acids, and any reagent-sourced LPS monomers, if any. Post-purification ultracentrifugation concentrated the phages, which were then analyzed for contaminants, confirming purity. Toxicity assays, pyrogen profiling, and pro-inflammatory cytokine release tests on cell lines showed no harmful effects. Our approach successfully produces high-purity phages with optimized yields, making them suitable for in vivo applications and advancing phage therapy.

FL2-08/P1-127

Phage-Based DNA Vaccine Development Using mEmerald Gene as Proof of Concept

○Vivekanandan Palaninathan, 劉 怡, Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, 相羽 由詞, XinEe Tan, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Vivekanandan Palaninathan, Yi Liu, Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyanaaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

DNA vaccines use a small DNA segment to elicit an immune response, offering safety and effectiveness. Unlike traditional methods that use human viral vectors, which often have low cell-targeting specificity, potential side effects, and complex production processes, bacteriophages offer a viable alternative as DNA vaccine vectors. In particular, "non-replicating phages" are safer due to their inability to replicate in bacteria, reducing horizontal gene transfer risks. They enhance the immune response without chemical adjuvants, making them ideal for long-term immunity. Additionally, phages are cost-effective for large-scale production and stable under adverse conditions, positioning them as a potential solution for global health crises and paving the way for a cold-chain-free phage capsid vaccine. Currently, we are developing a proof-of-concept phage DNA vaccine incorporating the mEmerald gene. Using a synthetic approach, we integrated the mEmerald reporter gene into the phage genome and constructed a mammalian expression vector containing 1.5 kb of the fluorescent protein gene. This process resulted in multiple plaques after successful phage reactivation. PCR confirmed the integration of the foreign gene, and flow cytometry showed that 17% of cells treated with mEmerald-phage expressed the reporter gene after 96 hours, providing a proof of concept for the DNA vaccine.

FL2-09/P1-128

***Clostridioides difficile* 由来メンブレンベシクルの産生機構と免疫原性**

○勇 陽太郎¹, 奥田 真由¹, 野村 暢彦^{2,4}, 尾花 望^{3,4} (筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・医学医療系・TMRC, ⁴筑波大・MICS)

The production mechanism and immunogenicity of membrane vesicles from *Clostridioides difficile*

○Yotaro Isamu¹, Mayu Okuda¹, Nobuhiko Nomura^{2,4}, Nozomu Obana^{3,4} (Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ., Sci. Univ. Tsukuba, ³TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, ⁴MICS, Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を能動的に産生し、細胞外に放出する。MV は多様な菌体由来成分を積載し、宿主免疫調節能を有することが知られている。当研究室の先行研究より、MV の鼻腔接種によって、MV 由来菌特異的な腸管分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されることが明らかになった。本研究では、*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) に着目して、*C. difficile* 由来 MV を用いた宿主免疫調節系の確立を目的とし、MV の免疫が CDI の予防効果を有するかを検証した。いくつかのグラム陽性菌ではホリンエンドリシン (HE) 遺伝子の発現が MV 産生を誘導することが知られている。そこで、*C. difficile* の HE 誘導発現株を構築し、様々な培地条件と HE 発現が MV 産生及び性状に与える影響を検証した。その結果、HE が *C. difficile* においても MV 産生誘導因子であることが、培養条件や HE が MV の構成物や粒径を変化させることが明らかになった。次に、MV 鼻腔接種による宿主免疫誘導能を評価するため、各培養条件の *C. difficile* 由来 MV をマウス鼻腔に接種した。その結果、血清、便中、唾液において *C. difficile* 特異的な IgG および IgA 産生が確認された。特に HE 誘導条件の MV を用いた場合には、血清中の抗体量が増加した。さらに、MV 鼻腔接種マウスに *C. difficile* を感染させたところ、腸管中の *C. difficile* 芽胞量が MV 接種群で速やかに減少した。本研究によって *C. difficile* の MV 産生機構の一端が明らかになるとともに、MV の鼻腔免疫が CDI の重篤化を予防する可能性が示された。

FL2-10/P1-130

枯草菌で刺激された樹状細胞による Th17 細胞誘導機構の解析

○古田 和幸¹, 樗木 洋平¹, 石川 一也¹, 三好 伸一^{2,3}, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬・分子生物, ²岡山大・院医歯薬・環境生物薬学, ³岡山大・腸健康科学研究センター)

Analysis of mechanism of Th17 cell induction by dendritic cells stimulated with *Bacillus subtilis*

○Kazuyuki Furuta¹, Yohei Chishaki¹, Kazuya Ishikawa¹, Shin-Ichi Miyoshi^{2,3}, Chikara Kaito¹ (¹Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

樹状細胞は取り込んだ細菌などに由来するペプチドを T 細胞に提示することで、T 細胞の分化と活性化を誘導し、病原細菌排除の免疫応答や、腸内細菌に対する寛容を誘導する役割を持つ。枯草菌は土壌などに広く存在するグラム陽性細菌であるが、毒素を持たず病原性が低いため、免疫系を適度に活性化するプロバイオティクスへの応用も期待されている。一方で、枯草菌の樹状細胞に対する直接的な作用は十分には明らかではない。そこで、本研究では、枯草菌の樹状細胞機能に対する作用を解析した。樹状細胞株 DC2.4 細胞を枯草菌で刺激すると、抗原提示関連分子である CD80, CD86, PD-L1 の細胞表面発現の上昇がみられた。枯草菌刺激した DC2.4 細胞をリンパ節の細胞と共培養すると、IL-17 の産生が誘導されたため、ナイーブ T 細胞の Th17 細胞への分化が誘導されていると考えられた。ペプチドトリカリン (PGN) 受容体である TLR2、および TLR シグナルのアダプター分子である MyD88 を欠損した DC2.4 細胞を作成し、枯草菌刺激による Th17 への分化誘導を検討した結果、TLR2 および MyD88 欠損細胞では Th17 への分化誘導が减弱した。そこで、枯草菌 PGN、または熱処理した枯草菌で DC2.4 細胞を刺激したところ、Th17 細胞の誘導はほとんどみられなかった。これらの結果は、枯草菌で刺激された樹状細胞は Th17 細胞を誘導し、それには TLR2 を介した刺激が必要であることを示唆している。PGN 単体では Th17 細胞が誘導されなかったことから、PGN 以外の生菌由来の因子が Th17 細胞の誘導に必要であると考えられる。

FL2-11/P1-131

The inhibitory effects of silver ions and moisturizing gel on GTF activities and biofilm formation

○成 雪菲¹, 宮崎 貴文², 上川 善昭³, 泉福 英信¹ (¹日大松戸・歯・微生物免疫, ² (株) ピカッシュ, ³鹿児島・歯)

○Xuefei Cheng¹, Takafumi Miyazaki², Yoshiaki Kamikawa³, Hidenobu Senpuku¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Dent., Sch. St Matsudo, Nihon Univ., ²Pikasshu, ³Sch. Dent., Kagoshima Univ.)

The oral cavity hosts around 700 microbial species, many essential for health, but pathogens like *Streptococcus mutans* disrupt this balance, causing oral diseases and aspiration pneumonia. Biofilm formation by *S. mutans* relies on glucosyltransferases (GTFs), which produce extracellular polysaccharides (EPS). Silver ions are known for their bactericidal effects and biofilm formation inhibition. To evaluate the role of a mixture of silver ions and an oral moisturizing gel (Sukkilin), which is composed of 13 different components, the effects of silver ion-containing and non-silver ion gels on biofilm formation and GTF activities were investigated. The impact of these gels on biofilm biomass and GTF activities was assessed using qualitative assays, such as spectrophotometric analysis and real-time PCR. The structural changes in biofilms were visualized using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Additionally, bacterial aggregation was assessed by OD600. The results showed that silver ion-containing gel had stronger inhibitory effects than non-silver ion one, likely due to silver ions' bactericidal effects. Moreover, regardless of if the gel contains silver ions, it suggests a downregulation effect on gtfB and gtfC expression and GTF activity in aggregation assay. This study supports silver ion-based products in antimicrobial therapies and further research into their mechanisms.

FL2-12/P1-135

腸内細菌叢によるボツリヌス菌感染防御機構の解明

○小林 伸英¹, 松村 拓大¹, 込山 星河², 島海 広暉², 古平 陽太郎², Wanping Aw³, 楊 佳約³, 福田 真嗣³, 長谷 耕二², 藤永 由佳子¹ (¹金沢大・医・細菌学, ²慶應大・薬・生化学, ³慶應大・先端生命研)

Mechanisms of colonization resistance against *Clostridium botulinum* infection by gut microbiota

○Nobuhide Kobayashi¹, Takuhiro Matsumura¹, Seiga Komiyama², Hiroki Toriumi², Yotaro Kodaira², Wanping Aw³, Jiayue Yang³, Shinji Fukuda³, Koji Hase², Yukako Fujinaga¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ., ²Div. Biochem., Fac. Pharm., Keio Univ., ³IAB, Keio Univ.)

乳児ボツリヌス症は、生後およそ 1 歳未満の乳児において、経口摂取されたボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 芽胞が腸管に定着、神経毒素を産生することによって発症し、致死的な神経麻痺症状を呈する。一方で、健康な成人は本菌に対して感染耐性である。抗菌薬を大量投与された成人では本菌が感染する事例があること、無菌マウスや抗菌薬処理マウスは成獣であっても感染感受性であるという過去の研究から、成人の腸内細菌叢は本菌に対する感染耐性に重要であると考えられている。しかしながら、その具体的な細菌種や分子機構は明らかとなっていない。ボツリヌス菌感染感受性を特徴づける腸内細菌叢を明らかにするために、異なる日齢の新生仔 SPF マウスの腸内容物を成獣無菌マウス、および 5 種類の抗菌薬をそれぞれ投与した成獣 SPF マウスの感染感受性を解析したところ、感染感受性および耐性マウスが複数得られた。これらのマウスの腸内細菌叢を比較解析したところ、感染耐性の細菌叢に共通して存在する細菌群としてクロストリジウム綱を同定した。そこで、健康成人糞便から精製したクロストリジウム綱を無菌マウスに移植したところ、感染耐性が得られた。さらに、ヒト由来クロストリジウム綱移植マウスの糞便から 189 菌株を分離し、16S rRNA 遺伝子の相同性に基づき別種と推測される 13 株を得た。この 13 株の単独定着マウスを解析したところ、1 株のみ感染耐性を付与した。メタローム解析および *in vitro* 培養実験の結果から、本分離株は栄養的な競合によりボツリヌス菌の増殖を抑制することが示唆された。以上の結果から、共生細菌とのニッチの競合がボツリヌス菌感染耐性に重要であると考えられる。

FL2-13/P1-140

IMP-1 および OXA-58 カルバペネマーゼを産生するコリスチン耐性アシネトバクターの同定と性状解析

○西田 智¹, 斧 康雄^{1,2}, 吉野 友祐¹ (¹帝京大・医・微生物, ²帝京平成大・健康メディカル)

Identification and characterization of colistin-resistant *Acinetobacter* producing IMP-1 and OXA-58

○Satoshi Nishida¹, Yasuo Ono^{1,2}, Yusuke Yoshino¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., ²Faculty Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

【背景】カルバペネム耐性アシネトバクターに対する世界的な関心が高まっている。この感染症は標準的な抗生物質では治療が困難であるため、臨床的に深刻な問題となっている。本研究では、臨床分離されたカルバペネム耐性かつコリスチン耐性アシネトバクターの同定を行い、薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子について解析した。【方法】薬剤感受性は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のブレイクポイントに従って定義した。菌種と薬剤耐性遺伝子を同定するためにゲノム解析を行った。【結果】本分離株は、広域スペクトルセファロスポリンおよびカルバペネムを含む β-ラクタム系抗菌薬、ポリミキシン、トリメトプリム／スルファメトキサゾールに耐性であった。ゲノム解析の結果、分離株は *bla*_{IMP-1}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-670}, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-Ij, *ant*(3'')-II, *aph*(3')-VI, *msrE*, *mphE*, *sulI* を保有する *A. colistiniresistens* であった。コリスチン耐性に関わるリビド A 修飾酵素をコードする *eptA* 様遺伝子も認められた。SNP を用いた系統解析の結果、日本国内で分離された他の菌株とクラスターを形成していた。この IMP-1/OXA-58 産生株は *bla*_{IMP-1}, *aacA*, *sulI* からなるクラス 1 インテグロンを有していた。【結論】本臨床分離株は IMP-1/OXA-58 産生 *A. colistiniresistens* であった。*A. colistiniresistens* はコリスチンを含むポリミシンに自然耐性を示すが、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 遺伝子のリザーバーとして機能する可能性がある。今後、MBL 産生 *A. colistiniresistens* が世界的に広がる可能性を注視していく必要がある。

FL2-14/P1-146

イヌ腸管内での生存に重要なフルオロキノロン耐性大腸菌 ST131 遺伝子の同定

○前田 愛子^{1,2}, 佐藤 豊孝^{1,2,3}, 岡田 佳帆², 鈴木 章夫^{2,3}, 堀内 基広^{1,2,3}
(¹北大・院・国際感染, ²北大・院・獣医・獣医衛生, ³北大・One Health リサーチセンター)

Identification of gene for the survival of fluoroquinolone-resistant *E. coli*/ST131 in the canine gut

○Aiko Maeda^{1,2}, Toyotaka Sato^{1,2,3}, Kaho Okada², Akio Suzuki^{2,3}, Motohiro Horiuchi^{1,2,3} (¹Grad. Sch. Infect. Dis., Hokkaido Univ., ²Lab. Vet. Hyg., Fac. Vet. Med., Hokkaido Univ., ³OHRC., Hokkaido Univ.)

【目的】フルオロキノロン耐性大腸菌 ST131 は、ヒト臨床現場における国際的ハイリスククローンであり、健康者やイヌ・ネコの腸管内にも保菌されている点からも地域社会での ST131 の伝播が示唆される。本研究では、transposon-directed insertion-site sequencing (TraDIS) 解析を用いて、イヌの腸管内での生存に重要な ST131 遺伝子を同定し、ST131 の腸管内定着様式の解明に繋げることを目的とした。【方法】イヌ糞便抽出液および生理食塩水（対照）を Mueller Hinton II broth で 80%濃度に調整した各液に、ST131 トランスポゾン変異株ライブラリーを接種後、37°C で一晚培養した。培養後の本ライブラリー由来 DNA を抽出し、TraDIS 解析を行った。TraDIS 解析にてイヌ糞便抽出液と対照を比較し、イヌ糞便抽出液において検出量が有意に減少していた遺伝子を、腸管内での生存に重要な候補遺伝子として抽出した。候補遺伝子に対する遺伝子特異的欠損株を Lambda Red 組換え法を用いて作製し、イヌ糞便抽出液存在下での増殖性を確認した。【結果】TraDIS 解析により、8 種の候補遺伝子を抽出した。これらの遺伝子特異的欠損株を作製し、イヌ糞便抽出液存在下での増殖性を親株と比較したところ、6 種で有意な増殖性の低下が認められ ($p < 0.05$)、そのうち 2 種 ($\Delta oxyR$ および $\Delta lpxL$) では 70%以上の増殖性の低下を認めた。【考察】OxyR および LpxL は ST131 がイヌの糞便や腸管内での生存に重要であり、ST131 の保菌に重要な因子であると考えられる。

FL2-15/P1-148

The difference in plasmids transfer rates between *Salmonella* serovars from broiler chickens

○サンガ ジョージ¹, Vu Minh Duc¹, Saki Hiramoto², Rika Miyajima², Yui Tamura², Takehisa Chuma¹ (¹鹿児島大院・共同獣医・獣医公衆衛生, ²鹿児島大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○George Sanga¹, Vu Minh Duc¹, Saki Hiramoto², Rika Miyajima², Yui Tamura², Takehisa Chuma¹ (¹Dept. Veterinary Public Health, Joint Grad. Sch. Veterinary Medicine, Kagoshima Univ., ²Dept. Veterinary Public Health, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima Univ.)

Plasmid-mediated resistance genes are common amongst member of Enterobacteriaceae family including *Salmonella*. Through conjugation, we investigated the transfer of plasmids and resistance genes between *Salmonella* serovars commonly isolated from broiler chickens in Kagoshima. We found that, the IncP plasmid was universal carried by all *Salmonella* serovars. However, besides IncP, some isolates also carried IncX1. Additionally, we found that, IncX1 plasmid was transferred easily between the conjugants unlike IncP plasmid. Also, conjugating the same *Salmonella* serovars resulted in a higher conjugation rate, and, based on conjugation rates obtained, *S. Manhattan* had the highest affinity for IncX1, followed by *S. Schwarzengrund* and *S. Infantis*. Furthermore, the IncX1 plasmid facilitated the transfer of resistance genes for third-generation cephalosporins, whereas the IncP plasmid facilitates the transfer of a wide range of antibiotic resistance genes, including aminoglycosides, tetracycline, and sulphonamides. Finally, plasmid conjugation enables us to better understand the mechanisms underlying the occurrence and spread of antibiotic resistance in *Salmonella*.

FL2-16/P1-159

Identification of nanaomycin A and its analogs as T9SS inhibitors in *Porphyromonas gingivalis*

○佐々木 祐子¹, 松尾 長大¹, 渡邊 善洋², 岩月 正人², 稲橋 佑起², 西田 智³, 内藤 真理子¹, 庄子 幹郎¹ (¹長崎大院・医歯薬・口腔病原微生物学, ²北里大・大村研, ³帝京大・医・微生物)

○Yuko Sasaki¹, Takehiro Matsuo¹, Yoshihiro Watanabe², Masato Iwatsuki², Yuki Inahashi², Satoshi Nishida³, Mariko Naito¹, Mikio Shoji¹ (¹Dept. Microbiol. Oral Infect. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ²Omura Inst., Kitasato Univ., ³Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ.)

Porphyromonas gingivalis, a key pathogen in chronic periodontitis, has a type 9 secretion system (T9SS) that secretes virulence factors like highly hydrolytic proteases called gingipains. No T9SS-specific inhibitors have been reported, so we tackled developing a T9SS inhibitor screening system. We focused on a minimal medium called mC medium that contains milk casein as the sole protein source. Our incubation and colony-forming unit (CFU) studies revealed that *P. gingivalis* wild-type strain ATCC 33277 caused cloudiness of mC medium without cell growth. A gingipain-null mutant (KDP136) and a T9SS-deficient mutant (PorK-null) showed no cloudiness of mC medium. In mC medium, a gingipain inhibitor, iodoacetamide (IAM), and a protonophore, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine (CCCP), clearly inhibited the increase in turbidity. These results suggested that the mC medium can assess *P. gingivalis* gingipain activity and its functional T9SS. Using an assay method with mC medium, we identified nanaomycin A analogs, OM-173αA and OM-173βA, in the Omura Natural Compound Library. OM-173αA inhibited the increase of gingipain activity level in mC medium culture but did not directly affect gingipain activities. Nanaomycin A showed the same results. These indicated that nanaomycin A and its analogs were probable T9SS inhibitors; however, the mode of action on T9SS function remains unknown.

FL2-17/P1-160

222-nm Far UV-C generates ROS in *Staphylococcus aureus* and inhibits its photoreactivation

○福士 理沙子^{1,2}, 成田 浩司^{1,3}, 山根 亨介⁴, 厚井 融⁴, 浅野 クリスナ^{1,5}, 中根 明夫^{2,5} (¹弘大大学院・医・感染生体防御, ²弘医福大・保健・看護, ³弘大大学院・医・附属動物実験施設, ⁴(株)ウシオ電機, ⁵弘大大学院・医・生体高分子健康科学)

○Risako Fukushima^{1,2}, Kouji Narita^{1,3}, Kyosuke Yamane⁴, Toru Koi⁴, Krisana Asano^{1,5}, Akio Nakane^{2,5} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Dept. Nursing, Sch. Health. Sci., Hirosaki Univ. Health Welfare, ³Inst. Animal Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Ushio Inc., ⁵Dept. Biopolymer Health. Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

The 254-nm UVC is conventionally used for disinfection but cannot be utilized in dwelling spaces due to its harmful effect on human body, whereas 222-nm Far UV-C is less harmful to human body, and can be used for disinfection in dwelling spaces. Formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) in DNA is a main germicidal mechanism of 254-nm UV-C. However, the CPD is repaired, and bacterial proliferation ability is restored through photoreactivation by photolysis activated with visible light. In this study, we investigated photoreactivation of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C. *S. aureus* was irradiated with 222-nm Far UV-C and photoreactivated for 0 and 4 h or dark repaired for the same period and bacterial count, CPD formation and ROS-generating cells were determined at each time point. Recovery of proliferation ability of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C by photoreactivation was inferior to that irradiated with 254-nm UV-C. In contrast, the similar levels of CPD were induced in *S. aureus* irradiated with either UV-C, and CPD in each group of *S. aureus* were repaired at the comparable level by photoreactivation. More ROS-producing *S. aureus* was observed after irradiation with 222-nm Far UV-C compared with 254-nm UV-C. These results indicate that ROS are involved in inhibition of photoreactivation of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C.

FL2-18/P1-163

ファージ尾繊維とポーリンの相互作用

○寺崎 陽香, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Interaction between phage long tail fibers and bacterial porins

○Haruka Terasaki, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Science and Engineering, Saitama Univ.)

ファージは厳密な宿主域をもつ。この特徴はファージ尾繊維と宿主受容体の相互作用 (吸着) により決定される。大腸菌 K12 株に感染する T4 ファージの吸着機構は徐々に明らかになってきたが、O157 株に感染する PP01 ファージの吸着機構は未解明である。本研究では、PP01 の尾繊維先端に位置する Gp38 と O157 株の外膜タンパク質 C (OmpC) の相互作用の解明を目的とした。これまでに、Gp38 の結晶構造解析、Gp38 と OmpC のクロスリンク実験、さらに変異解析により、Gp38 の 230 番目のチロシン (Y230) と OmpC の 306 番目のアスパラギン (N306) が相互作用する可能性が示唆された。

本大会では、Gp38 の Y230 以外に OmpC との相互作用に必要なアミノ酸の同定を試みた。PP01 の類縁ファージである T2 の Gp38 は PP01 同様に Y230 を持つが、O157 株の OmpC には吸着できない。そこで、PP01 の Gp38 のさまざまな領域を T2 の Gp38 に置き換えたキメラファージを作製し、増殖能を調べた。その結果、PP01 の Gp38 の 158 番目から 170 番目の領域が OmpC との相互作用に必要であることがわかった。この領域のアミノ酸をそれぞれ T2 のアミノ酸に置換して増殖能を調べたところ、159 番目のチロシン (Y159) が相互作用に必要であることが分かった。Y230 と Y159 は Gp38 の異なるループ構造にあるが、ともに尾繊維先端に位置し隣接している。よって、この領域で OmpC と相互作用する可能性が示唆される。T4 では尾繊維先端が、3 量体を形成する OmpC の中心の窪みにある複数のアミノ酸と相互作用する。一方 PP01 では、Gp38 と相互作用する N306 は OmpC の外側に露出するループ構造内に位置する。よって、PP01 は T4 とは異なる様式で吸着することが示唆される。

FL2-19/P1-164

大腸菌 O157 株における抗 T4 ファージ作用

○石川 帆華, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Anti-T4 phage defense in Escherichia coli O157

○Honoka Ishikawa, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

細菌はファージ感染を回避するために多様な防御機構を発達させてきた。例えば、吸着から逃れるために外膜の形状を変化させたり、制限修飾系や CRISPER-Cas 系によりファージ DNA を切断したり、CBASS やトキシノーアンチトキシン系により不穏感染を引き起こしたり、その方法は様々である。T4 ファージ (以下、T4) は、大腸菌 K12 株に感染するが O157 株には感染しない。我々は、T4 が O157 株に感染できない原因を探り、O157 株がもつ新規の抗ファージ機構の発見を目指している。これまでの解析で、T4 は K12 株の外膜タンパク質である OmpC を吸着のレセプターとするが、O157 株の OmpC は吸着に必須なアミノ酸が変異していることがわかった (Suga et al. Appl. Environ. Microbiol. 2021)。また、O157 株の OmpC に吸着できる変異 T4 を用いて O157 株への吸着能を調べたところ、野生株には吸着できないが、細胞壁を構成するリボ多糖を短くすることで吸着能が向上することもわかった。これらの結果は、O157 株が OmpC の変異とリボ多糖の物理的な障害をもつことで、T4 の感染から逃れていることを示唆する。我々は、T4 の尾繊維先端タンパク質を、O157 株に感染する PP01 ファージの先端タンパク質に置き換えた改変ファージを作製した。改変ファージは O157 株に吸着したが、興味深いことに増殖することはできなかった。この結果は、O157 株には吸着阻害以外に T4 の増殖を抑えるしくみが存在することを示唆する。これまでに、O157 株で改変ファージ感染後に DNA 複製が起きないことを確認しており、現在その要因について検討中である。

FL2-20/P1-165

ファージ防御に関わるトキシノーアンチトキシンシステムの活性化

○隠岐 大稀, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Activation of the toxin-antitoxin system in phage defense

○Daiki Oki, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

細菌は進化において様々な抗ファージ機構を発達させてきた。その一つにトキシノーアンチトキシンシステム (TA) がある。TA は細菌自身の増殖を阻害するトキシンと、その毒性を抑えるアンチトキシンにより構成される。ファージ感染時にはトキシンが活性化して、細菌自身の増殖を阻害することで、不穏感染を引き起こす。本研究は、ファージ感染後に起こるトキシンの活性化機構の解明を目的とする。今回対象とした TA は大腸菌 K12 株が持つ RnlA-RnlB で、RnlA トキシンはエンドリボヌクレアーゼ活性を有し、大腸菌やファージの mRNA を分解する。一方、RnlB アンチトキシンは RnlA に結合してその毒性を抑える。RnlB は一般的なアンチトキシンと同じく不安定で、Lon と ClpXP プロテアーゼにより分解される。また、T4 ファージは RnlA に対する阻害因子 Dmd をもつため、K12 株でも増殖可能である。

まず、プロテアーゼ欠損株における *dmd* 変異ファージの増殖能を調べた。Lon と ClpX の単独欠損株では野生株と比べて、プラーク形成能が約 10 倍増加し、二重欠損株では RnlA-RnlB 欠損株と同程度まで回復した。次に、抗ファージ作用を減弱させる *mota* または *asiA* 変異ファージ感染時の RnlB 量を測定した。MotA と AsiA は中期遺伝子群の転写に関わるファージ因子である。それぞれの変異ファージでは、*dmd* 変異ファージに比べて感染後の RnlB 量が部分的に増加した。以上の結果は、RnlA の活性化が RnlB の量に依存することを示している。我々は、ファージ感染後に生じる RnlB 量の減少が RnlA 活性化のトリガーであると考えている。現在、RnlB 量の減少を引き起こす仕組みについて調べている。

FL2-21/P1-168

尿路病原性 ESKAPE 産生大腸菌のファージ耐性株の性状解析

○田中 真由子¹, 花輪 智子¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam³, 丹治 保典⁴, 須田 智也¹, 氣駕 恒太郎³, 松田 剛明^{1,4} (¹杏林大・医・総合医療, ²国立感染症研・AMRセンター, ³国立感染症研・治ワク, ⁴杏林大・医・救急医学)

Characterization of phage-resistant mutants of ESKAPE-producing uropathogenic *E. coli*

○Mayuko Tanaka¹, Tomoko Hanawa¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam³, Yasunori Tanji⁴, Tomoya Suda¹, Kotaro Kiga³, Takeaki Matsuda^{1,4} (¹Dept. Gen. Med., Sch. Med., Kyorin Univ., ²AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ³Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Dept. Traum. Crit. Care Med., Kyorin Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】尿路感染症の主な原因菌である尿路病原性大腸菌 (UPEC) において基質拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌が増加しており、ファージ療法の開発が期待される。ファージ療法の際、ファージ耐性菌の出現は治療の障害となる一方、耐性化の代償として病原性の低下や薬剤への再感受性化が生じる「trade-off」の現象も報告されている。本研究では、ESBL 産生 UPEC のファージ耐性化に伴う trade-off のうち、薬剤感受性およびバイオフィーム形成能について検討した。【材料・方法】尿路感染症患者の血液から分離された ESKAPE 産生大腸菌 KYE019 (ST131/Q25:H4/fimH30) の培養液に、当研究チームが都市部下水流入水より単離した 15 種のファージを各々添加して繰り返し培養することにより、ファージ耐性菌を作出した。Ceftazidime, Cefazolin, Levofloxacin に対する感受性は disk 法により判定し、バイオフィーム形成はクリスタルバイオレット法により定量した。【結果・考察】5 回連続共培養後、各ファージ耐性菌の培養液からコロニーを単離して添加したファージに対する感受性を調べたところ、8 種のファージで耐性株が作出されていた。得られた全てのファージ耐性株の薬剤感受性は、親株と同等であった。一方、親株と比較し、バイオフィーム形成能が 1/3-1/5 に減少した株と 1.4-8.4 倍に増加した株があり、ファージの種類により異なる傾向がみられた。以上の結果より、ファージ耐性化と調査した薬剤に対する感受性との関連性は見出されなかったが、バイオフィーム形成能については trade-off と on の両面を引き起こす可能性が考えられた。今後、機構を明らかにするため、遺伝子変異部位の解析等を行う予定である。

FL2-22/P1-170

大腸菌流行株 ST131 の外膜タンパク質を標的とするファージの探索

○波部 賢人¹, 中塚 哉太¹, 金子 知義^{1,2}, 常田 聡^{1,2} (1早大・先進理工学・生命医科, 2早大・ファージセラピー研)

Isolation of Phages Targeting Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Pandemic Clone ST131

○Kento Habe¹, Kanata Nakatsuka¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (1Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2Phage Therapy Inst., Waseda Univ.)

薬剤耐性菌に対する新規治療法であるファージ療法は、ファージの高い宿主特異性やファージ耐性化が課題である。薬剤耐性菌の中でも、大腸菌 Sequence Type (ST) 131 は Multi-Locus Sequence Typing (MLST)解析により分類される系統型で、フルオロキノロン系や第三代セファロスポリン系の抗菌薬に耐性を示す。さらに、国内外の疫学調査により大腸菌感染症の優勢な流行株と報告されている。

我々は、ST131 株同士でアミノ酸配列の保存性が高い外膜タンパク質を特定し、そのタンパク質を標的とするファージを収集することで、多くの ST131 株に対して高い溶菌効果を示すファージ製剤が作製できると考えた。

まず、ST131 臨床分離株 205 株（当研究室が保有する 12 株、NCBI に登録されている 193 株）の外膜タンパク質配列の保存性を調査し、配列多型を分類した（変異箇所が 1 つでもあれば別パターンに分類）。その結果、OmpC、PhuA、TolC など 12 の外膜タンパク質について、多くが 1 つの遺伝子型に一致することが認められた（一致度の中央値: 97.5%）。

そこで、各外膜タンパク質について、大腸菌 K-12 一遺伝子欠損株に ST131 株由来で一致度の高い配列を導入した組換え株を作製し、都市下水より ST131 株の外膜タンパク質を特異的に認識するファージを獲得した。

その後、獲得したファージを液体中で大腸菌と共培養したときの濁度測定により、溶菌活性の高いファージを探索するとともに、異なる外膜タンパク質を標的とするファージを組み合わせた際の溶菌持続時間の変化を検証した。これらにより、ST131 株に効果的なファージ製剤の開発に必要な知見の深まりが期待される。

FL2-23/P1-173

光免疫抗微生物戦略の標的特異的殺菌作用とバイオフィーム制御への応用

○山田 颯汰¹, 西谷 朱音^{2,3}, 光永 真人⁴, 岩瀬 忠行^{2,5} (1慈恵医大・医, 2慈恵医大・総医セ, 3東京バイオ・バイオ, 4慈恵医大・医・内科, 5慈恵医大・院・分子診断治療)

Photoimmuno-antimicrobial strategy against biofilm based on molecular targeting

○Sota Yamada¹, Akane Nishitani^{2,3}, Makoto Mitsunaga⁴, Tadayuki Iwase^{2,5} (1Undergrad., Sch. Med., Jikei Univ., 2Res. Cent. Med. Sci., Jikei Univ., 3Dept. Biotech., Tokyo Coll. Biotech., 4Dept. Intern. Med., Sch. Med., Jikei Univ., 5Mol. Diagn. Ther., Grad. Sch. Med., Jikei Univ.)

薬剤耐性微生物や新たな病原体の出現により、これまでとは異なる抗微生物戦略の開発が必要となっている。我々は最近、標的の生物種や薬剤耐性状態に関わらず、標的を狙い撃つことが可能な光免疫抗微生物戦略 (PIAS) を開発した (Mitsunaga M. et al. Commun Biol. 2022; Iwase T. et al. Nat Protoc. 2023)。PIAS は、抗体に光反応性プローブ IR700 が結合した光反応性抗体を用いることを特徴とする。近赤外光を受けた IR700 はその構造を変化させることで機械的ストレスを発生させ、標的の抗体結合部位を破壊し、抗微生物効果をもたらす。標的は抗体を選択することで自由に設定でき、これまでに細菌や真菌、新型コロナウイルスなど、様々な微生物種に対して種特異的な作用が確認されている。今回、標的分子を欠損させた黄色ブドウ球菌を用いた検討により、PIAS の特異的な殺菌作用は分子レベルで発揮されることが確認された。また生存に必須でない細胞壁タンパク質を標的としても、その殺菌効果は生存に必須なペプチドグリカン（ペプチドグリカン）を標的とした PIAS と同様であったため、細胞壁タンパク質とペプチドグリカンとの共有結合部位の傷害を介してもたらされたものと考えられる。加えて PIAS は、強固に形成されたバイオフィーム内の多剤耐性の黄色ブドウ球菌に対しても殺菌効果を示した。本法は、治療抵抗性を示すカテーテル感染などのバイオフィーム関連感染症に対する新たな治療法としての展開が期待される。

FL2-24/P1-094

Candida glabrata genes regulating phagosome maturation in macrophages

○趙 福江, 高橋 (中口) 梓, 佐藤 (岡本) 美智代, 笹本 要, 知花 博治 (千葉大・真菌医学研究センター)

○Fujiang Zhao, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Sato-Okamoto, Kaname Sasamoto, Hiroji Chibana (Divi. Molecul. Bio., Med. Mycol. Reaeer. Cen., Chiba Univ.)

Macrophages are a vital component of the immune system, belonging to the innate immune response. Phagosome is formed when the macrophages engulf the invading pathogens (such as bacteria, fungi, or viruses), which is a key antimicrobial mechanism. However, some successful intracellular pathogens take advantage of macrophages as a biological niche such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida glabrata*. Unlike many other pathogens, *C. glabrata* proliferates intracellularly after macrophage engulfment without causing overt cell damage, apoptosis, or cytokine release, while actively inhibiting reactive oxygen species (ROS) production. Notably, *C. glabrata* disrupts phagosome biogenesis, allowing its survival within macrophages. While significant progress has been made in understanding the interactions between hosts and pathogens such as *M. tuberculosis* and *S. aureus*, particularly regarding the inhibition of phagosome biogenesis, the molecular mechanisms by which *C. glabrata* blocks phagosome maturation remain elusive. Thus, in this study, we utilized a gene-deletion mutant collection established in our laboratory to identify several *C. glabrata* genes involved in resisting macrophage phagocytosis. We analyzed the localization and binding targets of these genes to better understand how *C. glabrata* evades macrophage-mediated antimicrobial processes.

FL2-25/P1-096

抗菌ペプチド LL-37 に対する *Vibrio vulnificus* の抵抗性遺伝子の同定

○川手 真仁, 入船 太郎, 山崎 浩平, 柏本 孝茂 (北里大・獣医・獣医公衆衛生)

Identification of Resistance Genes against the Antibacterial Peptide LL-37 in *Vibrio vulnificus*

○Shinji Kawate, Taro Irifune, Kohei Yamazaki, Takashige Kashimoto (Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

【背景】*Vibrio vulnificus* は、経口または創傷感染により、極短時間内に人へ軟部組織壊死および敗血症を引き起こす。この事実は、*V. vulnificus* が自然免疫機構を凌駕することを示している。中でも好中球は、細菌感染に対する主要な防御機構を担っている。我々は、*V. vulnificus* の持つ好中球抵抗性機構に着目し、その全容解明を目指している。本研究では、活性化好中球が分泌する抗菌ペプチドである LL-37 に対する抵抗性機構に着目した。

【方法および結果】*V. vulnificus* CMCP6 株を用いて *In vivo* Tn-Seq 法を実施し、トランスポゾンの挿入により好中球による殺菌を受けやすくなった 40 クローンを取得した。これらの中から、LL-37 に対する抵抗性の低下した株を選抜するため、既知の好中球抵抗性機構である運動性と莢膜発現に変異を持たない 11 株を選抜した。LL-37 はカチオン性ペプチドであり、LPS と静電相互作用により殺菌作用を発揮することが知られている。そこで、LL-37 と類似する殺菌機構を持つカチオン性抗菌薬の Polymyxin B による抵抗性試験を行い、抵抗性の低下した 8 株を選抜した。これら 8 株に対し LL-37 抵抗性試験を実施し、最終的に野生株と比較して抵抗性が 50%程度低下した 3 株を選抜した。現在、変異遺伝子を同定中である。

【考察と展望】*V. vulnificus* は外膜においてカチオン性物質の静電相互作用を抑制することで LL-37 に対する抵抗性を持つ可能性が示唆された。今後、同定した LL-37 に対する抵抗性遺伝子をノックアウトおよび相補し、菌体膜に起こる変化を解析することで、*V. vulnificus* の LL-37 に対する抵抗性機構の解明に繋げていきたい。

FL2-26/P1-097

ThyX Overexpression Promotes the In Vivo Growth of BCG

○土佐 郁恵¹, 山口 智之^{1,2}, 松崎 吾朗³, 梅村 正幸³, 高江洲 義一³, 中山 真彰¹, 阿戸 学⁴, 大原 直也¹ (¹岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ²酪農学園大・獣医, ³琉球大・熱帯生物圏研究セ・分子感染防御学, ⁴感染研・ハensen病研究セ・感染制御, ⁵岡山大院・医歯薬・腸健康科学研セ)

○Ikue Tosa¹, Tomoyuki Yamaguchi^{1,2}, Goro Matsuzaki³, Masayuki Umemura³, Giichi Takaesu³, Masaaki Nakayama¹, Manabu Ato⁴, Naoya Ohara¹ (¹Dept. Oral Microbiol., Fac. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., ³Trop. Biosphere Res. Ctr., Univ. Ryukyus, ⁴Dept. Mycobacteriol., Leprosy Res. Ctr., NIID, ⁵Res. Ctr. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

Introduction: *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is known to be a slow-growing bacteria and possess both ThyA and ThyX as thymidylate synthases. We previously reported that ThyX overexpression promotes the *in vitro* growth of BCG, a vaccine strain of *M. tuberculosis*, whereas this phenotype is not observed with ThyA overexpression. In this study, we investigated the effect of ThyX overexpression in BCG *in vivo* through infection experiments.

Materials and Methods: pThyX was constructed by ligation a *thyX* expression cassette to the *Mycobacterium* plasmid pNN. pThyX BCG and pNN BCG control were generated by transforming the respective plasmid into the BCG Tokyo strain. pThyX BCG and pNN BCG control were then inoculated into 8-week-old female C57BL/6JmSlc mice via the airway (5×10^6 CFU). Two weeks post-inoculation, the number of bacteria in the lungs was measured.

Result and Discussion: The number of pThyX BCG in the lungs was significantly higher than that of the pNN BCG control. Additionally, mononuclear cell infiltration was observed in the lungs of mice infected with pThyX BCG. These data suggest that ThyX overexpression promotes the growth of BCG not only *in vitro* but also *in vivo*, leading to inflammation in the lungs.

FL2-27/P1-100

Genome-scale Metabolic Network Reconstruction Reveals Pathogenic *Leptospira* Metabolism in Hosts

○尾鶴 亮^{1,2}, 吉村 芳修¹, 園田 卓己¹, Jason Papin², 小幡 史子³, Glynis Koling², 廣松 賢治¹ (¹福岡大・医・微生物免疫, ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³鳥取大・医・細菌)

○Ryo Ozuru^{1,2}, Michinobu Yoshimura¹, Takumi Sonoda¹, Jason Papin², Fumiko Obata³, Glynis Koling², Kenji Hiromatsu¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³Div. Bacteriol., Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Tottori Univ.)

Leptospira, the causative agent of the zoonosis "leptospirosis", proliferates most actively at approximately 30°C in culture, a temperature lower than the host's internal body temperature (37°C). Given its ability to colonize both environmental and host conditions, the metabolic activities of *Leptospira* during proliferation are likely to differ between these two settings. This study aimed to elucidate the temperature-dependent differences in metabolic systems of *Leptospira* using genome-scale metabolic network reconstruction (GENRE) analysis.

We constructed a GENRE model of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain JB197 using the tool "Reconstructor" and integrated public transcriptome data. We used these data to profile the gene expression of strain JB197 incubated at two temperatures (37°C and 29°C) and incorporated the gene profile into the model using the "RIPTiDe" method. GENRE analysis revealed increased fluxes in multiple pathways leading to the synthesis of fructose-6-phosphate (F6P) at 37°C compared to 29°C. This temperature-dependent metabolic shift enhances the production of F6P, a precursor for aromatic amino acids and nucleotides, and may provide insights for developing novel therapeutic approaches targeting *Leptospira* within the host.

FL2-28/P1-103

Pangenome-scale Metabolic Models Uncovered Pathogenicity-Specific Pathways in *Leptospira*

○園田 卓己¹, 尾鶴 亮^{1,2}, 吉村 芳修¹, Jason Papin², 小幡 史子³, Glynis Koling², 廣松 賢治¹ (¹福岡大・医・微生物免疫, ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³鳥取大・医・細菌)

○Takumi Sonoda¹, Ryo Ozuru^{1,2}, Michinobu Yoshimura¹, Jason Papin², Fumiko Obata³, Glynis Koling², Kenji Hiromatsu¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³Div. Bacteriol., Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Tottori Univ.)

Leptospira are classified into pathogenic and non-pathogenic types. Pathogenic strains infect animals, reside in the kidney and spread via urine, while non-pathogens survive in the environment. Currently, 64 leptospiral species are known and divided into four clades such as P1, P2, S1, and S2. P1 strains are historically considered pathogenic, but recent findings have revealed non-pathogenic strains within P1, thus, it is now categorized as P1+ (pathogenic) and P1- (non-pathogenic). The distinct life cycles of pathogenic *Leptospira* suggest unique metabolic features, which we investigated by building metabolic models for 58 leptospiral genomes using "Reconstructor." Our analysis identified a unique metabolic flow to P1+, particularly reactions involving vitamin B12 biosynthesis. Previous studies linked vitamin B12 metabolism to P1 but did not differentiate between P1+ and P1-. Vitamin B12, essential for nucleic acid synthesis and odd-chain fatty acid metabolism, cannot be synthesized by humans. P1+ strains may benefit from this pathway by avoiding competition for host-derived resources. Despite its high energy cost, synthesizing vitamin B12 may help P1+ to adapt to host environments. However, no direct evidence links the vitamin B12 pathway to pathogenicity. Our findings provide a foundation for future research on its role in pathogenicity and potential as a therapeutic target.

FL2-29/P1-174

アンギノース群レンサ球菌が産生する Streptolysin S に対する宿主炎症応答メカニズム

○山森 優護¹, 長宗 秀明^{1,2}, 友安 俊文^{1,2}, 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・院創成科学・生物資源学専攻, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Mechanism of host-inflammatory response against Streptolysin S produced by *Streptococcus anginosus*

○Yugo Yamamori¹, Hideaki Nagamune^{1,2}, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】アンギノース群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内に常在する日和見病原菌と認識されてきた。しかし本菌群の構成菌種には、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の主な起因菌である A 群レンサ球菌が持つ重要な病原因子である溶血毒素 Streptolysin S (SLS) を産生する株が多数存在しており、これらの株による細胞傷害や炎症反応の惹起が *in vitro* で確認されている。また、近年では臨床現場において口腔以外の感染症から AGS が頻繁に分離されることから、AGS が血中移行などで異所性感染を起こし高い病原性を発揮する可能性に我々は注目している。そこで本研究では、ヒト血球系細胞株において、AGS 由来の SLS に対する応答メカニズムについて検討した。

【方法】*S. anginosus* subsp. *anginosus* NCTC 10713^T (基準株) と基準株由来 SLS コード遺伝子欠失株 (Δ *sagAs*) を被検菌とし、ヒト血清アルブミン存在下で対数期まで培養した菌液から培養上清を調製した。調製した培養上清をヒト血球系細胞株 THP-1 および HL-60 から分化誘導した貪食細胞モデルに作用させ、細胞傷害性試験や、遺伝子およびタンパク質の発現変動を解析した。

【結果・考察】SLS を含む培養上清の作用により、細胞膜傷害に伴う細胞内 Ca^{2+} の上昇と Ca^{2+} 依存的な複数のサイトカインの発現上昇が認められた。また、サイトカイン発現誘導には、MAPK シグナル伝達経路が関与していた。以上の結果から、SLS の作用に伴うシグナル伝達は、 Ca^{2+} の細胞内流入を起点として、MAPK 経路の活性化により誘導されることが明らかになった。近年、異所性感染の原因菌として注目されている AGS、特に SLS を産生する β 溶血性菌種の病原性の理解に向けて、さらに検討を進めている。

FL2-30/P1-175

3 種類のコレステロール依存性細胞溶解毒素の遺伝子を保有する *Streptococcus mitis* 株の特性

○福本 一鷹¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (1徳島大・生物資源産業・生物資源産業, 2徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Characteristics of the *Streptococcus mitis* strain possessing three different CDC-encoding genes

○Ichiyou Fukumoto¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (1Dept. Biosci & Bioindust., Fac. Biosci & Bioindust., Tokushima Univ., 2Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】*Streptococcus mitis* はミティス群レンサ球菌に属し、ヒト口腔内に常在している日和見病原菌である。我々は、*S. mitis* の中にβ溶血性を示す株が存在し、このβ溶血因子がコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) であることをこれまで明らかにしている。さらに、この CDC コード遺伝子をゲノム上に複数種保有している株も確認されており、*S. mitis* が保有する CDC コード遺伝子の多様性も確認されている。本研究では、3 種の CDC コード遺伝子をゲノム上に保有する *S. mitis* 株の諸特性について、その細胞傷害性に注目して検討した。

【方法】*S. mitis* で確認されている 3 種の CDC (Mitilysin, Sm-hPAF/Lectinolysin, Discoidinolysin) のコード遺伝子に特徴的な配列を標的とした PCR により、被検株における CDC コード遺伝子の保有パターンを確認した。被検株の細胞傷害性はヒト赤血球およびヒト由来培養細胞を対象として検討すると共に、被検株から産生される CDC コード遺伝子の転写翻訳産物をイムノブロットングにより確認した。

【結果・考察】CDC コード遺伝子を標的とした PCR の結果より、被検株のゲノム上に 3 種の CDC コード遺伝子の存在を確認した。被検株の培養上清はヒト赤血球に対して明瞭なβ溶血性を示すと共に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 に対する細胞傷害性も確認された。さらに、イムノブロットングにより被検株からの CDC の産生が確認され、被検株は CDC 依存的な細胞傷害性を示すことが示唆された。現在、被検株が示す細胞傷害性における 3 種の CDC の寄与度を明らかにするため、CDC 遺伝子発現の相対定量などの詳細な検討を進めている。

FL3-01/P2-003

A comprehensive characterisation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the oral cavity

○西濱 早紀^{1,2}, 松尾 美樹^{2,3}, Vo Minh Ngoc², 川柳 智暉^{1,2}, 菅原 庸⁴, 久恒 順三⁴, 菅井 基行^{3,4}, 柴 秀樹¹, 小松澤 均^{2,3} (1広島大・医系科学研究科・歯髄生物学, 2広島大・医系科学研究科・細菌学, 3広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, 4国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)

○Saki Nishihama^{1,2}, Miki Matsuo^{2,3}, Vo Minh Ngoc², Tomoki Kawayanagi^{1,2}, Yo Sugawara⁴, Junzo Hisatsune⁴, Motoyuki Sugai^{3,4}, Hideki Shiba¹, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (1Dept. Biol Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 2Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., 3Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., 4Res. Cent for AMR, NIID.)

Background and Purpose: *Stenotrophomonas maltophilia*, a naturally resistant carbapenem antimicrobial, has been isolated mainly from the environment and also humans. *S. maltophilia* sometimes causes lethal infections in compromised hosts. In this study, we aimed to clarify the characteristic properties of *S. maltophilia* isolated from the oral cavity. **Methods:** In past research, 38 strains of *S. maltophilia* were isolated from the oral cavity. Phylogenetic tree analysis was performed using these strains together with environmental strains obtained from the NCBI database. The amount of biofilm formation was quantified by crystal violet staining. Self-aggregation ability, artificial saliva aggregation ability and coaggregation ability with oral bacteria were measured over time using turbidity as an indicator. **Results:** Oral isolates were not significantly different from environmental strains in phylogenetic analysis. Biofilm formation and self-aggregation ability varied greatly depending on the strain. Compared to self-aggregation, artificial salivary aggregation and coaggregation with oral bacteria were enhanced in some strains. **Conclusion:** This study suggests that *S. maltophilia* may acquire unique characteristics in the oral cavity. *S. maltophilia* in the oral cavity may cause systemic infection through aspiration or bloodstream, and its characteristics need to be further verified.

FL3-02/P2-008

Active surveillance of *Streptococcus suis* in porcine products in Nakhon Ratchasima, Thailand

○Nitchatorn Sungsirin^{1,2}, Tanit Boonsiri², Anusak Kerdin³, Thanaboon Chanwong⁴, Chuleeporn Mutuwong⁴, Marwah Abah⁴, Teerapat Phueakphong⁵, Sudaluck Thunyaharn⁴ (1Dept. Microbiology, Fac. Medicine, Shimane Univ., 2Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, Thailand, 3Fac. Public Health, Kasetsart Univ. Chalermpkrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon, Thailand, 4Fac. Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College, Nakhon Ratchasima, Thailand, 5Dept. Biology, Sch. Science, King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand)

Streptococcus suis is a zoonotic pathogen causing severe diseases such as meningitis, septicemia, and hearing loss. Human infections typically occur through contact with infected pigs or consumption of undercooked products, posing public health risks. This study conducted active surveillance for *S. suis* in raw porcine products from fresh markets in Mueang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand. A total of 113 samples were cultured in NNCC medium. Bacterial identification was conducted using biochemical methods, MALDI-TOF MS, and serotyping via multiplex PCR. One sample (0.88%) tested positive for *S. suis* serotype 2. Antimicrobial susceptibility testing showed susceptibility to beta-lactams, quinolones, chloramphenicol, tigeccycline, linezolid, trimethoprim/sulfamethoxazole, and vancomycin, while resistance was observed to macrolides, lincosamides, and tetracycline. Despite the low prevalence, the detection of a resistant strain emphasizes the need for ongoing surveillance and antibiotic stewardship. Active surveillance and public awareness campaigns are crucial for mitigating zoonotic transmission and reducing infection risks in high-risk areas.

FL3-03/P2-009

大腸菌ファージの組み合わせによる抗菌効果の増強と耐性化抑制

○泊 悠樹, 小島 新二郎, 氣賀 恒太郎 (感染研・治ワク)

Combination of *E. coli* phage to enhance antimicrobial efficacy and inhibit resistance

○Yuki Tomari, Shinjiro Ojima, Kotaro Kiga (Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis)

薬剤耐性菌に対する新しい治療法として注目されているファージ療法では、患者に複数種のファージを混合して投与する手法が一般的である。しかし、最適なファージの組み合わせを決定するための標準化されたプロトコルは確立されていない。本研究では、204 株の大腸菌臨床分離株ライブラリと 250 株の大腸菌ファージライブラリを使用して、様々なファージの組み合わせにおけるファージの溶菌速度や耐性化までの時間を評価した。その結果、単一のファージと比較し、複数のファージを組み合わせることで、溶菌速度が速まり、耐性化までの時間が長くなる組み合わせが存在した。特に、Tempevirinae 科の Warwickvirus 属と T4 様ファージの組み合わせではこの効果が顕著であった。一方で Dhillonvirus 属同士や T4 様ファージ同士など、同種のファージを組み合わせた場合には、溶菌速度が遅くなり、耐性化までの時間が短くなる傾向が確認された。以上の結果から、複数ファージの併用は、治療効果を増強させる可能性がある一方で、ファージの種類によっては効果が減弱することも示唆された。最適なファージの組み合わせを特定するためには、さらなる研究が必要である。

FL3-04/P2-010

Characteristics of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* type E isolates

○門間 千枝, 成谷 宏文 (十文字女子大・食品開発・食品微生物)

○Chie Monma, Hirofumi Nariya (Dept. Food Science, Jumonji Univ.)

Clostridium perfringens isolates are classified into seven toxin types (A to G) based on the production of six major toxins: alpha, beta, epsilon, iota, enterotoxin, and NetB. While types B, C, D, and E of *C. perfringens* are rarely isolated, and type A is ubiquitous. *C. perfringens* type E produces two major toxins, alpha, and iota. *C. perfringens* type F produces alpha toxin and enterotoxin. In this study, we investigated the characteristics of three enterotoxin-producing *C. perfringens* type E isolates. These strains were isolated from two human fecal samples and one pork sample.

The three enterotoxin-producing *C. perfringens* type E isolates carried the genes encoding alpha toxin, iota toxin, and enterotoxin, but did not carry the genes for beta toxin, epsilon toxin, iota-like toxin, or iota-like enterotoxin. The production of enterotoxin was confirmed using reverse passive latex agglutination. Furthermore, the cytotoxicity of these isolates was confirmed in Vero cells and L929 cells. These findings indicate that the three isolates produce both enterotoxin and iota toxin. We are currently conducting a detailed study to characterize these isolates further.

FL3-05/P2-028

【演題取り下げ】

【Withdrawn】

FL3-06/P2-029

ショットガンメタゲノム解析を用いたタイ小児の口腔細菌叢における薬剤耐性遺伝子の検出

○小林 桃子^{1,2}, Lapirattanakul Jinthana³, 大野 誠之¹, 元岡 大祐⁴, Tansriratanawong Kallapat⁵, Tantivitayakul Pornpen³, Smutkeeree Apiwan⁶, 川端 重忠^{1,7}, 山口 雅也² (¹阪大・院歯・微生物, ²医薬基盤・健康・栄養研, ³Dept. Oral Microbiol., Mahidol Univ., ⁴阪大・OUBIC, ⁵Dept. Oral Med. Periodontol., Mahidol Univ., ⁶Dept. Pediatr. Dent., Mahidol Univ., ⁷阪大・CiDER)

Metagenomic detection of antimicrobial resistance genes in the oral microbiome of Thai children

○Momoko Kobayashi^{1,2}, Lapirattanakul Jinthana³, Masayuki Ono¹, Daisuke Motooka⁴, Tansriratanawong Kallapat⁵, Tantivitayakul Pornpen³, Smutkeeree Apiwan⁶, Shigetada Kawabata^{1,7}, Masaya Yamaguchi² (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Dent., ²NIBIOHN, ³Dept. Oral Microbiol., Mahidol Univ., ⁴OUBIC, ⁵Dept. Oral Med. Periodontol., Mahidol Univ., ⁶Dept. Pediatr. Dent., Mahidol Univ., ⁷CiDER, Osaka Univ.)

現在、薬剤耐性菌の増加が世界的な問題となっている。抗菌薬の使用量が多い国の1つであるタイは日本との交流が深く、薬剤耐性遺伝子が常在微生物叢にどの程度存在しているかという情報は、耐性遺伝子の拡大を防ぐ上で重要である。本研究では、タイの健康な小児の常在口腔細菌叢について、薬剤耐性遺伝子の分布をショットガンメタゲノム解析により明らかにすることとした。タイの全身状態が健康な3〜4歳の小児95人から唾液および歯面ブラークを採取し、ショートリードシーケンサーによるショットガンメタゲノム解析を行った。得られたリード配列情報からメタゲノムアセンブリツールを用いてcontigを作成し、binningによってMetagenome assembled genome (MAG)を構築した。ゲノム品質評価ツールcheckM2によって、推定ゲノムの完全性が50%以上、かつコンタミネーション率が5%以下のMAGを中程度以上の品質とした。その結果、中程度以上の品質であるMAGを、唾液とブラークからそれぞれ862個および1,188個得た。微生物ゲノムデータベースGTDB-tkによる分類の結果、唾液とブラークでは共通してActinomycetota門、Bacteroidota門の存在率が高く、全体の45%を占めていた。次に、薬剤耐性遺伝子データベースを用いて耐性遺伝子の分布検索したところ、すべての小児の口腔から何らかの薬剤耐性遺伝子が検出された。特に、β-ラクタマーゼをコードする*cfxA*とアミノグリコシドホスホターゼをコードする*aph(3')-IIIa*は約9割の小児から検出された。本研究より、タイの健康な小児の唾液およびブラークには薬剤耐性遺伝子が広く分布していることが示唆された。

FL3-07/P2-031

腸管粘膜近傍細菌 *Adlercreutzia* は大腸炎緩和作用を持つ

○楊 佳約¹, 尾花 望^{2,3}, 中藤 学⁴, 野村 暢彦³, 福田 真嗣^{1,2,4,5,6} (¹慶大・先端生命研, ²筑波大・医学医療系・TMRC, ³筑波大・生命環境系, ⁴神奈川産技総研, ⁵順大・院・医, ⁶株式会社メタジェン)

Intestinal mucosa-associated bacteria *Adlercreutzia* attenuates colitis

○Jiayue Yang¹, Nozomu Obana^{2,3}, Gaku Nakato⁴, Nobuhiko Nomura³, Shinji Fukuda^{1,2,4,5,6} (¹Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²TMRC, Inst. Med., Univ. of Tsukuba, ³Inst. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁴KISTEC, ⁵Grad. Sch. Med., Juntendo Univ., ⁶Metagen. Inc.)

ヒト腸管内には多種多様な腸内細菌が生息しており、それらが産生する様々な代謝物質が人体に影響を与えることが報告されている。腸内細菌は腸管内の粘液層でバイオフィルムを形成することが知られており、特に粘液層付近に局在する腸内細菌も宿主に影響を与えることが報告されていることから、その機能理解は重要である。これまでの腸管粘膜近傍細菌叢の解析では、腸管組織の採取といった侵襲的な手段が必要であった。そこで、本研究では非侵襲的な採取を実現するために便に着目した。細菌叢解析の結果から、便表面と大腸粘膜近傍の細菌叢は類似しており、便を用いることで大腸粘膜近傍の細菌叢を経時的に解析可能であることを明らかにした。本手法により大腸の炎症と逆相関する新規の粘膜局在細菌属 *Adlercreutzia* を同定した。当該細菌属の基準株を定着させたノトバイオートマウスを作成し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて実験的に大腸炎を起こさせたところ、同菌は大腸炎緩和作用を有することが明らかとなった。盲腸内容物のメタボローム解析から腸内でタウリン量が増加していることが明らかとなった。タウリンを経口投与した無菌マウスはDSS大腸炎の緩和作用を示したことから、同菌は腸管内でタウリン量を増加させることで、大腸炎を緩和することが示唆された。腸管内のタウリンは腸内細菌が有する胆汁酸脱抱合酵素によって抱合型胆汁酸より生産される。In vitro 試験により、同菌の胆汁酸脱抱合酵素はその他の腸内細菌由来酵素と比較してその活性が格段に高いことが明らかとなった。したがって同菌の高い胆汁酸脱抱合作用は大腸炎緩和に有用であると考えられる。

FL3-08/P2-032

Time-Series Causal Discovery Reveals the Ecological Importance of Patescibacteria (CPR)

○島 玄太¹, 東樹 宏和¹, 鈴木 健大² (1京大・生命・統合生命, ²理研・BRC・統合情報)

○Genta Shima¹, Hirokazu Toju¹, Kenta Suzuki² (1Div. Integr. Life Sci., GSB, Kyoto Univ., 2Integr. Bioresour. Info. Div., BRC, RIKEN)

Bacterial communities composed of numerous species are expected to exhibit complex interactions. Understanding these interactions is essential for maintaining and managing communities. However, the complexity of community composition makes interaction analysis challenging. Time-series causal discovery based on long-term data offers a promising approach to overcome this complexity. One such method, the Granger causality test, estimates causality (Granger causality) by examining whether one time-series variable can predict another variable. By utilizing neural networks, which excel in time-series prediction, it is possible to estimate Granger causality in a model-free manner. In this study, we tracked the bacterial community dynamics in 5 eel aquaculture tanks over one year. In addition, we collected time-series data on non-biological factors such as pH, water temperature, feeding amount, and eel population. Applying time-series causal discovery to these datasets, we constructed "causal networks". These networks revealed that "eel population", "feeding amount", and Patescibacteria (Candidate Phyla Radiation: CPR) were key regulatory factors influencing community dynamics. Some OTUs of Patescibacteria have interactions with many hosts. These findings suggest that Patescibacteria, despite being poorly understood ecologically, may play a significant role in ecosystems.

FL3-09/P2-036

黄色ブドウ球菌の脂肪酸感受性と *Corynebacterium* 属細菌との共存関係に関する検討

○麻田 恭之^{1,2}, 大段 慶十郎^{1,3}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹¹, 朝川 美加李⁴, 久恒 順三⁵, 菅原 庸⁵, 竹下 徹⁴, 菅井 基行⁵, 小松澤 均¹ (1広島大・医系科学研究科・細菌学, ²広島大・医系科学研究科・口腔腫瘍制御学, ³広島大・医系科学研究科・口腔外科学, ⁴九州大・院歯学研究院・口腔予防医学分野, ⁵国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Investigation of the coexistence relationship between *S.a* fatty acid resistance and *Cb* bacteria

○Yasuyuki Asada^{1,2}, Keijuro Ohdan^{1,3}, Yujin Suzuk¹, Miki Kawada-Matsuo¹, Mikari Asakawa⁴, Junzo Hisatsune⁵, Yo Sugawara⁵, Toru Takeshita⁴, Motoyuki Sugai⁵, Hitoshi Komatsuzawa¹ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Oral Oncology, Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. of Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ⁴Dept. Oral Preventive Medicine, Grad. Sch. of Dental Sci., Kyushu Univ., ⁵Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】黄色ブドウ球菌 (Sa) はヒトの鼻腔や口腔の常在細菌である。Sa 同様、鼻腔内に常在する *Corynebacterium* 属 (Cb) は、生体のトリグリセリドを分解し脂肪酸を産生し、化膿レンサ球菌や Sa の増殖を阻害することが報告されている。本研究は、鼻腔・口腔由来の Sa 株の脂肪酸感受性の多様性を検証し、Sa と Cb との関連性について明らかにすることを目的とする。【方法】鼻腔・口腔から分離した Sa 171 株と、Cb 86 株を用いた (広島大学倫理委員会承認: E-2525)。Sa および Cb における脂肪酸であるリノール酸 (LA) およびパルミトオレイン酸に対する最小発育阻止濃度 (MIC) および Cb については脂肪酸要求最小濃度も判定した。また、脂肪酸の増殖への影響について検証した。【結果】Sa において、脂肪酸感受性は菌株により異なっていたが、鼻腔由来株は口腔由来株に比べ感受性が低い傾向を認めた。また、MRSA はメチシリン感受性菌に比べて LA の感受性が低い傾向を認めた。同一被験者での鼻腔および口腔分離株を比較すると、鼻腔由来株で脂肪酸感受性が低い傾向を認めた。Cb においては、菌株・菌種により脂肪酸感受性および要求性は異なっていた。また、sub-MIC 濃度の脂肪酸により Sa の増殖抑制が認められた。【考察】Cb が産生する脂肪酸の Sa に与える影響は、菌種間の相互作用や発育環境に依存する可能性が示唆された。今後は、脂肪酸感受性に影響を及ぼす遺伝的背景や Cb との相互作用を詳細に解析することで、Sa の鼻腔への定着機序の解明につながり、新たな感染制御の戦略を確立することが期待される。

FL3-10/P2-041

Development of a Mouse Model to Evaluate Wild-Type Phages in Eliminating Enterotoxigenic *B. fragilis*

○ホセイン エムディ ラジブ, Mahmoud Arbaah, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Priyanka Baranwal, 崔龍洙 (自治医科大・細菌学)

○Md Razib Hossain, Mahmoud Arbaah, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyanaga, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Priyanka Baranwal, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Sch. Medicine, Jichi Medical Univ.)

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) is implicated in the development of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. However, current technologies are unable to specifically eliminate target bacteria from the intestinal microbiota without inducing dysbiosis. This study aimed to establish a method for evaluating the bactericidal activity of wild-type phages against ETBF using a mouse infection model. The wild-type phage (Φ12-7), targeting ETBF, was isolated from the Jichi Medical University sewage plant and exhibited a host range of 79% (33 out of 42 strains). To enable in vivo evaluation, a rifampicin-resistant *B. fragilis* (BF12) was generated. Mice were inoculated with 10⁸ CFU of BF12 at 24-h intervals over a 72-h. Subsequently, wild-type phage Φ 12-7 was administered at multiplicities of infection (MOIs) of 10 and 100 at 8-h intervals over a 48-h. Fecal samples were collected at every 24-h from the start of bacterial administration to monitor bacterial loads. Phage treatment resulted in a significant reduction in BF12 numbers within 24-h. These findings underscore the potential of phage therapy to selectively target pathogenic bacterial strains without disrupting overall balance of the gut microbiome. This approach provides a promising foundation to selectively eliminate target bacteria while preserving the beneficial microbiome essential for overall health.

FL3-11/P2-042

ウシ消化管内における大腸菌の空間的分布と多様性

○井口 純¹, 小野 雅弥², 菊地 泰生² (1宮崎大・農・動植物資源生命, ²東大・新領域)

Spatial distribution and diversity of *Escherichia coli* in the bovine gastrointestinal tract

○Atsushi Iguchi¹, Masaya Ono², Taisei Kikuchi² (1Fac. Agr., Miyazaki Univ., ²Grad. Sch. Front. Sci., Tokyo Univ.)

【目的】宿主が保有または排菌する細菌の検査や調査では、通常、便や直腸スワブが検体として用いられるが、それらに含まれる細菌が消化管のどこに由来するのかわからない。ウシの消化管では、それぞれの部位で特有の細菌叢を構成していると予想されるが、その詳細はほとんど分かっていない。そこで本研究ではウシ一頭の消化管 (全長約 50m) を丸ごと用いて、各所における細菌叢の解析と大腸菌に注目した空間的分布と多様性について調べた。【材料・方法】県内食肉処理場において解体された乳用牛一頭の消化管 (第一胃から肛門まで) を取得し、計 20 箇所から内容物を採取した。検体から DNA を抽出し、メタ 16S rRNA 解析 (V3-V4 領域) を行った。さらに、検体を DHL 寒天平板培地に塗抹して培養し、生育した大腸菌様のコロニーを各検体につき最大 20 個の菌し、それぞれの血清型遺伝子型 (Og 型) を PCR 法で判定した。並行して、検体を mEC 液体培地に接種し、培養液から精製した DNA を用いて病原性遺伝子を確認した。陽性となった培養液を DHL 寒天平板培地に塗抹して培養し、上記遺伝子保有株の単離を試みた。【結果・考察】第一胃から第二胃 (上流) および盲腸以下 (下流) の検体からは多数の大腸菌が単離できたのに対し、第三胃から盲腸まで (中流) の検体からは単離できないか僅かな大腸菌しか単離できなかった。上流から単離された 80 株は 13 種類の Og 型に分離され、下流から単離された 120 株は 3 株を除く全てが OgGp7 (O2 または O50) であった。以上の結果より、上流には多様な大腸菌が存在し、下流には特定クローン株が優勢して定着していると示唆された。本会では菌叢解析と病原大腸菌分布の結果も含めて発表したい。

FL3-12/P2-049

***Chlamydia trachomatis*(L2/434/Bu)の酸素分圧依存的な感染細胞適応機構においてミトコンドリアが果たす役割**

○辰宮 大翼, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

The role of mitochondria in the cellular adaptation mechanism of *Chlamydia trachomatis* (L2/434/Bu)

○Tsubasa Tatsumiya, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

性感染症起因菌クラミジア (*Chlamydia trachomatis*, 以下 Ct) は、感染細胞内に形成する封入体の中で増殖する偏性細胞内寄生性細菌である。これ迄の私達は、Ct が 21%通常酸素に比べ 2%低酸素環境の細胞内で 100 倍程度良く増殖することを発見した。また Ct が炎症応答の惹起に関わる p38MAPK と CREB を通常酸素環境で利用することも見出した。さらに低酸素環境における Ct の細胞での増殖が、細胞の生存性を維持する Akt のリン酸化 (Ser473) に依存することも分かった。一方、これら Ct 標的分子の制御にミトコンドリア (Mt) が関与することが報告されている。そこで既に確立した Mt 機能不全 (Mt^d) 細胞を用いて、細胞内での Ct 増殖の様子を確認するとともに、Ct 感染時に起こる p38MAPK, CREB, Akt リン酸化に与える影響を検討した。感染実験には、GFP 発現 Ct(L2/434/Bu) と HEp-2 細胞を用いた。2%低酸素はガス置換型チャンバーで構築した。Mt^d 細胞は、HEp-2 細胞を臭化エチジウムで 6 ヶ月間暴露して確立し、Mt ゲノム上の Cox2 と D-loop の欠落、NADPH/NADH 量が 10 倍程度増加していた。形態学的には Mt の縮退が確認された。この Mt^d 細胞に Ct を感染させると、通常酸素環境ではその細胞内増殖が正常細胞に比べ 1/1000 程度に減少したが、低酸素環境では正常細胞と遜色なく増殖した。Mt^d 細胞では酸素分圧に関わらず感染早期 (2hpi) に Akt(Ser473)はリン酸化されるが、p38MAPK と CREB のリン酸化については変化が認められなかった。これらの結果から、Mt は Akt リン酸化のタイミングを規定し、タイミングを損なうと特に通常酸素では Ct が増殖できないことが明らかとなった。現在、Mt^d 細胞と正常細胞の遺伝子発現レベルの網羅的な比較解析を行っている。

FL3-13/P2-050

Effect of a mutation in *metK* from BCG on the SAM synthesis activity

○西谷 悠希^{1,2}, 武部 克希³, 佐藤 啓子⁴, 土佐 郁恵², 中山 真彰², 有村 友紀¹, 阿戸 学⁵, 飯田 征二¹, 大原 直也² (¹岡山大院・医歯薬・顎口腔再建外科学, ²岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ³岡山大院・医歯薬・歯科薬理学, ⁴長大・院医歯薬・フロンティア口腔科学, ⁵国立感染研・感染制御)

○Yuki Nishiya^{1,2}, Katsuki Takebe³, Keiko Sato⁴, Ikue Tosa², Masaaki Nakayama², Yuki Arimura¹, Manabu Ato⁵, Seiji Iida¹, Naoya Ohara² (¹Dept. Oral Maxillofac. Reconst. Surg., Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Dept. Dent. Pharmacol., Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁴Dept. Front. Oral Sci., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ⁵Dept. Mycobacteriol., Leprosy Res. Cent., NIID)

Purpose: Para-aminosalicylic acid (PAS) is a classic antituberculosis drug that inhibits folate metabolism. We found that a PAS resistant BCG strain (PAS13) possessed a point mutation in *metK* encoding S-adenosylmethionine (SAM) synthetase. In this study, we investigated the effect of this mutation on SAM synthesis activity. **Methods:** 1) SAM synthesis activity of PAS13 was measured. 2) Wild-type and mutated *metK* proteins were expressed as His-tagged form in *Escherichia coli* and these recombinant proteins were purified with affinity chromatography. 3) SAM synthesis activity was measured with recombinant proteins. **Results & Discussion:** SAM synthesis activity of PAS13 strain was significantly lower than that of the parent strain. The enzyme activity of the mutant protein was also significantly lower than that of the wild-type protein. The results of this study and comparison of the predicted structure of MetK in this bacterium with those of MetK homologues in other species suggested that this point mutation in MetK identified in PAS13 is located at the ATP binding pocket, i.e., it is directly related to the rate of ATP uptake and the rate of SAM deviation, which contributes to enzyme turnover frequency of MetK.

FL3-14/P2-051

長期培養した *Corynebacterium matruchotii* の菌体内元素分析

大原 直子¹, 小川 みどり², 武部 克希³, 土佐 郁恵⁴, 齋藤 光正², ○大原 直也^{4,5} (¹岡山大院・医歯薬・歯科保存, ²産業医大・医・微生物, ³岡山大院・医歯薬・歯科薬理, ⁴岡山大院・医歯薬・口腔微生物, ⁵岡山大院・医歯薬・腸健康科学研セ)

Intracellular elemental analysis of long-term cultured *Corynebacterium matruchotii*

Naoko Ohara¹, Midori Ogawa², Katsuki Takebe³, Ikue Tosa⁴, Mitsumasa Saito², ○Naoya Ohara^{4,5} (¹Dept. Operative Dent., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., UOEH Univ., ³Dept. Dent. Pharm., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁴Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁵Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci.)

【目的】*Corynebacterium matruchotii* は口腔内に存在し、歯石形成との関連性が従来から示唆されてきた。本菌を長期培養し、菌体成分を元素分析することで、細菌の石灰化機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】*C. matruchotii*JCM9386を用いた。Ennever ら (J Dent Res, 1971) の培地をもとに結晶核としてシリカ (Si) を加えた。塩化カルシウムを含む培地 (添加群) と含まない培地 (非添加群) を用いて細菌の石灰化を比較検討した。植菌後、37°C で 4 年間静置し、静置後の菌体を走査電子顕微鏡 (SEM, 日立 Regulus 8100) と透過電子顕微鏡 (TEM, 日本電子 JEM-1400 Plus) にて観察した。またエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて菌体内の元素分析を行った。

【結果と考察】SEM 観察にて、非添加群の菌体は長く、滑沢な表面を示すものが多いのに対し、添加群の菌体は非添加群より短く、菌表面は不整で菌体外の凝集物が多く観察された。TEM 観察では、添加群に菌体内に針状結晶物が認められ、同部の元素分析では、リンとカルシウムのピークが明瞭に観察された。非添加群では結晶物は観察されなかった。本菌は菌体内のカルシウムのみでは石灰化せず、菌体外からカルシウムを取込むことにより、菌体内にリンイオンとカルシウムイオンからなる結晶化物が形成されることが示された。

FL3-15/P2-052

The effect of amino acid and succinate metabolism on *Campylobacter jejuni* virulence

○牧本 真奈^{1,2}, 下畑 隆明^{1,2}, 福島 志帆¹, 山中 咲季¹, 上番増 喬¹, 馬渡 一論¹, 高橋 章¹ (¹徳島大・院医歯薬学研究部・予防環境栄養学, ²福井県立大・海洋生物資源)

○Mana Makimoto^{1,2}, Takaaki Shimohata^{1,2}, Shiho Fukushima¹, Saki Yamanaka¹, Takashi Uebanso¹, Kazuaki Mawatari¹, Akira Takahashi¹ (¹Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch., ²Marine Bio., Fukui Prefect Univ.)

Background: *Campylobacter jejuni* (Cj) is a cause of gastrointestinal foodborne disease in human. Cj has a unique metabolism, suggesting intestinal nutrient composition is closely associated with Cj virulence, but the association between Cj metabolism and the virulence is unclear. To reveal the relationship between metabolism and virulence during Cj infection, we estimated critical metabolites and investigated the contribution of those in the virulence of Cj in an in vitro model. **Method:** To investigate the crucial metabolites involved in Cj infection, culture supernatant was analyzed by Capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). In addition, we assessed the effect of the metabolite on the Cj adhesion and invasion to host cells. The intracellular bacterial cell number was estimated by gentamycin protection assay. **Results & Discussion:** CE-MS analysis revealed the reduction of amino acids and induction of succinic acid in culture supernatant of Cj. The succinate secretion in the culture medium was depending on the aspartate and glutamate utilization. Moreover, succinate stimulation increased the number of bacteria adhering to and invading to host cells with the increase expression of virulence genes. Our results suggest that Cj produces succinate and modulates own virulence by utilizing amino acids.

FL3-16/P2-053

Identification of Oral Bacteria and Metabolites Associated with Periodontal Disease

○石原 央子, 迫 美里, 堤 康太, 藤井 愛実, 橋本 泰樹, 佐藤 惇志, 近澤 貴士, 柿澤 恭史 (ライオン (株)・研究開発本部)

○Chikako Ishihara, Misato Sako, Kota Tsutsumi, Naumi Fujii, Daiki Hashimoto, Atushi Sato, Takashi Chikazawa, Yasushi Kakizawa (R&D Headquarters., Lion Co., Ltd.)

Introduction: Dysbiosis of the oral microbiome has been implicated in the onset and progression of periodontal diseases. An altered oral microbiome can significantly affect the concentration and composition ratio of bacterial-derived metabolites, thereby contributing to disease development. This study aims to identify the metabolites correlated with various bacterial species significantly implicated in periodontal disease. **Methods:** Mouth-rinsed water was collected from 24 patients with periodontal disease and 22 healthy individuals. We isolated bacterial species that are significantly more prevalent in periodontal disease. The correlations between these various bacterial species and metabolites were assessed using Spearman's rank-order correlation. **Results:** We isolated 25 bacterial species that were significantly more prevalent in periodontal disease, and identified 20 metabolites that were positively correlated with the increase of these bacteria. The identified metabolites included short-chain fatty acids, sugar metabolites, and amino acid metabolites such as propionate, succinate, and citrulline. **Conclusion:** We identified 20 metabolites that are significantly associated with bacteria prevalent in periodontal disease. These findings are considered crucial insights for investigating the involvement of the oral microbiota and its metabolites in periodontal disease.

FL3-17/P2-059

Inhibition of sodium ion flux in the flagellar stator from *Vibrio* due to an inhibitor binding

○錦野 達郎^{1,2}, 竹川 宜宏³, 岸川 淳一⁴, 廣瀬 未果⁴, 小嶋 誠司⁵, 本間 道夫⁵, 加藤 貴之⁴, 今田 勝巳³ (¹名工大・院工・工, ²名工大・オプトバイオテクノロジーセンター, ³阪大・院理・高分子化学, ⁴阪大・蛋白研, ⁵名大・院理・生命理学)

○Tatsuro Nishikino^{1,2}, Norihiro Takekawa³, Jun-ichi Kishikawa⁴, Mika Hirose⁴, Seiji Kojima⁵, Michio Homma⁵, Takayuki Kato⁴, Katsumi Imada³ (¹Dept. Life Sci. & Applied Chem., Nagoya Inst. of Tech., ²OptoBioTech. Res. Ctr., Nagoya Inst. of Tech., ³Dept. Macromole. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., ⁴Inst. for Protein Res., ⁵Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Many bacteria move toward favorable environments using flagellum. A polar flagellum of *Vibrio* is rotated by a sodium ion-driven motor, which is composed of the stator and the rotor. Five PomA and two PomB molecules form a stator complex that works as a sodium ion channel. Phenamil, an amiloride derivative compound, binds to the PomAPomB complex and inhibits ion flux. To elucidate sodium ion flux pathway in the PomAPomB complex and inhibition mechanism of phenamil, we performed single particle analysis by cryo-electron microscopy, and found two putative channel pores, named short and long tunnels, in the PomA-PomB interface. We found two sodium ions in a long tunnel composed of two cavities, one is hydrophobic and the other is hydrophilic. The size of the former cavity is 2.4 angstrom, which is close to that of a hydrated sodium ion. The hydrophilic cavity contains the other sodium ion near the bottle neck region that separates the two cavities. Considering the distance between the sodium ion and the hydrophilic residues, the sodium ion is hydrated or partially dehydrated. We also solved the structure of phenamil-bound PomAPomB complex, revealing that a phenamil molecule binds to the PomA-PomB interface, where is close to the short tunnel. This suggests that phenamil does not directly block the sodium ion pathway but may disturb the PomA rotation coupled with sodium ion flux.

FL3-18/P2-060

LafTU functions as the lateral flagellar stator of *Vibrio alginolyticus*

○小嶋 誠司¹, 横山 和輝¹, 竹川 宜宏² (¹名古屋大・院理・生命理学, ²阪大・院理・高分子科学)

○Seiji Kojima¹, Kazuki Yokoyama¹, Norihiro Takekawa² (¹Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., ²Dept. Macromol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Vibrio alginolyticus induces numerous lateral flagella and swarms on the surface or in viscous environments. Rotation of the lateral flagellum is powered by a H⁺-driven motor, but its stator units have not been studied yet. Based on sequence homology, lateral stator components are assumed to be encoded by *lafT* and *lafU*. Here we cloned these genes and deleted from the genome to ask whether LafTU functions as lateral flagellar stator. After cloning, we deleted *lafT* and *lafU* from the genome of strain YM19, which lacks polar flagellum but constitutively produces lateral flagella. On soft agar plate, YM19 formed a small motility ring, but the YM19Δ *lafTU* strain did not. On hard agar plate, YM19 formed a large motility ring, whereas YM19Δ *lafTU* completely lost the formation of ring. Electron microscopy showed that YM19Δ *lafTU* cells formed wild-type level of lateral flagella, confirming that *lafTU* deletion did not affect lateral flagellar formation. Ectopic expression of LafTU from a plasmid restored motility of the Δ *lafTU* strain, but mutation at critical Asp conserved in the stator B subunit (LafU D31) abolished lateral flagellar motility. From these results, we conclude that LafTU functions as the lateral flagellar stator. Currently we examine the interaction of LafTU with FliL, the single transmembrane protein believed to support stator units incorporated into the motor.

FL3-19/P2-064

構造生物学に基づいた歯周病菌に存在するシャペロン様タンパク質の機能解明

○武部 希希¹, 佐藤 啓子², 宮川 柊兵³, 土佐 郁恵⁴, Yujiang Chen⁴, 加島 佳奈⁵, 大原 直也⁴ (¹岡山大院・医歯薬・歯科薬理学, ²長大・院医歯薬・フロンティア口腔科学, ³阪大院・薬学研究科・量子生命情報薬学分野, ⁴岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ⁵阪大院・歯学研究科・顎口腔腫瘍外科学講座)

Functional analysis of chaperone-like protein in periodontitis bacteria based on structural biology

○Katsuki Takebe¹, Keiko Sato², Shuhei Miyakawa³, Ikue Tosa⁴, Yujiang Chen⁴, Kana Kashima⁵, Naoya Ohara⁴ (¹Dept. Dent. Pharmacol, Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Front. Oral Sci., Grad. Schl. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ³Dept. Quantum Life Sci and Bioinfo., Grad. Sch. Pharma. Sci., Osaka Univ., ⁴Dept. Dent. Pharmacol, Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁵Dept. Oral & Maxillofac. Onco and Surg, Grad. Sch. Dent., Okayama Univ.)

輸送タンパク質である三量体シャペロン Skp は、大腸菌では β-barrel assembly machinery (BAM) ファミリーと協調して機能することが知られている。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) では、同一オペロン上に 2 種類の Skp タンパク質 SkpA と SkpB が存在し、SkpA は 9 型分泌装置との関連が明らかにされたが、SkpB の構造や機能は未だ不明な点が多い。本研究では、X 線結晶構造解析と計算科学により、*P. gingivalis* における SkpB の構造生物学的な特色を明らかにし、遺伝子変異株の作製により、その機能解析を行なった。SkpB 欠損株に導入した SkpB 発現プラスミドの存続性から SkpB は *P. gingivalis* に必須であることが示唆された。大腸菌で作製した rSkpB の立体構造を決定したところ、大腸菌 Skp と同様に、特徴的な長い 2 つの α helix 領域が存在し、三量体を形成していた。一方で、SkpA と異なり、9 型分泌装置との相互作用に重要な α helix 領域のループ構造は存在しなかった。分子動力学シミュレーションとフラグメント分子軌道法の計算結果より、三量体形成には Tyr135 が重要であることが示唆された。また、大腸菌 Skp とは異なる領域で、部分的な α helix の解けが生じることが明らかになった。以上の結果に加え、SkpB のオペロンに BamA 類似タンパク質が存在することから、SkpB は SkpA とは異なり 9 型分泌装置とは関連せず、大腸菌 Skp と同様に BAM ファミリーと協調して機能する可能性が示唆された。一方で、構造変化の違いは SkpB と大腸菌 Skp の輸送タンパク質の大きな違いに関与する可能性があり、今後、本研究により明らかになった重要残基を変異させ、質量分析と組み合わせる事で輸送タンパクの同定を行う。

FL3-20/P2-066

祖先推定アプローチによる肺炎球菌が高病原化する過程で喪失した遺伝子の探索

○大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也³, 川端 重忠^{1,4} (¹阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオインフォ, ³医薬基盤・健康・栄養研, ⁴阪大・CIDER)

Ancestral estimation revealed pneumococcal genes abandoned to obtain virulence

○Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi³, Shigetada Kawabata^{1,4} (¹Dept. Microbiol., Sch. Dent., Osaka Univ., ²Bioinformatics Res. Unit, Sch. Dent., Osaka Univ., ³NIBIOHN, ⁴CIDER, Osaka Univ.)

細菌ゲノム解析において、収集した細菌株が現に保有する遺伝子は観察可能であるが、進化の過程で喪失した因子を観測することはできない。本研究では肺炎球菌に着目し、共通祖先の遺伝子の保有状態を推定することで喪失した因子を探索し、致死的な侵襲性感染症の病態との関連を解析した。

1916年から2018年にかけて全世界で分離された12,592株の肺炎球菌の全ゲノム情報を収集し、パンゲノム解析プログラムRoaryを用いて42,473遺伝子を検出した。また、集団が共通して保有するコア遺伝子を決出し、最尤法を用いて系統樹を作成した。続いて、分離年代の情報に基づきRパッケージBactDatingを用いて系統樹の再構築をおこなったのち、侵襲性と非侵襲性由来株とを分ける病原性関連分岐を統計学的に決定し、25分岐を同定した。全ての分岐における各遺伝子の保有確率をプログラムPastMLにより算出し、病原性関連分岐から子分岐に至る過程で保有確率が低下する遺伝子を同定した。

侵襲性由来株の割合がそれぞれ66%と18%の系統を分ける病原性関連分岐において、侵襲性率66%の高病原性系統は転写制御因子および3つのABCトランスポーターをコードする遺伝子群を喪失していた。一方、別の病原性関連分岐では侵襲性率4%の低病原性系統に分かれる過程でトランスボザゼとチロシンキナーゼをコードする遺伝子を喪失していることが予測された。

本研究では、祖先推定の手法を利用し、進化の過程で獲得または喪失した遺伝子を推定することで侵襲性肺炎球菌感染症の病態との関連を解析した。特定された遺伝子群は感染局所における適応変化に寄与する可能性が考えられる。

FL3-21/P2-067

Deep learning-based enzyme screening to identify orphan enzyme

○廣田 佳亮¹, 山田 拓司^{1,2,3,4} (¹科学大・生命理工, ²株式会社メタジェン, ³メタジェンセラピューティクス株式会社, ⁴株式会社digzyme)

○Keisuke Hirota¹, Takuji Yamada^{1,2,3,4} (¹LST, Science Tokyo, ²Metagen, Inc., ³MGTx, ⁴digzyme, Inc)

Progress in sequencing technology has yielded large numbers of protein sequences, including enzymes which are proteins that catalyze specific chemical reactions. However, despite growth of enzyme databases, there are many enzymes with confirmed activities yet without sequence information called orphan enzymes. This gap between known proteins and enzyme reactions suggests that some proteins of unknown function might be orphan enzymes. However, most existing in silico enzyme screening tools have limited applicability to orphan enzymes. Therefore, a novel computational approach designed for orphan enzyme screening is needed. In this study, we propose a deep learning-based framework for enzyme screening that takes protein sequences and enzyme reactions as inputs and evaluates their correspondence. The proposed method differs from previous studies in two aspects. First, our approach performs a two-step evaluation: classification of enzymes and non-enzymes, and prediction of their correspondence with enzymatic reactions of interest. Second, the proposed method does not rely on enzymatic reaction labels, such as EC numbers. To show our proposed method's effectiveness, we explored 1,233 orphan enzymes involved in the metabolism of human gut bacteria. This study establishes the computational enzyme screening tool and enables a fast and large-scale exploration of orphan enzymes.

FL3-22/P2-068

Detection of 1000s beneficial genome changes within a species

○小林 一三¹ (¹法政大・マイクロナノ, ²基礎生物学研)

○Ichizo Kobayashi¹ (¹Micro-nano, HOSEI Univ., ²NIBB)

It is difficult to identify beneficial genome changes because most of the genome changes are neutral. We solved this problem with a model organism with free homologous recombination and discrete population structure: *Helicobacter pylori*.

We collected 1000s of its genome sequences, half from *Helicobacter pylori* Genome Project and the remainder from the open genomes. We divided them into small groups by sequence sharing (PCA-IUMAP) and identified their highly subgroup-specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Their high N/S (amino-acid changing substitution/ amino-acid retaining substitution) indicated most of them are adaptive. To our surprise, when mapped on protein structures, most of these SNPs are around a site critical for their structure/function such as an active/binding site, a hinge, a subunit interaction site and an apex. They are often on host interaction proteins: known/novel virulence factors, sensor-motors, drug-resistance proteins, outer-membrane proteins, transporters, and restriction-modification systems. They are also on proteins for basic functions, especially translation, and in microbiome-related proteins. (I. Kobayashi, T. Sakamoto, H. Nishide, I. Uchiyama, H. Innan, *Helicobacter pylori* Genome Project Research Network (C. Camargo; C. Rabkin), N. Osada; Submitted)

FL3-23/P2-069

健康保菌者から分離された志賀毒素産生性大腸菌の薬剤耐性遺伝子の解析

○今井 有未¹, 金子 寛², 奥野 未来¹, 山本 武司¹, 野口 秋雄², 佐藤 寿夫², 小椋 義俊¹ (¹久留米大・医・感染医学, ²株式会社 日本微生物研究所)

Analysis of antibiotic resistance genes in STEC isolated from asymptomatic carriers

○Yumi Imai¹, Hiroshi Kaneko², Miki Okuno¹, Takeshi Yamamoto¹, Akio Noguchi², Toshio Sato², Yoshitoshi Ogura¹ (¹Div. Microbiol. Dept. Infect. Med. Kurume Univ. Sch. Med., ²Japan Microbiological Laboratory Co., Ltd.)

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は下痢や出血性大腸炎に加えて溶血性尿毒症症候群など重篤な合併症の原因となる。STECはウシなどの反芻動物の腸管に常在しており、汚染された牛肉や生野菜などの食品を介してヒトへと感染し、ヒトからヒトへの二次感染も問題となる。日本ではSTEC感染の拡大防止のため、食品従事者や福祉施設労働者を対象に定期的な検便検査が行われているが、被験者の約0.03%がSTECを健康保菌していることが判明している。STECは3類感染症のため、陰性化するまで就業規制される。STEC保菌者は抗菌薬により除菌が行われるが、長期間陰性化しない例もある。健康保菌者由来STECの薬剤耐性に関する研究はあまり行われていないため、本研究では健康保菌者由来STECの薬剤耐性遺伝子保有状況の調査を目的とし、検便分離株の大規模ゲノム解析を実施した。2021年に分離された健康保菌者由来STEC計495株のゲノム配列を決定した。薬剤耐性遺伝子はARG-ANNOTデータベースを用いてABRicateで解析した。その結果、495株のうち83株(17%)が薬剤耐性遺伝子を保有していた。アミノグリコシド耐性遺伝子が65株と最も多く、次いでスルホンアミド/トリメトプリム耐性遺伝子(52株)、テトラサイクリン耐性遺伝子(50株)であった。ホスホマイシン耐性遺伝子は5株、マクロライド耐性遺伝子は6株、キノロン耐性遺伝子は7株であった。さらにgyrA, gyrB, parC, parEのキノロン耐性決定領域(QRDR)内の変異をAMRFinderPlusで解析したところ、gyrAで14株、parCで1株、parEで6株、既知の変異が検出された。今後は現在行っている薬剤感受性試験の結果と合わせて健康保菌者由来STECの薬剤耐性保有状況を評価する予定である。

FL3-24/P2-071

ピロリ菌の塩基切り出し型制限酵素が胃がんを起こす

○福世 真樹¹, 高橋 規子^{2,3}, 花田 克浩⁴, 矢原 耕史⁵, 米澤 英雄^{3,6}, 長田 直樹⁷, 金田 篤志^{1,8}, 内山 郁夫⁹, 大崎 敬子³, 小林 一三^{2,3,10} (¹千葉大・医, ²東大・新領域, ³杏林大・医, ⁴大分大・医, ⁵感染研・薬剤耐性, ⁶東京歯大・微生物, ⁷北大・情報科学, ⁸千葉大・健康疾患オミックス, ⁹基生研・ゲノム情報, ¹⁰法政大・マイクロナノ)

Helicobacter pylori base-excision restriction enzyme in stomach carcinogenesis

○Masaki Fukuyo¹, Noriko Takahashi^{2,3}, Katsuhiko Hanada⁴, Koji Yahara⁵, Hideo Yonezawa^{3,6}, Naoki Osada⁷, Atushi Kaneda^{1,8}, Ikuo Uchiyama⁹, Takako Osaki³, Ichizo Kobayashi^{2,3,10} (¹Grad. Sch. Med., Chiba Univ., ²Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, ³Fac. Med., Kyorin Univ., ⁴Fac. Med., Oita Univ., ⁵Antimicrob. Resist. Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁶Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., ⁷Div. Bioeng. & Bioinf., Hokkaido Univ., ⁸Health & Dis. Omics Ctr., Chiba Univ., ⁹Lab. Genome Inform., Natl. Inst. Basic Biol., ¹⁰Res. Ctr. Micro/Nanotechnol., Hosei Univ.)

胃癌は本邦において年間 4 万人死亡する重大疾患であり、その主因はピロリ菌である。ピロリ菌の病原因子については CagA 等様々な因子が研究されているが、宿主ゲノムにどのように作用して発癌に至るのかは分かっていない。一方、私達は塩基を切り出す新しい型の制限酵素ファミリーを発見し、ピロリ菌にもこの酵素を発見した (Fukuyo et al. NAR, 2015, Zhang et al. NAR, 2017)。今回、我々はピロリ菌のこの酵素ファミリー HpPabI が胃がんを引き起こすのではないかとという仮説の検証を多方面から行い、以下の証拠を得た。(1) NIH のピロリ菌ゲノムプロジェクト HpGP 株 1000 株と公開ゲノムを合わせて調べたところ、「胃がん患者由来であること」と、「この制限酵素の遺伝子を無傷で持つこと」の間に強い関連を発見した。(2) この制限酵素の認識配列 GTAC の塩基切り出しサイト A での変異が、胃がんゲノムでは頻繁に起きていることを、4-mer 変異シグナチャー解析から突き止めた。その変異を持つ遺伝子には、胃がんでの役割が知られているものがあつた。(3) 培養ヒト細胞にピロリ菌を感染させると、この制限酵素がヒト染色体の切断を起こすことを、パルスフィールドゲル電気泳動で証明した。(4) 大腸菌の変異検出系で、この制限酵素が変異生成を上昇させた。さらに、この制限酵素の立体構造を予測し、DNA との結合サイトで多様化選択が起きたことを示した。これらの結果は、ピロリ菌のこの制限酵素が胃がんを起こすことを示す。他の種類のがんでも、k-mer 変異シグナチャーの解析から、同様な細菌-制限酵素の対を発見した。欄外共著者：石川健 11), 寺林健 4), 桂有加子 12) 11) 久留米大・生命科学, 12) 京大・ヒト行動進化

FL3-25/P2-079

A novel Retron targeting multiple tRNAs confers robust phage resistance

○アザム アアハエルマン, Matthew Imanaka, Wenhan Nie, 千原 康太郎, 小島 新二郎, 高橋 聖聖, 渡士 幸一, 氣賀 恒太郎 (国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Aa Haeruman Azam, Matthew Imanaka, Wenhan Nie, Kotaro Chihara, Shinjiro Ojima, Yoshimasa Takahashi, Koichi Watashi, Kotaro Kiga (Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases)

Retrons are bacterial defense systems that utilize reverse transcriptase (RT), multicopy single-stranded DNA (msDNA), and diverse effector proteins. Retron-Eco7, a type IA retron, targets tRNA-Tyr to inhibit phage infection. However, some phages evade this defense by overproducing tRNA-Tyr (Azam et al., Nat Commun 2024). In this study, we identified a novel type IA retron, retron-Kp85, from *Klebsiella pneumoniae*. Unlike retron-Eco7, retron-Kp85 blocks multiple phages from different genera. Overexpression of PtuA and PtuB from retron-Kp85 downregulated multiple bacterial tRNAs, suggesting that retron-Kp85 targets more than one tRNA to abort phage infection. Functional analysis confirmed that PtuA and PtuB serve as effector proteins in retron-Kp85, while the RT and non-coding region act as an antitoxin component, neutralizing PtuA and PtuB within the retron-Kp85 complex. Furthermore, screening escaper phages revealed that a phage-derived exonuclease triggers retron-Kp85 activation. In vitro assays demonstrated that this exonuclease cleaves retron msDNA, releasing PtuA and PtuB from the retron complex. Our findings reveal the versatility of retron type IA systems and their potential to provide broad-spectrum phage resistance. This knowledge could be exploited to develop novel strategies for engineering phage-resistant bacteria.

FL3-26/P2-080

Identification of novel conjugation gene of pELF-type linear plasmid of *Enterococcus faecium*

○久留島 潤¹, 富田 治芳^{1,2} (¹群馬大・医・薬剤耐性菌実験施設, ²群馬大・医・細菌学)

○Jun Kurushima¹, Haruyoshi Tomita^{1,2} (¹Lab. Bact. Drug Resist., Sch. Med., Gunma Univ., ²Dept. Bact., Sch. Med., Gunma Univ.)

Enterococcus faecium is the one of the most important antimicrobial resistant bacterial pathogens causing opportunistic infection (e.g. vancomycin resistant enterococci, VRE). Recent genomic epidemiological study revealed that pELF-type linear plasmid family carry those antimicrobial resistance genes in *E. faecium* strains. pELF-type linear plasmids are highly conjugative in experimental condition but has no conventional conjugation gene set identified in circular plasmids. Here, we first developed improved genetic engineering system optimized for *E. faecium* and identified novel conjugation gene (*traC*) that is essential for conjugative transfer of pELF2, a model plasmid for pELF-type plasmid family with VanA-type vancomycin resistance gene. Isogenic pELF2 mutant with in-frame deletion of *traC* failed conjugative transfer to recipient strain in condition of filter or broth mating. Ectopic expression of *traC* gene from synthetic plasmid vector in the mutant completely restored the impaired conjugation. The *traC* gene is conserved among pELF-type plasmids and encodes hypothetical protein with transmembrane domain. Finally, transcriptome analysis showed the *traC* belongs to an operon, designated *tra*_{pELF2} operon. The most of genes in the *tra*_{pELF2} operon show no similarity to conventional conjugation genes, suggesting that pELF-type linear plasmids have unique conjugation system.

FL3-27/P2-084

κ-シャペロン・アッシャー(CU)線毛におけるオペロン構造の多様性

○井上 陽晴¹, 和田 崇之² (¹大阪公大院・生・食栄養・微生物, ²大阪公大・大阪国際感染症研究センター)

Diversity of operon structure in kappa-chaperone usher (CU) fimbriae

○Hiharu Inoue¹, Takayuki Wada² (¹Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ²Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

【背景】シャペロン・アッシャー (CU) 線毛はグラム陰性菌の菌体構造であり、菌体外の環境や宿主に接着する役割を担う。大腸菌はゲノム内に平均 10 個程度の CU 線毛オペロンを保有し、それぞれが異なる接着特性を発揮して生存ニッチを拡大する役割を果たしていると考えられる。CU 線毛は 6 つの系統群に分類できるが、その 1 つである κ-CU には家畜下痢症の原因となる ETEC が保有する F4(K88), F5(K99), F18 のほか、ヒト細胞への接着因子として知られる CS13 などが含まれる。【目的】CU 線毛系統群の 1 つである κ-class に注目し、大腸菌ゲノムにコードされた κ-CU オペロンの遺伝的多様性と構造的特徴を明らかにすることを目的とした。【方法】BV-BRC データベースより、ヒトおよび家畜由来の大腸菌ゲノム配列 (17,799 株) を取得した。そこからアッシャー遺伝子を探し、前後の ORF を抽出して κ-CU オペロンを構成する遺伝子のオースログ関係を網羅的に抽出した。【結果】κ-CU 線毛は 1,624 株 (9.1%) が保有し、その保有頻度は分離宿主によって異なった。全ての κ-CU 線毛 (1,752 本) は既知の CU 線毛 (K99, F18, K88) に対応する 3 つの主要系統に細分類された。このうち、K88 系統におけるオペロン構造は大きく 2 パターンに分類され、主要アドヘジン遺伝子のマルチコピー化や、関連遺伝子との共発現を示唆する多様な遺伝子構成が確認された。【考察】κ-CU はヒトを含む多様な動物宿主に接着能をもたらしことが報告されており、アドヘジンの遺伝的多様性・オペロン構造変化がその宿主選択性に関与している可能性が示唆される。

FL3-28/P2-085

クライオ電子顕微鏡による ETEC 由来 IV 型線毛 CFA/III の立体構造解析

○馬場 輝星¹, 沖 大也², 村本 龍希¹, 今井 友也⁴, 吉田 卓也³, 上田 卓見³, 松田 重輝^{2,5}, 飯田 哲也^{2,5}, 中村 昇太^{2,5}, 河原 一樹^{3,5} (¹大阪大・薬, ²大阪大・微研, ³大阪大院・薬, ⁴京都大・生存研, ⁵大阪大・感染症総合教育研究拠点)

Cryo-electron microscopy structure of Type IV pilus CFA/III from ETEC

○Teruhoshi Baba¹, Hiroya Oki², Ryuki Muramoto¹, Tomoya Imai⁴, Takuya Yoshida³, Takumi Ueda³, Shigeaki Matsuda^{2,5}, Tetsuya Iida^{2,5}, Shota Nakamura^{2,5}, Kazuki Kawahara^{3,5} (¹Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ²RIMD, Osaka Univ., ³Grad. Sch. Pharm. Sci. Osaka Univ., ⁴RISH, Kyoto Univ., ⁵CIDER, Osaka Univ.)

腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の病原性発現には、宿主腸管上皮への定着が必須であり、その機能は定着因子が担っている。ETEC が保有する定着因子の一種である定着因子抗原 III (CFA/III) は、*cof* オペロンと命名された遺伝子クラスターの働きにより形成される IV 型線毛であり、ピリンと呼ばれる構成要素が螺旋状に会合した糸状構造体である。IV 型線毛は、腸管上皮への付着、凝集、バイオフィーム形成、可溶性定着因子の分泌など、細菌定着における様々な過程に関与することから、ワクチンや定着阻害剤の有望な標的と考えられている。しかしながら、巨大かつ不溶性である特徴から、その構造生物学的研究は進んでおらず、これまでに得られた IV 型線毛の構造モデルは、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴法により得られたサブユニット構造を、中〜低分解能で得られた線毛の電子顕微鏡 (EM) マップに当てはめた推定構造であった。そのため、本研究では、クライオ EM を用いて CFA/III の立体構造を近原子レベルで明らかにし、より正確な構造情報を得ることを目的とした。CFA/III 産生性大腸菌株を CFA 寒天培地により培養し、菌体上に線毛を発現させた後、超遠心分離などの手法により線毛成分を精製し、クライオ EM により構造解析を実施した。その結果、約 2.4 Å の高い分解能でクライオ EM マップを得ることに成功し、得られた EM マップから、アミノ酸側鎖を含む CFA/III フィラメントの立体構造を構築することができた。本発表では、得られた近原子レベルの構造情報と種々のアミノ酸変異実験に基づき、ETEC が保有する IV 型線毛の形成機構および構造安定性について議論する。

FL3-29/P2-090

Identification of *Helicobacter pylori* virulence factor that regulates bacterial pathogenicity

○Naomi Aini¹, Weichen Gong², 西田 叶², 三好 智博¹, 三室 仁美¹ (¹大分大・グローバル, ²大阪大・微研)

○Naomi Aini¹, Weichen Gong², Kana Nishida², Tomohiro Miyoshi¹, Hitomi Mimuro¹ (¹RCGLID, Oita Univ., ²RIMD, Osaka Univ.)

Helicobacter pylori is one of the main risk factors of gastric cancer. Outer membrane proteins (OMPs) of *H. pylori* are essential for the attachment of the bacteria to the gastric epithelial cells to establish infection. PomX is an OMP reported to be involved in bacterial adhesion, however the host receptor remains uncharacterized. Phase variation plays a pivotal role in bacterial adaptability and survival within the host, and *pomX* is known to be a phase-variable gene. We aim to investigate whether PomX is involved in bacterial pathogenesis and whether the phase variation of *pomX* is important for persistent infection. A murine phase infection model was used to evaluate the role of PomX in stomach colonization. We found that ATCC43504 *pomX*-deficient strains showed reduced colonization of the stomach *in vivo*, while a phase-locked PomX mutant did not cause a persistent infection. To identify potential host-binding partners of the PomX protein, pull-down assays were carried out and several candidates were detected. Our findings indicate preliminary evidence of the importance of PomX maneuvering the host immune system, though the underlying mechanisms remain to be elucidated.

FL3-30/P2-169

Isolation of hexavalent chromium-reducing *Staphylococcus sciuri* 3W100 strain from tannery effluent

○Tanjina Afrin Hira^{1,2}, Samiul Alam Rajib^{2,3}, Mahia Ferdushi² (¹Dept. Microbiology, Sch. Medicine, Shimane Univ., Japan, ²Dept. Pharmacy, BRAC Univ., Dhaka, Bangladesh, ³Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto Univ.)

○Tanjina Afrin Hira^{1,2}, Samiul Alam Rajib^{2,3}, Mahia Ferdushi² (¹Dept. Microbiology, Sch. Medicine, Shimane Univ., Japan, ²Dept. Pharmacy, BRAC Univ., Dhaka, Bangladesh, ³Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto Univ.)

Purpose: Hexavalent chromium is a highly toxic metal, and its concentration in nature is increasing enormously. This study aimed to identify a bacterial strain capable of reducing hexavalent chromium to the neutral trivalent chromium. **Methods:** A water sample was collected from the Buriganga river in Dhaka, Bangladesh near the Hazaribag tannery industry area, and the isolated strain was named 3W100. 3W100 was exposed to chromium (VI) to measure its ability of conversion to chromium (III). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was done to evaluate chromium resistance. 3W100's genome was sequenced, and a phylogenetic tree was constructed to determine its classification. **Results:** 3W100 showed chromium-reducing activity and the optimized condition was 37°C and pH 5.5. 3W100 tolerated chromium concentrations up to 5 mM, as confirmed by MIC. Phylogenetic analysis identified 3W100 as closely related to *Staphylococcus sciuri*. **Discussion:** 3W100 shows promising capacity in reducing toxic Chromium (VI) from contaminated environments.

FL3-31/P2-171

Engineering Bacteriophages for Enhanced Intracellular Delivery Against *Mycobacterium tuberculosis*

○島守 祐月, 渡邊 真弥, Orawee Kaewprasert, Sharmin Sultana, 齋藤 明美, Srivani Veerananarayanan, 宮永 一彦, 相羽 由詞, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医大・医・感染免疫・細菌学)

○Yuzuki Shimamori, Shinya Watanabe, Orawee Kaewprasert, Sharmin Sultana, Akemi Saito, Srivani Veerananarayanan, Kazuhiko Miyana, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Dept. Infection and Immunity, Jichi Med. Univ.)

The rapid spread of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) has significantly compromised the effectiveness of traditional anti-tuberculosis treatments, posing a major global public health threat. As a result, the developing new, effective, and safe treatments for tuberculosis has become a critical international priority. In response to these challenges, bacteriophage-based therapy (phage therapy) has gained attention as a promising approach for treating drug-resistant bacterial infections, with several clinical trials underway worldwide. However, the intracellular survival of *M. tuberculosis* within host cells presents a significant barrier to phages to effectiveness, as phages struggle to reach and infect these bacteria. To overcome this problem, we developed engineered mycobacteriophages using TM4 phage as a model. The modification involved inserting peptides into the phage capsid, which significantly enhancing the ability of the modified TM4 phage to be delivered into host cells, compared to the wild-type phage. This study aims to apply this technology to develop novel phage-based therapies for tuberculosis.

FL4-01/P2-091

壊死性筋膜炎マウスモデルの病態形成に *Streptococcus pyogenes* の溶血毒素が果たす役割の検討

○森 あり沙¹, 広瀬 雄二郎¹, 池田 恵莉¹, 大野 誠之^{1,2}, 川端 重忠^{1,3} (大阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオインフォ, ³阪大・CiDER)

Role of *Streptococcus pyogenes* hemolytic toxins in necrotizing fasciitis mouse model pathogenesis

○Arisa Mori¹, Yujiro Hirose¹, Eri Ikeda¹, Masayuki Ono^{1,2}, Shigetada Kawabata^{1,3} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER. Osaka Univ.)

劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) は、主たる起因菌に *Streptococcus pyogenes* とする致死率の高い感染症で壊死性筋膜炎を伴うことがある。本研究では、マウス壊死性筋膜炎モデルを用い、*S. pyogenes* の溶血毒素である streptolysin S (SLS) および streptolysin O (SLO) がサイトカインストームと横紋筋融解に果たす役割を検討した。まず、*S. pyogenes* 5448 株を親株 (WT) とし、SLS 欠失株 ($\Delta sagA$)、SLO 欠失株 (Δslo)、SLS および SLO の二重欠失株 ($\Delta sagA \Delta slo$) を作製した。栄養培地中で定常期まで培養した各株を PBS に再懸濁し、マウスの後肢に筋肉注射した。感染 24 時間後のマウス後肢では、いずれの菌株の感染群でも明らかな病変は認めなかったが、感染 48 時間後では WT 感染群および Δslo 感染群で $\Delta sagA \Delta slo$ 感染群と比較して、重度の病変が認められた。血液中の IL-6, TNF α , IL-1 β 濃度は、 $\Delta sagA \Delta slo$ 感染群と比較し、WT 感染群で感染 24 時間後に有意な上昇を認めた。また、横紋筋融解のマーカーである血中ミオグロビン (Mb) 濃度についても、非感染群および $\Delta sagA \Delta slo$ 感染群と比較し、WT 感染群で感染 24 時間後に有意に上昇していた。以上の結果より、壊死性筋膜炎マウスモデルにおいて SLS および SLO がサイトカインストームと横紋筋融解に寄与することが示唆された。また、サイトカインおよび Mb 濃度の上昇は、壊死性筋膜炎マウスモデルにおける初期の段階で上昇する分子であることが示された。

FL4-02/P2-093

S. intermedius が保有するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの発現制御機構の解析

○平岡 璃久¹, 田端 厚之^{1,2}, 長宗 秀明², 友安 俊文^{1,2} (徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学)

Analysis of the expression control mechanism of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *S. intermedius*.

○Riku Hiraoka¹, Atsushi Tabata^{1,2}, Hideaki Nagamune², Toshifumi Tomoyasu^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【序論】*S. intermedius* (SI) は、日和見的にヒトの深部臓器に重篤な膿瘍を形成する。本菌は、血清などに存在する糖タンパク質の糖鎖を切断して資化することが可能である。この切断には、シアリダーゼ (NanA) と多基質グリコシダーゼ (MsgA) が関わっていることが知られている。また、これらグリコシダーゼによって遊離したガラクトースは SI の主要病原因子であるインターメディリシンの発現を活性化することも報告されており、NanA と MsgA は本菌の病原性にも重要な働きを果たしていると考えられている。我々は、SI がエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を示す Endo D を分泌し、NanA と MsgA によって切断された糖鎖に残るコア糖鎖を切断することを発見した。そこで、Endo D が SI の感染部位での生存や病原性にもどのような役割を担うか解析する目的で研究を行った。

【結果と考察】本研究室では形質転換が容易な PC574 を用いて研究を行っているが、PC574 は Endo D 活性が SI の中で特異的に低いことが分かった。そこで、研究室保有株の中から高い Endo D 活性を示し、且つ形質転換による遺伝子操作が容易な株の探索を行った。その結果、JICC674 が本研究に最適な株であることが分かった。そこでこの株を用いて解析を行ったところ、Endo D の分泌は炭素源の濃度が低い状態で促進されることがわかった。さらに、この制御がカタボライト制御タンパク質 (CcpA) によるためか否かを確認する目的で *ccpA* 破壊株を作製し、Endo D の分泌量を野生株と比較した。その結果、この制御には CcpA はほとんど関与していないことがわかった。現在、Endo D の分泌がどのような機構により制御されているのかについての解析を進めている。

FL4-03/P2-094

Streptococcus mitis 由来ヒト血小板凝集因子の作用に依存的なヒト血管内皮由来細胞株の応答反応

○古賀 結衣¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (徳島大・院創成科学研究科・生物資源学専攻, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Response of human vascular endothelium-derived cells to the action of Sm-hPAF produced from *S. mitis*

○Yui Koga¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】川崎病は小児における全身性の血管炎症を伴う疾患である。川崎病患児から単離された *Streptococcus mitis* (SM) の Nm-65 株は、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) ファミリーに属し 5 ドメイン構造を持つ SM 由来ヒト血小板凝集因子 (Sm-hPAF) を産生する。川崎病の明確な病因は不明だが、ウイルスや細菌の感染を誘因とする免疫反応による炎症性サイトカインの産生により血管炎症が生じる発症メカニズムも考えられている。本研究では、Sm-hPAF の作用に対する細胞応答メカニズムを *in vitro* で解明することを目的とした。【方法】ヒト血管内皮由来細胞株 HUEhT-2 を被検細胞とし、Sm-hPAF 組換え体を作用させ、最初期遺伝子群や炎症性サイトカインの遺伝子発現変動を RT-q-PCR で検討した。さらに、IL-8 に関しては、ELISA による転写翻訳産物の定量も行った。【結果・考察】Sm-hPAF 組換え体の 1 時間作用では最初期遺伝子群の発現が、24 時間作用では炎症性サイトカイン遺伝子の発現が、それぞれ有意に亢進していた。また、遺伝子発現の亢進が確認された IL-8 では、ELISA により転写翻訳産物の産生亢進も確認された。以上より、血管内皮細胞は、Sm-hPAF の作用に対する初期段階の応答反応として最初期遺伝子群の発現を亢進させ、その後の応答として炎症性サイトカインの産生を亢進させていることが示唆された。本研究により確認された Sm-hPAF 依存的な IL-8 の産生亢進は、Sm-hPAF と川崎病の病態との関連性を示唆するものであると考えられるため、引き続き Sm-hPAF の膜孔形成抑制変異体等を用いて解析を行い、Sm-hPAF の細胞傷害性に依存して惹起される HUEhT-2 の応答反応の詳細に関して検討を進めている。

FL4-04/P2-095

Recruitment of Rab33B to LCV through Legionella effector for association of LCV with the ER

○菅野 涼, 新崎 恒平 (東薬大・生命・感染制御)

○Ryo Sugano, Kohei Arasaki (Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Legionella pneumophila (L.p.) is a gram-negative bacterium that infects human macrophages and causes a serious pneumonia called Legionnaires' disease. After internalized into the host, L.p. creates specialized infectious niche called Legionella-containing vacuole (LCV) and secretes more than 300 bacterial effectors through type IV secretion system. Although it is known that final destination of LCV is host ER and L.p. utilizes host GTPase such as Rab33B for association of LCV with the ER, molecular machinery in which how L.p. subverts the function of Rab33B has been obscured. Previously, we showed that phosphoribosyl ubiquitination (PR-UBnation) of Rab33B by SidE family Legionella effectors is necessary for recruitment of Rab33B to the LCV. Furthermore, we also identified another Legionella effectors, Lpg2518/Lpg2520 as a master regulator of Rab33B. Because removing of GDI by GDF (GDI-displacement factor) and exchanging of GDP to GTP by GEF (guanine nucleotide exchanging factor) are essential for activation of Rab proteins inside the host, Lpg2518/Lpg2520 might have these functions against RP-UBnated Rab33B. Here, we established *in vitro* PR-UBnation assay of Rab33B using purified recombinant proteins and show that Lpg2518/Lpg2520 preferentially associate with PR-UBnated Rab33B. Furthermore, we revealed that Lpg2518/Lpg2520 are a putative GDF against PR-UBnated Rab33B.

FL4-05/P2-096

Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* on host defense responses of *Caenorhabditis elegans*

○山村 千夏¹, 谷本 佳彦^{1,2,3}, 野本 竜平⁴, 和田 崇之^{1,5}, 中台 枝里子^{1,2,3}
(¹大公大院・生・食栄養・微生物, ²京大院・生命, ³京大・医生研, ⁴神戸市・健科研, ⁵大阪公大・国際感染症研究センター)

○Chinatsu Yamamura¹, Yoshihiko Tanimoto^{1,2,3}, Ryohei Nomoto⁴, Takayuki Wada^{1,5}, Eriko Nakadai^{1,2,3} (¹Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ²Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., ³LiMe, Kyoto Univ., ⁴Kobe Inst. Heal., ⁵Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the most common cause of diarrhea in developing countries and in travelers to those areas. We previously reported that ETEC strain ETEC1, a clinical isolate, shortens the lifespan of the model organism *Caenorhabditis elegans*. This study investigated the pathogenetic mechanisms of ETEC1 in *C. elegans*. Expression of the ETEC1 toxin genes, heat-labile enterotoxin *eltAB* (LT1) and heat-stable enterotoxin *estA* (STh), was increased upon infection with *C. elegans*. These gene knockout strains, ETEC1Δ *eltAB* and ETEC1Δ *estA*, were created. Nematodes fed ETEC1Δ *eltAB* had a longer lifespan compared to those fed ETEC1-WT. No significant difference in lifespan was observed between ETEC1Δ *estA* and ETEC1-WT groups. These findings indicate *eltAB* is a part of key pathogenetic factor of ETEC1, though other factors may contribute. RNA sequencing and RT-qPCR of *C. elegans* fed ETEC1 revealed upregulation of insulin-like peptide genes, especially *ins-8* and *ins-20*. *C. elegans* loss-of-function mutants of *ins-8* and *ins-20* were infected with ETEC1 and showed no differences in lifespan compared to wild-type N2 nematodes. Insulin signaling may play a role in *C. elegans* defense against ETEC1, but *ins-8* and *ins-20* were presumed not to be directly involved.

FL4-06/P2-100

Characterization of human antibody against diphtheria toxin

○幸田 知子¹, 富田 媛音¹, 妹尾 充敏², 岩城 正昭² (¹大阪公立大学・獣医・感染症, ²国立感染症研究所・細菌第二部)

○Tomoko Kohda¹, Himena Tomita¹, Mitsutoshi Senoh², Masaaki Iwaki² (¹Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²Dept. Bact. II., National Institute of Infectious Diseases)

Diphtheria caused by diphtheria toxin (DT) is a potentially fatal disease. In all clinical cases due to toxigenic strains, a currently available primary therapeutic option is treatment with diphtheria antitoxin produced by hyper-immunization of horses. The usage of horse therapeutic antibodies is problematic, since it raises ethical issues surrounding the use of animals, and effects such as serum sickness. Therefore, there is a strong motivation to develop neutralizing human monoclonal antibodies (hmAbs) against DT. In this study, we produced four recombinant anti-DT hmAbs based on the information of variable regions of hmAbs from previously reported clones with DT neutralization activity in a mammalian cell expression system. The properties of hmAb were analyzed by ELISA and cell-based DT neutralizing assay. Three of four hmAbs with specific binding to DT in ELISA exhibited high DT neutralization activity, while one of the four which had showed the highest DT neutralization as reported in a previous report exhibited little DT neutralization activity. The result suggests that the differences of the parameters for hmAb production in cell line with the transfection reagents occurred. To obtain hmAb has higher DT neutralization activity, modification of the production protocol is now in progress.

FL4-07/P2-101

ヒト特異的な作用特性を示す Intermedilysin に対する口腔由来細胞の応答反応

○田中 愛佳¹, 長宗 秀明², 友安 俊文^{1,2}, 藤本 あい³, 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ³サンスター (株) 研究開発統括部)

Cellular response of human gingival carcinoma cell against human-specific cytolysin, Intermedilysin

○Aika Tanaka¹, Hideaki Nagamune², Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Ai Fujimoto³, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci. & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ³Sunstar Inc., R&D)

【目的】*Streptococcus intermedius* (SI) はヒト口腔内の常在菌であり、一般的に日和見病原菌と認識されている。しかし SI は、難治性歯周病だけでなく、脳や肝臓などの深部臓器における重篤な膿瘍形成への関与も報告されている。この SI が産生する代表的な病原因子として、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) である Intermedilysin (ILY) が挙げられる。ILY は、ヒト型 CD59 を受容体としてヒト細胞に特異的な作用特性を示すことから、SI の常在部位における ILY の作用は SI の潜在的な病原性を検討する上で重要である。そこで本研究では、SI の常在部位であるヒト口腔由来の培養細胞株における、ILY の作用依存的な応答反応について検討した。

【方法】本研究の被検細胞として、ヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 を選択した。検討に用いる ILY は、大腸菌発現系を用いて N 末 His タグ化組換え体 (His-ILY) として調製した。His-ILY の作用に伴う細胞傷害性は CCK-8 アッセイにより評価し、His-ILY 作用細胞における遺伝子発現変動は RT-qPCR による相対定量で評価した。

【結果・考察】被検細胞である Ca9-22 は、His-ILY の濃度依存的に細胞傷害を示した。RT-qPCR による遺伝子発現変動の相対定量解析の結果より、準細胞致死濃度の His-ILY を作用させた Ca9-22 では、ケモカインや炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現亢進が確認された。以上の結果より、SI が産生する ILY は、明確な細胞傷害を示さない準細胞致死濃度であっても、その作用に伴って口腔内細胞におけるサイトカイン発現誘導を惹起し、局所的な炎症応答を誘導していると考えられた。この応答反応の詳細を明らかにするために、現在さらに検討を進めている。

FL4-08/P2-103

Engineered Chimeric Botulinum Neurotoxin for Targeted Antibody Delivery to Treat Botulism

○宮下 慎一郎¹, Jie Zhang^{2,3,4}, 金澤 あかね¹, 大野 倫太郎¹, 小島 英恵¹, Min Dong^{2,3,4}, 相根 義昌¹ (¹東京農大・生物産業・食香粧, ²Dept. Urol., Boston Child. Hosp., ³Dept. Surg., Harvard Med. Sch., ⁴Dept. Microbiol., Harvard Med. Sch.)

○Shin-Ichiro Miyashita¹, Jie Zhang^{2,3,4}, Akane Kanazawa¹, Rintaro Ohono¹, Hanae Kojima¹, Min Dong^{2,3,4}, Yoshimasa Sagane¹ (¹Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. of Bio-ind., Tokyo NODA, ²Dept. Urol., Boston Child. Hosp., ³Dept. Surg., Harvard Med. Sch., ⁴Dept. Microbiol., Harvard Med. Sch.)

Botulinum neurotoxin (BoNT) binds to neurons and delivers its catalytic domain to the cytosol. The substrate cleavage induces flaccid muscle paralysis, also known as botulism. Antitoxin antibodies cannot neutralize BoNTs once they enter neurons. We have previously developed an antibody delivery platform comprising inactivated BoNTs and BoNT/X, a BoNT-like toxin, to neutralize BoNTs in the neuronal cytosol. In this study, ciBoNT/EnA and ciBoNT/PmA were created as novel inactivated chimeric toxins composed of BoNT/A and the domains of a BoNT-like toxin, BoNT/En or PMP1. Administration of ciBoNT/EnA or ciBoNT/PmA that linked with a heavy-chain variable-domain antibody (VHH) against BoNT/A shortened the duration of BoNT/A-induced muscle paralysis, although toxicity was observed in mouse bioassays. ciBoNT/XA showed high efficacy in delivering VHH to mice, rats, and guinea pigs. Notably, one molecule of ciBoNT/XA successfully delivered two VHHs to neurons. These findings suggest intracellular antibody delivery using ciBoNT/XA as a promising therapeutic approach against botulism. Further investigations are warranted to determine the potential toxicity associated with BoNTs and BoNT-like toxins to enhance therapeutic strategies.

FL4-11/P2-109

The role of PLC and extracellular Ca²⁺ influx in the inflammation induced by *Pg* infection

○中山 真彰^{1,2}, 内藤 真理子³, 土佐 郁恵¹, 大原 直也^{1,2,4} (1岡山大学・院医歯薬・口腔微生物, 2岡山大学・歯先端研セ, 3長崎大学・院医歯薬・口腔病原微生物, 4岡山大学・院医歯薬・腸健康科学研セ)

○Masaaki Nakayama^{1,2}, Mariko Naito³, Ikue Tosa¹, Naoya Ohara^{1,2,4} (1Dept. Oral Microbiol., Okayama Univ. Fac. Med. Dent. Pharm. Sci., 2ARCOCS, Okayama Univ. Dent. Sch., 3Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci., 4Res. Ctr. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) is a representative periodontal pathogen. In periodontitis, COX-2 expression and PGE2 production are observed. Previous studies have shown that in monocyte-derived cells, *Pg* produced gingipains induce extracellular Ca²⁺ influx, leading to COX-2 expression and PGE2 production. In this study, we explored the role of phospholipase C (PLC) in gingipain-induced increases in intracellular calcium levels in the THP-1 monocyte cell line, focusing on its involvement in COX-2 expression and PGE2 production. Using the PLC inhibitor U73122, we evaluated its effect on COX-2 expression, PGE2 production, and upstream signaling pathways, ERK/AP-1 and IKK/NF-κB. Our results showed that U73122 treatment reduced COX-2 expression and PGE2 production in *Pg*-infected THP-1 cells in a concentration-dependent manner. Activation of ERK and IKK was also suppressed by U73122. Additionally, c-Fos and c-Jun induction and phosphorylation regulated by ERK were inhibited. These findings demonstrate that PLC activation plays a key role in gingipain-induced COX-2 expression and PGE2 production, likely by mediating extracellular Ca²⁺ influx into the cell.

FL4-12/P2-111

黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制による紅参エキスの抗炎症作用

○守口 凜子¹, 篠原 明莉², Dendi Krisna Nugraha³, 中川 一路⁴, 堀口 安彦³, 岡 真優子^{1,2} (1京都府大院・生命環境・食環境安全性, 2京都府大・農学食料・食環境安全性, 3大阪大・微研・分子細菌, 4京都大院・医・微生物感染症)

Red ginseng extracts have role of inhibition of toxin production by *Staphylococcus aureus*

○Rinko Moriguchi¹, Akari Shinohara², Dendi Krisna Nugraha³, Ichiro Nakagawa⁴, Yasuhiko Horiguchi³, Mayuko Osada-Oka^{1,2} (1Food Hyg. and Environ Health, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., 2Food Hyg. and Environ. Health, Fac. of Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., 3Dept. Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ., 4Dept. Microb., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

皮膚や鼻腔に常在する *Staphylococcus aureus* のヘモリジン毒素は、バリア機能の低下した皮膚で炎症を惹起し、アトピー性皮膚炎 (AD) の悪化因子となるため、抗毒素作用をもつ物質は、既存の AD 治療薬とは作用機序の異なる新たな治療に応用できる。これまで AD モデルマウスを用いて、高麗人参を皮ごと蒸して乾燥させた紅参の抽出エキス (RGE) が、痒みや炎症を抑制することを報告した。そこで、*S. aureus* による AD の増悪化に対する RGE の有効性を検討した。RGE (0-1 mg/mL) 存在下で *S. aureus* USA300 株を培養すると、ヘモリジン遺伝子 (*hly* および *hlgB* mRNA) および α-hemolysin タンパク質の発現が RGE の濃度依存的に抑制された。次に、DNP-ascaris 誘発性 AD モデルマウスの耳介患部に塗布した USA300 株の培養上清 (CM) は耳介組織の炎症因子 *Ccl2* mRNA 発現を増大させたが、RGE 存在下での CM はこれら発現を抑制した。また、CM はマウス骨髄由来マクロファージの *Ccl2* mRNA 発現を増大させたが、RGE 存在下での CM はこれらの発現を抑制した。さらに、RGE は、*S. aureus* の二成分制御系 *SaeS/R* および *AggC/A* 遺伝子の発現を抑制したことから、これらの遺伝子の欠損株 (Δ*saeS* および Δ*aggC*) を作製した。Δ*saeS* 株では、*aggC/A* mRNA 発現は野生株と差がなかったが、*hly* mRNA 発現は野生株と比べて抑制された。Δ*aggC* 株では、*saeS/R* および *hly* の mRNA 発現は野生株と同じであった。また、RGE は Δ*aggC* 株の *saeS/R* と *hly* mRNA 発現を抑制した。以上の結果より、RGE は *AggC/A* 非依存的に *SaeS/R* を不活化し、ヘモリジン産生を阻害することで AD マウスの炎症を抑制したと考える。

FL4-13/P2-112

The role of T3SS-2 effector, SseF, on macrophage cell death induced by *Salmonella* infection

○大島 里彩, 羽田 健, 伊藤 雅洋, 三木 剛志, 金 倫基 (北里大学・薬・微生物)

○Risa Ohshima, Takeshi Haneda, Masahiro Ito, Tsuyoshi Miki, Yun-Gi Kim (Dept. Microbiol. Sch. Pharm. Kitasato Univ.)

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is a common cause of gastroenteritis and is associated with invasive bloodstream infections in immunocompromised individuals. Two type III secretion systems, T3SS-1 and T3SS-2, play crucial roles in *Salmonella* pathogenesis. T3SS-2 functions after *S. Typhimurium* has been taken up by host cells, such as macrophages, and forms and maintains *Salmonella*-containing vacuoles (SCV), allowing the bacteria to survive in those cells. We recently showed that the T3SS-2 effector, SseF, induces non-canonical pyroptosis by escaping the bacteria from the SCV to the cytoplasm. However, the mechanism is unknown. To elucidate the role of SseF in *Salmonella* infection, we tried to monitor the secretion of SseF into the cytoplasm of macrophages using the HiBiT system. The secretion of SseF gradually increased from 8 to 18 hours. The timeframe when macrophages secreted SseF was almost the same as when the *S. Typhimurium* induces cell death. We also investigated the relationship between macrophage cell death and ACBD3 or Rab1A, which are reported to target the protein of SseF. The cytotoxicity of ACBD3- or Rab1A-deficient cells induced by infection with *S. Typhimurium* was comparable to that of RAW cells. These results suggest that ACBD3 and Rab1A were not involved in the induction of cell death by *S. Typhimurium* infection.

FL4-14/P2-121

Acinetobacter LPS aggravates infection severity through gasdermin D-mediated cell membrane rupture

○松田 泰幸¹, 山内 肇¹, 鴨志田 剛², 白石 宗³, 横田 伸一³, 原 英樹¹ (1旭川医大・医・感染症, 2明葉大・微生物感染制御, 3札幌医大・医・微生物)

○Yasuyuki Matsuda¹, Hajime Yamauchi¹, Go Kamoshida², Tsukasa Shiraishi³, Shin-ichi Yokota³, Hideki Hara¹ (1Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ., 2Dept. Infect. Cont. Sci., Meiji Pharm. Univ., 3Dept. Microbiol., Sch. Med., Sapporo Med. Univ.)

The silent pandemic of drug-resistant bacteria continues to spread worldwide, with the WHO designating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA) infections as an "urgent" global health concern. MDRA infections are primarily associated with pneumonia, septicemia, and meningitis. While innate immune responses play a key role in the pathogenesis of MDRA infections, the mechanisms by which MDRA triggers inflammatory responses remain poorly understood. In this study, we identified lipopolysaccharide (LPS) as a critical factor in inflammasome activation induced by *Acinetobacter* infection. After recognition of intracellular LPS by caspase-11, activated caspase-11 initiated gasdermin D-mediated cell membrane rupture, leading to the release of pro-inflammatory cytokines including IL-1β and IL-18. Interestingly, *Gsdmd*^{-/-} mice, but not mice deficient in IL-1β or IL-18, exhibited reduced bacterial burdens in organs following MDRA infection. In addition, treatment with a gasdermin D inhibitor significantly decreased mortality of MDRA-infected mice. Furthermore, *Gsdmd*^{-/-} mice showed less hypercoagulability than wild-type mice in MDRA infection. Collectively, these findings reveal that during MDRA infection, LPS activates caspase-11, driving gasdermin D-dependent cell membrane rupture, which in turn facilitates hypercoagulability and exacerbates disease severity.

FL4-15/P2-122

Genetic diversity of paired receptors and their bacterial ligands suggest host-bacteria co-evolution

○長谷川 玄¹, 平安 恒幸¹, 李 一凡¹, 荒瀬 尚^{2,3,4}, 山口 雅也^{4,5,6,7}, 川端 重忠^{4,7}, 華山 力成¹ (¹金沢大・先進, ²阪大・微研・免疫, ³阪大・免フロ・免疫, ⁴阪大・CiDER, ⁵阪大・院歯・バイオインフォ, ⁶阪大・微研・バイオインフォ, ⁷阪大・院歯・微生物)

○Gen Hasegawa¹, Kouyuki Hirayasu¹, Yifan Li¹, Hisashi Arase^{2,3,4}, Masaya Yamaguchi^{4,5,6,7}, Shigetada Kawabata^{4,7}, Rikinari Hanayama¹ (¹Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., ²Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., ³Lab. Immunochem., IFReC, Osaka Univ., ⁴CiDER, Osaka Univ., ⁵Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ⁶Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., ⁷Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors (LILRs) are paired receptors expressed primarily in immune cells, and transduce activating or inhibitory signals, thereby regulating cellular activity by recognizing diverse ligands. Notably, inhibitory LILRB3 and activating LILRA6 show highly homologous extracellular domains, and share numerous allelic variants. Although the genetic diversity in *LILRB3* and *LILRA6* implies the presence of strong selective pressure, the specific ligands and functional mechanisms underlying such natural selection remain elusive. Through comprehensive screening, Immunoprecipitation and mass spectrometry analyses successfully discovered that certain pathogenic bacteria are specifically recognized by LILRB3 and LILRA6 in an allele specific manner, suggesting that distinct allelic variations influence pathogen recognition. We successfully identified a bacterial surface protein as the functional ligand. Moreover, we observed a significant association between susceptibility to bacterial infection and genetic polymorphisms in *LILRB3* and *LILRA6*. In addition, the bacterial ligands also exhibited genetic diversity, enabling the regulation of their expression levels and modulating biofilm formation. These findings suggest an evolutionary interplay between humans and pathogens mediated by LILRB3 and LILRA6, which drive the generation of genetic diversity in both species.

FL4-16/P2-126

過ヨウ素酸酸化により得られた乳酸菌ペプチドグリカン誘導体の IL-8 産生活性

○野口 翔, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命科学)

IL-8 inducing activity of periodate-oxidized peptidoglycan from lactic acid bacteria

○Sho Noguchi, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】ペプチドグリカン (PG) の部分構造であるムラミルジペプチド (MDP) や γ -D-グルタミル-*meso*-ジアミノピメリン酸 (iE-DAP) は、それぞれ細胞内受容体 NOD2 と NOD1 に認識され、免疫系の活性化へ繋がることから、PG はワクチンアジュバントとして有用であると考えられている。一方で、免疫活性が強すぎると、過剰な炎症反応を引き起こす危険性もある。本研究では、MDP の活性を減弱させる目的で、乳酸菌 PG の糖部分を過ヨウ素酸酸化により破壊し、得られた PG 誘導体の IL-8 産生活性を THP-1 細胞および NOD1 あるいは NOD2 発現細胞で測定した。【方法と結果】*Lactiplantibacillus plantarum* の細胞膜画分を SDS 及びトリクロ酢酸で処理した後、リゾチーム処理で得られた可溶性画分を 0.1 M NaOH で加熱処理し、サイトカイン産生活性を持つリポペプチドを分解除去した。この画分を NaBH_4 で還元して糖を開環した後、 NaIO_4 で酸化した。さらに塩酸加水分解により糖部分が破壊された誘導体を得た。得られた画分は全て透析操作を経ているため高分子画分と考えられる。分析の結果、 NaIO_4 処理前と比較して、PG に含まれるアミノ酸 (Ala, Glu, DAP) 量はほとんど変化がなかったものの、GlcN 量は約 3.2% に減少したことがわかった。この画分の IL-8 産生活性を測定した結果、MDP をリガンドとする NOD2 発現細胞では、 NaIO_4 処理前と比較して IL-8 産生量は約 1/100 に減少し、iE-DAP をリガンドとする NOD1 発現細胞では、 NaIO_4 処理前と同等であった。今後 DAP を持たない *Levilactobacillus brevis* の PG についても同様の実験を行い比較検討する予定である。

FL4-17/P2-128

Supersulfides enhance neutrophil-mediated bacterial killing

○澤 智裕¹, Azizur Rahman¹, 豊元 柊弥¹, 津々木 博康¹, 赤池 孝章² (¹熊本大・院生命科学・微生物, ²東北大・院医・環境医学)

○Tomohiro Sawa¹, Azizur Rahman¹, Touya Toyomoto¹, Hiroyasu Tsutsuki¹, Takaaki Akaike² (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ²Dept. Environ. Sci. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

Neutrophils consist almost 50% of circulating white blood cells and play important roles as first line defense against invading pathogens including bacteria and fungi. Supersulfides are endogenously occurring molecular species that have catenated sulfur chains in their structures, such as persulfides and polysulfides of cysteine, GHS, proteins, and inorganic forms. It has been demonstrated that supersulfides act as strong antioxidants than parental thiols. However, roles of supersulfides in regulation of neutrophil activation and function remained unknown. We observed that infections of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* caused reduction of intracellular GSH and its persulfide (GSSH). Specific supplementation of supersulfides in cells by supersulfide donor N-acetylcysteine tetrasulfide (NAC-S2) resulted in marked reduction of bacterial numbers in neutrophils. Administration of NAC-S2 protected mice from lethal infections by *S. aureus* and *S. pneumoniae*. These data suggest that cellular status of supersulfides may implicate in regulation of neutrophil function. Further understanding how supersulfides activate neutrophil function is warranted for developing new treatment strategy for bacterial and fungal infection control.

FL4-18/P2-129

大腸菌 BL21 株とその Lipid A 変異株が産生する外膜小胞の特性解析

○富永 龍之介^{1,2}, 安部 公博¹, 中村 知世^{2,3}, 西野 智彦^{2,3}, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (¹感染研・細菌 I, ²工科大・バイオニクス, ³工科大・応生)

Characterization of outer membrane vesicles of *E. coli* BL21 and the isogenic lipid A mutant strains

○Ryunosuke Tominaga^{1,2}, Kimihiro Abe¹, Tomoyo Nakamura^{2,3}, Tomohiko Nishino^{2,3}, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Grad. Sch. Bionics, Tokyo Univ. Technol., ³Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

【背景】外膜小胞(OMVs)は薬剤輸送担体およびアジュバントとして、医療・ヘルスケア分野での応用が見込まれるが、人体への使用に先立ち安全面の配慮が欠かせない。本研究では、Lipid A が無毒化テトラアシル型 Lipid IVa に置換された大腸菌変異株から OMVs を得て、その性状と免疫学的機能について調査した。

【方法】BL21 株 (WT) と Lipid A 変異株 ClearColi (CC)由来 OMVs は、培養上清の超遠心後の沈渣として回収し、SDS-PAGE, SEM, リムラス法等に供試した。アジュバント活性は、OMVs とオボアルブミン抗原をマウスに投与後、抗原特異的抗体のクラス分布や量を ELISA で評価した。また、MBP 融合タンパク質として抗原 X をベリプラズム発現するベクターを構築し、それぞれの形質転換体の培養上清から得た OMVs に内封された MBP-X を定量した。

【結果】両者の OMVs の形態に差は認められなかったが、WT と比べて CC は OMVs 構成タンパク質の多様性、および内毒素活性が低下した。また CC の OMVs のアジュバント活性に関しては、WT と比べ、皮下投与の場合は、総 IgG 量に変化はないものの IgG2a と 2b 産生誘導能が著減、経鼻投与の場合は、さらに口腔および鼻腔内の分泌型 IgA 産生量が著減した。一方で、CC の OMVs は、WT の OMVs と比べて約 10 倍の MBP-X を内封することができた。

【結語】Lipid A の変異は、OMVs の様々な特性に影響を与えることが明らかとなった。本知見に基づき、CC 由来 OMVs が、安全で合理的な抗体作製法や、ワクチン開発に活用できる可能性が示唆された。

FL4-19/P2-130

抗菌ペプチド LL-37 は老化した A549 肺胞上皮細胞に細胞死を誘導する

○三田 一樹¹, 鈴木 香², 熊谷 由美², 射場 敏明¹, 長岡 功¹ (¹順天堂大・医療科学, ²順天堂大・医・生化学・生体システム医科)

Antimicrobial peptide LL-37 induces apoptosis in senescent alveolar epithelial A549 cells

○Kazuki Sanata¹, Kaori Suzuki², Yumi Kumagai², Toshiaki Iba¹, Isao Nagaoka¹ (¹Fac. Med. Sci., Juntendo Univ., ²Dept. Biochem. Syst. Biomed., Juntendo Univ. Grad. Sch. Med.)

敗血症などにおいて炎症反応の増強に老化細胞の SASP (senescence-associated secretory phenotype) が関与すること、そして老化細胞を除去すると炎症反応が減弱することが報告されている。一方、抗菌ペプチドは抗菌作用だけでなく、免疫担当細胞を含むさまざまな宿主細胞に作用することから、多機能性の生体防御ペプチドとして注目されている。我々は、抗菌ペプチド LL-37 がマウス敗血症モデルにおいて致死率を改善することを明らかにしている。そこで、本研究では、LL-37 の敗血症に対する防御機構の一端を明らかにするために、LL-37 の老化細胞に対する細胞死誘導作用について検討した。

まず、A549 II 型肺胞上皮細胞をエトポシド処理 (2μM) したところ、老化細胞の形態を示し、SASP マーカーである β-ガラクトシダーゼ染色と p21 の発現の増加し、細胞老化が誘導されることが確認された。そこで、老化 A549 細胞に抗菌ペプチド LL-37 (2~10μg/mL) を作用させて、アポトーシスについては Caspase-3/7 の特異的阻害剤 FAM-DEVD-FMK を用いて、ネクローシスについては Propidium Iodide (PI) を用いて細胞死を蛍光染色で評価した。その結果、LL-37 の濃度に依存して、非老化細胞に比べて老化細胞において FAM-DEVD-FMK で染色される細胞が増加したが、PI で核染色される細胞はほとんど観察されなかった。

以上の結果から、抗菌ペプチド LL-37 は老化細胞にアポトーシスを誘導することによって炎症反応を和らげる可能性が示唆された。

FL4-20/P2-137

Polygonum tinctorium extract reduces MRSA virulence via extracellular vesicle disruption

○渡部 菜穂子¹, Phawinee Subsomwong¹, 山根 亨介², 浅野 クリスナ^{1,3}, 中根 明夫³ (¹弘前大・院医・感染生体防御学, ²ウシオ電機株式会社, ³弘前大・院医・生体高分子健康科学)

○Naoko Watabe¹, Phawinee Subsomwong¹, Kyosuke Yamane², Krisana Asano^{1,3}, Akio Nakane³ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Ushio Inc., ³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a global health concern, responsible for both hospital- and community-acquired infections. Extracellular vesicles released by *S. aureus* (SaEVs) contain factors essential for bacterial survival and pathogenicity. *Polygonum tinctorium* is traditionally used as a natural dye and a disinfectant. In this study, we investigated the effects of *P. tinctorium* preparation (Indigo Ex), which was extracted by *d*-limonene, on MRSA-derived SaEVs. The morphology of Indigo EX-treated SaEVs was observed under electron microscope. The murine macrophage cell line, RAW 264.7, was used to evaluate the cytotoxicity and cytokine response induced by Indigo Ex-treated SaEVs. Our results showed that SaEVs particles were disrupted when treated with undiluted Indigo Ex. The WST-1 assay showed a reduction in RAW 264.7 cell viability by over 50% at a 1,000-fold dilution, but cytotoxicity was not observed at a 25,000-fold dilution of Indigo Ex. Indigo Ex-treated SaEVs induced lower levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-6) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) compared to untreated SaEVs. In conclusion, a low concentration of Indigo Ex can reduce the virulence of MRSA and its ability to regulate the immune response, without causing cytotoxicity to host cells. Our findings suggest that Indigo Ex has the potential to control MRSA infections.

FL4-21/P2-139

Campylobacter jejuni に対し抗菌活性を持つ納豆菌のプロバイオティクス効果

○門屋 亨介¹, 中谷 百花¹, 川嶋 琴音¹, 安田 侑加¹, 鈴木 かおり², 鶴木 暉², 福田 紗弓², 西川 宗伸² (¹福島女学園大・生活科学・管理栄養, ²タカノフーズ株式会社・納豆研究開発)

Probiotic effect of *Bacillus natto* with antibacterial activity

○Ryosuke Kadoya¹, Momoka Nakatani¹, Kotone Kawashima¹, Yuuka Yasuda¹, Kaori Suzuki², Hikaru Ikarugi², Sayumi Fukuda², Takanobu Nishikawa² (¹Dept. Food and Nutrition, Sch. Life Stud., Sugiyama Jogakuen Univ., ²Dept. Natto Research and Development, Takanofoods Co.,Ltd)

Campylobacter jejuni による食中毒は世界各国で発生している食中毒であり、下痢や嘔吐などを引き起こし社会問題になっている。食卓の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は緊急の課題である。市販鶏肉が高確率に汚染していることから、加熱処理しか有効な防御策はない。本研究では、納豆菌が持つ抗菌活性機能に着目し、飼料に配合しカンピロバクター食中毒の拡大を防止することを目的とした。しかしながら、納豆菌には多くの株が存在するため、どの株が *C. jejuni* 増殖抑制に効果があるかは未知である。そこで、TTCC903 などの食用納豆菌株及び研究用納豆菌株を用い *C. jejuni* に対する抗菌効果、及び動物生体内でのプロバイオティクス効果を検討した。各納豆菌株の *C. jejuni* に対する抗菌効果測定は Well diffusion assay (WDA) 法で測定した。興味深いことに、全ての納豆菌株で抗菌活性があるわけではないことが示された。液体培地を用いた *C. jejuni* と納豆菌の共培養実験では WDA で抗菌効果を示した株では *C. jejuni* 生菌数の著しい減少が確認された。TTCC903 を始めとする *C. jejuni* に対して抗菌効果を示した株をマウスに摂取し、腸内への定着、抗菌効果、腸内細菌叢への影響を観察した。抗菌効果を示した納豆菌株では、*C. jejuni* のマウス腸内からの駆逐が観察された。この効果は納豆菌生菌摂取時に測定され、芽胞摂取時には見られなかった。また、納豆菌摂取により腸内細菌叢の多様性増加が確認された。さらに、*Lactobacillus* 属の存在率は増加していた。実験室内で示された納豆菌抗菌効果は生体腸内でも効果があることを示した本研究の結果は、動物生菌剤やプロバイオティクス分野に貢献すると考える。

FL4-22/P2-140

好熱菌 *Aeribacillus composti* が産生する抗菌物質の性状解析と同定の試み

○井上 笑花¹, 加藤 陽二¹, 米山 茉那¹, 林 将大¹, 有満 秀幸¹ (¹兵庫県大・環境人間, ²岐阜大・糖鎖生命コア研・嫌気性菌)

Characterization and identification of antibacterial substances produced by *Aeribacillus composti*

○Emika Inoue¹, Yoji Kato¹, Mana Yoneyama¹, Masahiro Hayashi¹, Hideyuki Arimitsu¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Human Sci. Env., Univ. of Hyogo, ²Div. Anaerobe Res., Inst. for Glyco-core Res., Gifu Univ.)

【目的】好熱菌は 55℃ 以上の温度で増殖し、高い耐熱性と芽胞を形成することから高温保存食品の変敗起因菌となっている。以前、我々は *Aeribacillus pallidus* が耐熱性の異なる 2 種類の抗菌物質を産生することを報告したが、その後 16SrDNA に基づく系統解析より、本菌を *Aeribacillus composti* と改めて同定した。今回、本菌が産生する抗菌物質の精製を進め、その本態について更に解析した結果を報告したい。

【方法】2×YT 培地で 55℃、24 時間培養した *A. composti* の遠心上清を硫酸塩析で濃縮後、DEAE Sepharose FF 未吸着画分を回収した。さらにこれを酸性条件下で SP Sepharose FF に吸着させ、NaCl 濃度での Stepwise 溶出で分画した。試料の抗菌活性は *Geobacillus stearothermophilus* を被検菌として塗抹し、寒天拡散法による阻止円形成の有無で確認した。さらに SDS-PAGE で精製試料を展開したゲルをシャーレに静置し、被検菌を混入した普通寒天培地を重ねた。これを 55℃ で一晚培養後に生じる阻止円の位置を、CBB-R250 染色によるバンドの位置と比較することで、抗菌物質の分子量を推定した。

【結果と考察】DEAE Sepharose の未吸着試料は pH4-11 条件下で安定していたため、SP Sepharose での分画を進めた。分画試料の活性はペプシン処理後も残存していた。SDS-PAGE 後のゲル上における抗菌試験では 6.5 kDa のマーカー以下の位置に活性が見られたが、CBB-R250 染色では当該位置にバンドを視認できず、銀染色レベルで僅かに認める程度であった。以上より本抗菌物質は比活性の高い低分子物質である可能性が示唆された。今後は DEAE Sepharose 吸着画分にも存在する抗菌物質を含め、更なる性状解析・同定を進めていく予定である。

FL4-23/P2-142

YaiX の大量発現は大腸菌の病原性と薬剤耐性を増強する

○本宮 絹華¹, 石川 一也¹, 小崎 智己¹, 三好 伸^{2,3}, 古田 和幸¹, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬・分子生物, ²岡山大学・院医歯薬・環境生物薬学, ³岡山大学・腸健康科学研究センター)

Overexpression of YaiX confers drug resistance and increases virulence in *Escherichia coli*

○Kinuka Hongu¹, Kazuya Ishikawa¹, Tomoki Kosaki¹, Shin-Ichi Miyoshi^{2,3}, Kazuyuki Furuta¹, Chikara Kaito¹ (¹Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Sch. Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

【目的】細菌の病原性の分子基盤を理解する為には、細菌の病原性に影響を与える遺伝子を同定する必要がある。本研究では、細菌の病原性を簡便に評価できるカイコ感染モデルを用いて、大量発現により大腸菌の病原性を上昇させる遺伝子の同定を試みた。【方法】大腸菌 W3110 株の全 ORF 大量発現株ライブラリー (ASKA ライブラリー) を 1 プレートごとに培養・混合し、カイコに注射した。感染死したカイコの体液から大腸菌株を分離し、カイコ体内での生存・増殖能の高い株を同定した。【結果】機能未知タンパク質 YaiX の大量発現株は空ベクター導入株 (EV 株) に比べて、カイコ体内での生存、増殖能が高かった。また、YaiX 大量発現株は EV 株に比べてカイコに対する高い殺傷活性を示した。YaiX の機能を知るために、様々な薬剤に対する耐性試験を行った。その結果、YaiX 大量発現株は EV 株に比べて、陽イオン性界面活性剤、βラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、過酸化水素に耐性を示した。データベース検索により、YaiX がアシル基転移酵素にアミノ酸配列の類似性を示すこと、ならびに *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella* の細菌種が多様な配列長の YaiX ホモログを有することが判明した。【考察】本研究の結果から、大腸菌において YaiX の大量発現が様々な抗生物質に対する耐性化、ならびにカイコに対する病原性の増強を引き起こすことが示唆された。今後は、YaiX による病原性と薬剤耐性の増強メカニズムを解明するとともに、分子系統解析を行うことで多様な YaiX 配列長が生じた過程を明らかにしていきたい。

FL4-24/P2-143

Isolation and antibacterial evaluation of bacteriophages targeting *Enterococci*

○宋 冰心^{1,2}, 松尾 (川田) 美樹¹, 柴 秀樹², 小松澤 均¹ (¹広島大学・医系科学・細菌, ²広島大学・医系科学・歯髄生物)

○Bingxin Song^{1,2}, Miki Kawada-Matsuo¹, Hideki Shiba², Hitoshi Komatsuzawa¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

Background: *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are known to cause opportunistic infections. Furthermore, these species can exhibit multidrug-resistance, particularly vancomycin-resistant enterococci (VRE) have become a problem in recent years. This indicates the urgent need for new antibacterial agents.

Objectives: In this study, we focus on bacteriophage as new antibacterial agents against multidrug-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*.

Methods: Sewage was used to isolate the bacteriophage against *E. faecalis* and *E. faecium*. Bacteriophage was isolated using soft agar overlay assay by forming a plaque against the prepared indicator strains. Then, purified bacteriophage activity against VRE and 55 *E. faecalis* and 52 *E. faecium* clinical isolates were evaluated.

Results: We isolated several types of bacteriophages active against *E. faecalis* and *E. faecium* clinical strains from sewage. Some bacteriophages had a broad host range against *E. faecalis* and *E. faecium* clinical isolates and over species activity. Moreover, some bacteriophages demonstrated efficacy against VRE strains.

Conclusion: The isolated bacteriophages showed antimicrobial activity against two *Enterococcus* spp. Therefore, the isolated bacteriophages had the potential to be developed as therapeutic agents to treat infections related to multiple antimicrobial-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*.

FL4-25/P2-146

Establishing a library of Cas13a phage capsids for the elimination of CRC-associated *E. coli*

○Ola Alessa¹, 相羽 由詞¹, Kanate Thitiananpakorn¹, 氣賀 恒太郎^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, Tan XinEe¹, 笹原 鉄平¹, 崔 龍洙¹ (¹自治医科大・医・細菌学, ²国立感染症研究所創薬・ワクチン開発研究センター)

○Ola Alessa¹, Yoshifumi Aiba¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Tan XinEe¹, Teppei Sasahara¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Research Center for Drug and Vaccine Development, NIID)

Colorectal cancer (CRC) is a serious global health issue and the second cause of mortality in the world. The gut microbial composition, particularly the abundance of a specific *E. coli* group (toxin-X producing *E. coli*), play a critical role in CRC development. Early and precise eradication of these bacteria from the gut flora without disrupting gut flora balance is a vital step for CRC prevention. In this study, we aim to utilize the selective targeting mechanism of CRISPR-Cas13a system to develop an antimicrobial agent for effectively eliminating toxin X-producing *E. coli*. This is achieved by incorporating the Cas13a plasmid into phage capsids. Target bacterial strains were collected and sequenced, enabling the design of 40 Cas13a-guided RNAs (spacers) targeting conserved regions within the gene encoding toxin X. Infection ranges of eight candidate phages were tested and validated against target bacteria, resulting in the identification of three phages with distinct infection patterns. The current capsid library achieves coverage of approximately 40% of target bacteria, utilizing three distinct spacers. Ongoing efforts aim to expand this library of capsids and spacers to enhance targeting coverage. This research offers a promising solution for combating CRC progression by precisely targeting pathogenic *E. coli* while preserving gut flora equilibrium.

FL4-26/P2-149

薬剤耐性菌に対し抗菌活性を持つ *S.capitis* 株の解析

○大段 慶十郎^{1,2}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,3}, 久恒 順三^{3,4}, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (¹広島大学・医系科学・細菌学, ²広島大学・医系科学・口腔外科学, ³広島大学・院内感染症プロジェクト研究センター, ⁴国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Analysis of *S.capitis* strain with antibacterial activity against antimicrobial resistant bacteria

○Keijuro Ohdan^{1,2}, Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,3}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Oral and Maxillofacial Surgery., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., ⁴Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Institute of Infectious Diseases)

薬剤耐性菌は、世界中で深刻な問題となっており、薬剤耐性菌に対する新規抗菌剤の開発が求められている。本研究では、MRSA および VRE を含むグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を持つ *Staphylococcus capitis* が産生する 2 つの抗菌物質を明らかにした。鼻腔から分離した 18 株の *S. capitis* を用いて、MRSA である MW2 株に対する抗菌活性を soft agar overlay 法にて評価した。その結果、MW2 に対し強い抗菌活性を持つ *S. capitis* を見出した。本菌株を用いて VRE, *Clostridium difficile*, *Bacillus coagulans* 等についても検証した結果、強い活性を認めた。本菌株の全ゲノム塩基配列を決定し、抗菌性ペプチド遺伝子の探索を行った結果、プラスミド上に Thiopeptide である Micrococцин P1 (MP1) および Capidermicin をコードする遺伝子を認めた。次に *S. capitis* 培養上清から弱陽イオン交換体を用いて活性画分を粗精製した後、HPLC にてさらに精製し、質量解析の結果から 2 つのペプチドであることを確認した。2 つの抗菌ペプチドは同一のプラスミド上に認めたことから、プラスミド脱落株を作成し、親株との抗菌活性を比較した結果、プラスミド脱落株は抗菌活性を示さず、HPLC 解析でも抗菌ペプチドは検出されなかった。MP1 の精製標品は Capidermicin 精製標品に比べて、MW2 株や *B.coagulans* に対して強い活性を示した。これらの結果より MP1 は幅広くグラム陽性細菌に対し抗菌活性を認め、臨床応用の可能性が示唆された。今後は細菌叢に及ぼす影響等について検証していきたい。

FL4-27/P2-153

サルモネラを用いた菌増殖の可視化・銅鉄合金の抗菌性とその可視化

○翠川 裕 (三重大・院・生物資源)

Visualization of bacterial growth using Salmonella, antibacterial properties of copper-iron alloys

○Yutaka Midorikawa (Fac. Bioresources, Mie Univ.)

【はじめに】食中毒菌サルモネラが産生する硫化水素が形成する硫化鉄で菌の増殖を可視化する研究を行っている。本研究の結果可視化に成功した点を大別する。大別とは、菌を増殖する場合および菌増殖を阻害する場合の相反することとなる。柑橘由来の有機酸菌由来の有機酸が菌増殖を促進する場合と阻害する場合があることをこの手法で可能としている。嫌気条件下で抗菌性物質を証明するメカニズムも開発している。この度、本手法の成果を報告する。数千年に及ぶ人類の文明の中でも、決して混ざることができないと言われてきた合金が不可能とされた2つの金属が、鉄と銅である。特に、その合金である銅含有ステンレスが2023年に誕生したので、銅ステンレスとその波及品の抗菌性有無を判定したので結果を示す。【方法】抗菌性の可視化を実現するために、食中毒菌サルモネラが産生する硫化水素が形成する演者の特許技術である硫化鉄の黒色変化を用いた(特許 6406875)。今回は、サルモネラよりも病原性の弱いエドワードシエラを用いた。銅ステンレスは、通常のステンレスに10%の銅が含有された合金を用いた。銅含有ステンレスとステンレスをエドワードシエラが接種されたDHL培地上に被検体を載せ、24時間37°Cで培養した。【結果】培養後、ステンレス直下では、エドワードシエラ菌が産生する硫化水素が形成する硫化鉄が黒色を呈した。銅ステンレス製品を載せた場合、黒色を認めなかった。【考察】銅ステンレス合金及びその派生品からは、黒色変化を認めないので抗菌性が証明される。

FL4-28/P2-154

Development of a Neonatal Mouse Model for Evaluating MRSA Infection and Phage Therapy

○Yeo Syin Lian Adeline, XinEe Tan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Yeo Syin Lian Adeline, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

A bactericidal agent combining bacteriophages and CRISPR-Cas13a is being developed to specifically target the *mecA* gene in MRSA. However, adult mice, commonly used to evaluate bactericidal activity, are non-natural hosts for MRSA and require high bacterial doses to establish infections, complicating *in vivo* modeling. To address this challenge, we developed a neonatal mouse model to exploit the susceptibility of their immature immune systems, allowing infection with lower bacterial doses.

In this study, 2 days old C57BL/6J neonatal mice were infected intracranially with 10^5 - 10^7 CFU/pup of MRSA to determine the lethal dose. Bacterial counts in the brain were analyzed from day 1 to day 3 post-infection to identify the peak infection period and optimal therapeutic window. Phage therapy was then evaluated using engineered phage equipped with CRISPR-Cas13a system targeting *mecA*.

The lethal dose for intracranial MRSA infection was 10^6 CFU/pup, with the peak infection and therapeutic window occurring 12-36 hours post-infection. The phage therapy showed effective outcomes with lower bacterial cell count than the control group without the treatment. This neonatal MRSA model provides a robust and versatile preclinical platform for studying phage therapy and other antimicrobial strategies. It is currently being used to evaluate phage-based treatment for a range of AMR pathogens.

FL4-29/P2-155

Development of an effective antibiofilm therapy based on phage-gold nanorod conjugates

○Sarangi Jayathilake, 川口 智史, Srivani Veeranarayanan, Palaninathan Vivekanandan, Hossain Razib, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, Longzhu Cui (自治医科大・医・細菌学)

○Sarangi Jayathilake, Tomofumi Kawaguchi, Srivani Veeranarayanan, Palaninathan Vivekanandan, Hossain Razib, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Biofilm associated bacterial infections are notoriously difficult to treat due to their intrinsic nature of antimicrobial resistance and tolerance. Here, we present a new antibacterial approach utilizing bacteriophage-gold nanorod (AuNR) conjugates for targeted antibiofilm therapy. Phages were engineered with a short gold-binding peptide via phage display, enabling surfactant-cleared AuNRs to bind on to the phage capsids. The conjugation of AuNR to phages was confirmed by TEM imaging, and the biocompatibility of phage-AuNR conjugates was validated using a metabolic activity measurement assay. The therapeutic potential of the conjugates was evaluated under near-infrared (NIR) irradiation by treating mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Efficient conjugation of AuNRs to phage capsids was confirmed, and a simple washing step during the conjugate preparation effectively eliminated the toxic effects of AuNR on cell viability. Following therapy, complete eradication of biofilm cells was achieved compared to controls. Currently, the efficacy of Phage-AuNRs conjugates is being assessed in an *in vivo* skin infection animal model. This study highlights the successful development of a promising antibiofilm therapy that combines the bacteria-targeting capabilities of phages with the photothermal properties of AuNRs.

FL4-30/P2-164

マクロファージに感染する多剤耐性黄色ブドウ球菌に対する紅参ジンセノシドの抗菌薬感受性増強作用

○三竿 菜摘¹, 篠原 明莉², Dendi Krisna Nugraha³, 中川 一路⁴, 堀口 安彦³, 岡 真優子^{1,2} (1京都府大院・生命環境・食環境安全性, 2京都府大・農学食科・食環境安全性, 3大阪大・微研・分子細菌, 4京大院・医・微生物感染症)

Red ginseng increases antibiotic sensitivity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus

○Natsumi Misao¹, Akari Shinohara², Dendi Krisna Nugraha³, Ichiro Nakagawa⁴, Yasuhiko Horiguchi³, Mayuko Osada-Oka^{1,2} (1Food Hyg. and Environ Health, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., 2Food Hyg. and Environ. Health, Fac. Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., 3Dept. Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ., 4Dept. Microb., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

国境を越えて拡散している多剤耐性菌の代表的な6菌種の1つにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が含まれる。MRSAは、最も耐性菌検出率が高い多剤耐性菌で、耐性化を起こさない新たなMRSA薬の開発が課題である。我々は、高麗人参を蒸して乾燥した紅参の抽出エキス(RGE)がMRSAの抗菌薬に対する感受性を増強する作用を見出した。さらに、この活性物質は紅参に含まれるジンセノシド Rg3 (Rg3) と同定した。そこで本研究では、マクロファージ (Mφ) に感染するMRSAに対するRGEの作用を検討し、その作用機序解明を試みた。ヒトTHP-1細胞由来Mφの培養液に multiplicity of infection が0.1 で緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現 MRSA USA300 株を加えて1時間後、細胞外の細菌をすべて取り除いた。最小発育阻止濃度 (MIC) の1/4濃度の gentamicin (Gm) と RGE (100 µg/mL) または Rg3 (10 µg/mL) を含む培地で0-16時間培養後、Mφ内のGFP強度および細菌のコロニー数を測定した。16時間培養後にGm単独はGFP強度およびコロニー数を増大したが、GmとRGEまたはRg3はこれらを抑制した。RGEが二成分制御系因子の *saeS/R* および *agrC/A* の遺伝子発現を抑制したことから、RGEの抗菌薬感受性増強作用におけるこれらの関与を検討した。USA300株由来 *agrC* 遺伝子欠損株では野生株と同様に kanamycin (Km) および Gm の MIC は RGE により低下した。一方で、*saeS* 遺伝子欠損株では野生株と比較し、RGE による Km および Gm の MIC の低下が抑制された。

以上の結果から、Mφに感染するMRSAに対してRg3は抗菌薬のアジュバント作用を有しており、この作用には *SaeS/R* の関与が示唆された。

P1-001

ロングリードシーケンシングにより見出された *Paramecium nephridiatum* の共生細菌

○橘 理人¹, 前野 慎太郎¹, 道羅 英夫², 渡邊 健太³, 清水 隆³, 度会 雅久³
(¹山大・大研, ²静岡大学・静岡共同利用機器センター, ³山口大・共獣)

The symbiotic bacteria of *Paramecium nephridiatum* discovered through long-read sequencing

○Masato Tachibana¹, Shintaro Maeno¹, Hideo Dora², Kenta Watanabe³, Takashi Shimizu³, Masahisa Watarai³ (¹Org. Res. Ini., Yamaguchi Univ., ²Ins. Ana. Cen., Shizuoka Univ., ³Joi. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

真核生物のモデル生物として用いられるゾウリムシ属 (*Paramecium* 属) は、染色体数が未確定であり、特殊な染色体構造を持つため、ゲノム情報の整備が遅れている。我々は、これまでゲノム配列が決定されていない *Paramecium nephridiatum* のロングリードシーケンシングを用いた全ゲノム解析を実施した。その結果、環状のバクテリアゲノムが見出された。本研究ではこの配列を *P. nephridiatum* の未知の共生細菌として、詳細に解析することを目的とした。得られた共生細菌のゲノムサイズは約 1.9Mbp で、1,681 個の CDS を有し、GC 含量は 34.9% であった。16S rRNA 遺伝子配列の解析からは *Rickettsia bellii* が最近縁であることが示されたが、相同性は 93.8% にとどまった。また、公開されているゲノムデータより最近縁のデータを調査したところ、*P. nephridiatum* のシーケンスから見出された *Candidatus Megaera venefica* と 99.9% の ANI 値を示した。この結果は、*P. nephridiatum* には特定の *Rickettsiaceae* 科細菌が共生している可能性を強く示唆している。当該共生細菌がプラスミドを有しているかなど、ゲノム構成の詳細については未解明な点も残されているが、本発表では、上記の結果に加え、この *Rickettsiaceae* 科近縁細菌の遺伝子を対象に KEGG に基づく代謝経路予測や GO 解析を行い、その生態を解明するとともに、ゾウリムシとの共生関係について考察する。

P1-002

尿路感染症原因菌 *Actinotignum* 属菌種の系統分類における新規解析手法の確立

○富田 純子, 久綱 僚, 森 亮太, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

Differentiating closely related *Actinotignum* species using a novel genetic marker

○Junko Tomida, Ryo Kutsuna, Ryota Mori, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】グラム陽性嫌気性桿菌である *Actinotignum* 属菌種は、尿路感染症からの分離が多く報告されており、その他には菌血症、感染性心内膜炎、軟部組織感染症等からの分離報告もある。本属菌種は生化学性状試験や 16S rRNA 塩基配列解析による菌種レベルの同定が困難であり、新たな系統分類の手法が必要とされている。そこで、本菌群の系統解析に有用な遺伝子を探索し、迅速および正確に分類できる方法の確立を目的とした。

【方法】*Actinotignum* 属菌種的全ゲノム配列を利用して、TYGS, ANI, GGDG 解析を行い菌種の判定を行った。さらに 18 種 (atpA, atpD, dnaE, dnaJ, dnaK, fusA, gltX, groL, gyrA, gyrB, metG, pgi, pheS, recA, rpoA, rpoB, rpoD, tuf) の Housekeeping gene を用いて系統解析を行い、分類に有用な遺伝子を探索した。

【結果および考察】全ゲノム解析では、TYGS・ANI・GGDC のそれぞれの結果について基準株と比較し、3 解析とも菌種分類の閾値 (TYGS : species cluster, ANI : >95%, GGDG : >70%) を上回った菌株について同一菌種と確定した。16S rRNA 塩基配列を用いた系統解析では、*A. schaalii*, *A. sanguinis*, *A. timonense*³ 菌種の相同性が高く、正確に分類することが不可能であったが、18 種の Housekeeping gene の配列を比較して系統解析を行ったところ、gyrA および gyrB を使用した解析はゲノムによる分類結果と一致しており、菌種レベルまで明確に分類できることが判明した。gyrA は基準株と 97.6% 以上、gyrB は基準株と 98.4% 以上の相同性を示した場合に同一菌種と同定された。これらの遺伝子は *Actinotignum* 属菌種分類における有用な遺伝子マーカーであると考えられる。

P1-003

毒素型判定不能な牛由来 *Clostridium perfringens* 株のゲノム解析

○馬田 貴史¹, 越智 建太², 岡本 真理子¹, 高松 大輔^{1,3} (¹農研機構・動衛研・動物感染症, ²愛媛県・東予家保・今治支所, ³岐阜大院)

Genomic analyses of a toxinotype-untypable *Clostridium perfringens* strain isolated from a cow

○Takashi Mada¹, Kenta Ochi², Mariko Okamoto¹, Daisuke Takamatsu^{1,3} (¹Anim. Infect. Dis. Res. Div., Natl. Inst. Anim. Hlth., NARO, ²Imabari Br., Toyo LHSC, Ehime Pref., ³Grad. Sch., Gifu Univ.)

【背景】*Clostridium perfringens* は、保有毒素遺伝子に基づき 7 毒素型 (A-G 型) に分類され、F 型菌は *cpe* 遺伝子 (エンテロトキシンをコード) を保有する食中毒の原因菌、G 型菌は *netB* 遺伝子 (NetB をコード) を保有する鶏の壊死性腸炎の原因菌として知られている。今回、両遺伝子を保有し、7 毒素型で分類できない新しい毒素遺伝子保有パターンを示す株についてゲノム解析を行った。【材料・方法】突然死した 69 か月齢のホルスタイン種の雌の腸内容物から複数の *C. perfringens* が分離され、PCR による毒素型判定と MLST 解析を行った。毒素型判定不能株 (以下 CP280) については、NGS データ (DNBSeq/BGI 及び MinION/Nanopore) を取得してコンプライートゲノムの構築、既報の *C. perfringens* 株との SNP 系統解析及び毒素遺伝子保有プラスミドの比較を行った。【結果】分離株のうち 1 株 CP280 は、*cpa*, *cpe* 及び *netB* を保有して毒素型判定不能であった。CP280 は、G 型菌のみで構成される ST に分類され、*cpe* と *netB* は各々別のプラスミド上に存在し、系統樹上では多くの G 型菌と同じクレードに分類された。既報の *cpe* 保有プラスミドの遺伝子構成は複数パターン認められたが、CP280 の *cpe* 保有プラスミドは既報のどのパターンとも異なっていた。CP280 の *netB* 保有プラスミドは、既報の *netB* 保有プラスミドと概ね同様であった。【考察】CP280 は、本来 *netB* を保有する G 型菌であった株が、*cpe* を新たに獲得したと考えられた。従って、CP280 は G 型菌の一つとして扱い、G 型菌の毒素保有条件のうち、*cpe* を (-) から (±) に変更することを提案したい。今後は、人と鶏に病原性を示す毒素遺伝子を併せ持つ CP280 の病原性や宿主との関係性について更なる解析を行う。

P1-004/FL1-01

日本の土壌から単離された *Lysobacter claricitrinus* の新菌種提案

○森 亮太, 久綱 僚, 富田 純子, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物学)

Proposal of *Lysobacter claricitrinus* sp. nov., isolated from soil in Japan

○Ryota Mori, Ryo Kutsuna, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

【背景・目的】土壌環境には多様な細菌が存在しているが、栄養豊富な培地を使用すると、増殖速度の遅い細菌は速い細菌に競り負けてしまい、培養が難しくなる可能性がある。本研究では、0.1×TSA 培地を使用し、土壌中から *Lysobacter* 属の菌株を単離したので、近縁種株と比較解析を行い分類学的位置を確認した。

【方法】土壌サンプルを 10 倍に希釈した TSA 培地で分離培養後、16S rRNA 遺伝子配列の BLAST 相同性解析を用いてスクリーニングを行い、*Lysobacter* 属菌を単離した。本菌株を 16S rRNA 遺伝子配列による系統学的解析、形態学的解析、生化学的解析、全ゲノム解析を行い、近縁種株と比較した。

【結果・考察】本株は黄色色素を産生し、グラム陰性で、鞭毛を持たず非運動性の好気性桿菌である。また、30°C および pH7.0 付近で最適に増殖し、一般的な *Lysobacter* 属の細菌と比較してやや遅い増殖速度を示すことが確認された。16S rRNA 遺伝子の系統解析の結果、近縁種株との相同性は 98.1% であった。全ゲノム解析による DNA の塩基配列全長は 3,091,000bp、G + C 含量は 67.8 mol% であった。さらに、近縁種株との OrthoANIu 値は 82.66%, dDDH 値は 27.3% であり、新菌種と判定される基準を満たしていた。生化学試験ではエスクリン加水分解が陽性で近縁種株と違いがみられた。これらの結果から、本株は *Lysobacter* 属の新菌種であると考えられ、*Lysobacter claricitrinus* sp. nov. を提案する。今後は、本株の有用物質産生の可能性についても探求していきたい。

P1-005/FL1-02

国内で市販される食用昆虫由来セレウス菌の毒素関連遺伝子および MLST 解析

○下島 優香子¹, 岡 胡桃¹, 土屋 響己¹, 岡田 由美子², 森田 幸雄³ (¹東洋大・食環境・食環境, ²国立衛研・食管, ³麻布大・獣)

Toxin-related genes and MLST analysis of *Bacillus cereus* from edible insects retailed in Japan

○Yukako Shimojima¹, Kurumi Oka¹, Hibiki Tsuchiya¹, Yumiko Okada², Yukio Morita³ (¹Dept. Food Life Sci., F. Food Nutr. Sci., Toyo Univ., ²Div. Biomed. Food Res., Nat. Inst. Health Sci., ³Sch. Vet. Med., Azabu Univ.)

昆虫食は優良なたんばく質源として期待されており、安全性評価に関するデータが求められている。我々は国内で市販される食用昆虫の細菌学の実態調査を行い、セレウス菌が分離されることを報告した。今回は食用昆虫由来セレウス菌の毒素関連遺伝子および MLST 解析を実施した。

2023 年に国内のインターネット通販 3 社から購入した冷凍生昆虫 29 検体 (国産品 21 検体, 輸入品 8 検体), 粉末昆虫 10 検体 (輸入品), 加工昆虫 2 検体 (国産品) の計 41 検体中 37 検体 (90.2%) から分離された 47 株を供試した。なお, MYP 寒天培地で定型集落を形成し, 羊血液寒天培地で溶血を示す株をセレウス菌とした。セレウリド合成酵素遺伝子 (CRS, TaKaRa), *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK*, *entFM* (Kim et al., 2015) を検出する PCR の結果, CRS は 31 株 (2.1%), *nheA+nheB+nheC* は 42 株 (89.3%), *hblA+hblC+hblD* は 1 株 (70.0%), *cytK* は 36 株 (76.6%), *entFM* は 45 株 (95.7%) が陽性であった。1 株はレンチナーゼ遺伝子 (TaKaRa) が陰性で, 16SrRNA 解析の結果 *Bacillus cytotoxicus* であった。本株は *cytK* の他, *B. cytotoxicus* に報告される *nhe* variant (Burtscher et al., 2021) が陽性であった。本菌は食中毒事例や粉末昆虫からの分離報告があり, 今回は冷凍生昆虫 (オケラ) から分離された。MLST 解析 (PubMLST) の結果, 決定された 45 株は ST3326 (新規登録) が 4 株, ST26, ST1668, ST3331 (新規登録) がそれぞれ 2 株でそれ以外は全て異なり, 全 39 種の ST 型 (内 20 種は新規登録) に分類された。食用昆虫は嘔吐毒や下痢毒の遺伝子を保有するセレウス菌等が存在すること, MLST 型は既報とは異なる型を含む多様な型を示すことが明らかになった。

P1-006

国内で分離された患者及び食品由来 *Listeria monocytogenes* の分子疫学的解析

○岡田 由美子¹, 西田 智子¹, 山本 詩織², 李 謙—³, 泉谷 秀昌³, 西野 由香里⁴, 井田 美樹⁴, 下島 優香子⁵, 都丸 亜希子¹ (¹国立衛研・食管, ²鎌倉女子大・家政・管理栄養, ³感染研・細菌第一, ⁴都健安健・微生物, ⁵東洋大・食環境科学・食環境科学)

Genomic analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from patients and foods in Japan

○Yumiko Okada¹, Tomoko Nishida¹, Shiori Yamamoto², Ken-ichi Lee³, Hidemasa Izumiya³, Yukari Nishino⁴, Miki Ida⁴, Yukako Shimojima⁵, Akiko Tomaru¹ (¹Div. Biomed. Food Res., Nat. Inst. Health Sci., ²Dept. Nutr. Diet., Kamakura Womens Univ., ³Dept. Bacteriol. I, NIID, ⁴Dept. Bacteriol., Tokyo Met. Res. Inst., ⁵Dept. Food Life Sci., F. Food Nutr. Sci., Toyo Univ.)

Listeria monocytogenes は、欧米で食品衛生管理上の最重要項目とされ、WGS 解析による集団事例の検出及び原因食品の同定が行われている。一方、国内ではリステリア症の集団事例発生状況はほとんど明らかになっていない。我々は第 90 回本学会において、国内のリステリア症の解明を目的として患者由来株 105 株及び食品由来株 260 株のバルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析結果を報告した。その結果、同じ PFGE 型を示す菌株群が複数見られたことから、今回これらの菌株の近縁度をより詳細に調べる目的で全ゲノム解読データを取得し、cgMLST 解析を実施した。PFGE 解析で複数の菌株が相同だったものは血清型 1/2a 株において計 3 パターン、1/2b 株 1 パターン、4b 株 6 パターンで、合計 26 菌株あった。WGS により得られた配列を用い、パスツール研究所のリステリアゲノム解析サイトにて Clonal Complex (CC) 及び Sequence Type (ST) の同定及び cgMLST 解析を行った。PFGE で同じパターンを示した菌株の多くは、同じ CC に属していた。また、散発事例患者由来株の中に同一の cgMLST 型を示した株があり、集団事例の可能性が疑われた。同一の PFGE 型を示した患者由来 1 菌株、食品由来 6 菌株は全て CC155/ST155 であったが、cgMLST で患者株と同一となった食品株は鶏肉由来 1 菌株とネギトロ由来 2 菌株であり、より精度の高い解析が可能となった。本研究の結果、日本国内の過去の散発事例由来株、あるいは食品由来株の中に極めて近縁な株が見つかり、表面化していないリステリア症の集団事例及び食中毒事例が発生している可能性が示された。

P1-007

Detection of *Orientia tsutsugamushi* from bat-related mites in Yaeyama Islands, Okinawa

○Yongjin Qiu¹, 田村 常雄², 河合 久仁子³, 中尾 亮¹ (¹北大・獣医・寄生虫, ²東洋蝙蝠研究所, ³東海大・生物・生物)

○Yongjin Qiu¹, Hisao Tamura², Kuniko Kawai³, Ryo Nakao¹ (¹Lab. Parasitol., Grad. Sch. Vet. Med., Hokkaido Univ., ²The Asian Bat Res. Inst., ³Dept. Biol., Sch. Biol. Sci., Tokai Univ.)

Orientia tsutsugamushi is a causative agent of scrub typhus in Asia and Pacific regions and transmitted by chigger mites (genus *Leptotrombidium*). It is estimated that more than one million people are infected with scrub typhus each year. In Japan, scrub typhus is one of the most common vector-borne infectious diseases, with 400-500 cases including a few fatal cases annually. Endemic areas and season depend on the distribution of the vector chigger mite species and the timing of larval activity, respectively. Since there are several serotypes of *O. tsutsugamushi*, it is important to know which serotypes are prevalent in the region for diagnosis. We collected mites from lesser roundleaf bat, *Hipposideros turpis*, in Yaeyama Islands in Okinawa. DNA was extracted from individual mites using Kaneka DNA extraction kit and *O. tsutsugamushi* was screened by real-time PCR targeting 16S rDNA. Characterization was done using the sequences of 47-kDa and 56-kDa type-specific antigen genes. Out of 31 mites, 28 were positive for the real-time PCR. The obtained sequence of 56-kDa gene showed 97.0% (1,106/1,140 bp) identity with *O. tsutsugamushi* strain O3 (KC688323). This study is the first record of *O. tsutsugamushi* in Yaeyama Islands and the first detection of *O. tsutsugamushi* from bat-related mites. To draw the whole picture of *O. tsutsugamushi* on Yaeyama Island, further studies are required.

P1-008/FL1-03

Upstream Genetic Structures (UGS) とレプリコンタイプを用いたプラスミド構造推定

○宮里 由来¹, 屋宜 宣慶², 平井 到¹ (¹琉球大・保健・微生物, ²琉球大・保健・生理機能)

Plasmid structure prediction using Upstream Genetic Structures (UGS) and replicon types

○Sora Miyazato¹, Nobuyoshi Yagi², Itaru Hirai¹ (¹Lab. Microbiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus, ²Lab. Clin. Physiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus)

薬剤耐性菌は医療関連施設だけでなく市中や環境からも検出される。薬剤耐性遺伝子は主にプラスミドにより伝播することが知られており、その経路を知ることは薬剤耐性菌の感染制御を考える上で重要である。プラスミドの伝播経路の推定には主に遺伝系統を比較する方法が用いられるが、プラスミドは移送中に変異が入りやすいため ORF (Open reading frame) での推定が困難となる場合がある。当研究室ではこれまでに、薬剤耐性遺伝子の upstream 構造 (Upstream genetic structures, UGS) を用いた解析法を確立した。しかし、薬剤耐性遺伝子はプラスミド上の一領域に集積して存在することが多く、プラスミド全体の構造推定という点では不十分である可能性がある。そこで本研究では、UGS とプラスミドレプリコンタイプを組み合わせて、より正確にプラスミド配列を推定する方法の確立を目指した。沖縄県内の医療関連機関から検出されたセフトキシム耐性大腸菌株を、Nanopore シーケンサーを用いて全ゲノム解析し、得たシーケンスリードから薬剤耐性遺伝子の UGS とプラスミドレプリコンタイプを検出した。UGS を検索キーとしてデータベース上からプラスミド配列を抽出し、プラスミドレプリコンタイプによって絞り込み候補配列とした。全ゲノム解析で得られたシーケンスリードを再度アライメントし、候補配列に対するシーケンスリードのカバー率を評価した。その結果、UGS とプラスミドレプリコンタイプを組み合わせた方法を用いると、プラスミド全体の構造を予測できる可能性が示唆された。現在菌株数を増やして検討中であり、その結果も併せて発表する予定である。

P1-009

Mycobacterium shinjukuense における遺伝的多様性とゲノム安定性

○和田 崇之^{1,2}, 井上 陽晴¹, 吉田 志緒美³, 村瀬 良朗⁴, 中島 千絵^{5,6}, 鈴木 定彦^{5,6}, 御手洗 聡⁴ (1大阪公大院・生・微生物, 2大阪公大・国際感染症研究センター, 3近畿中央呼吸器センター・臨床研究センター・感染症研究部, 4結核研・抗酸菌部, 5北大・人獣研, 6北大・ワクチン拠点)

Genetic diversity and genome stability in clinical strains of *Mycobacterium shinjukuense*

○Takayuki Wada^{1,2}, Hiharu Inoue¹, Shiomi Yoshida³, Yoshiro Murase⁴, Chie Nakajima^{5,6}, Yasuhiko Suzuki^{5,6}, Satoshi Mitarai⁴ (1Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., 2Osaka Intl. Res. Center Infect. Dis., Osaka Metro. Univ., 3Clin. Res. Center, NHO Kinki Chuo Chest Med. Center, 4Dept. Mycobacterium Ref. Res., Res. Inst. Tuberculosis, 5Intl. Inst. Zoonosis Control, Hokkaido Univ., 6Insti. Vac. Res. Dev., Hokkaido Univ.)

【背景】*Mycobacterium shinjukuense* は、非結核性抗酸菌でありながら結核菌に極めて近縁な系統関係を持ち、結核菌が病原性を進化させてきた過程を理解する上で重要な菌種群である *M. tuberculosis*-associated phylotype (MTBAP) に属する。本菌は、東アジア、とりわけ日本で臨床的に報告されており、日本国内において臨床分離される唯一の MTBAP である。【方法および試料】日本国内の複数地域から分離された臨床株 (18 株) について、MiSeq を用いたゲノムショートリード解析を実施した。参照配列に基づく変異検出後、変異領域に基づいた系統解析を行った。また、系統的に異なる 5 株を選択し、PacBio を用いてロングリード解析を実施し、完全長配列を決定した。これらの完全長ゲノムを比較することで、菌株間のゲノム安定性を評価した。【結果】全 18 株の系統解析の結果、分離地域や分離年度が異なるにもかかわらず、菌株間で高い相同性が認められた。さらに、完全長ゲノムの比較においても菌株間で高いシグナチャーが確認され、結核菌群に類似した安定的なゲノム構造が示された。また、解析対象の 1 株において、遺伝子の水平伝播を起源とするユニークな遺伝子の挿入が確認された。本研究は、*M. shinjukuense* の遺伝的多様性、アウトブレイクの可能性、および *M. tuberculosis* との進化的関係について重要な知見を提供するものである。(会員外研究協力者: 福島由華理)

P1-010

Phylogenetic and comparative genomics analysis of *Bordetella parapertussis* isolated in Japan

○小出 健太郎, 蒲地 一成, 大塚 菜緒, 後藤 雅貴, 見理 剛 (感染研・細菌二)

○Kentaro Koide, Kazunari Kamachi, Nao Otsuka, Masataka Goto, Tsuyoshi Kenri (Dept. Bact. II, Natl. Inst. Infect. Dis.)

While both *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* are the causative agents of pertussis, *B. parapertussis* is isolated much less frequently than *B. pertussis*. In 2023, three isolates of *B. parapertussis* (isolate IDs: BPP43, 44 and 45) were collected in Japan for the first time in four years. To investigate the genetic relationships with previous Japanese isolates, whole-genome analysis of these isolates was performed. The three isolates, along with 14 Japanese isolates previously collected, were sequenced using the Illumina NovaSeq6000 platform. In total, 209 isolates, including Japanese and global isolates with publicly available sequence data, were analyzed to identified single nucleotide variants (SNVs). A SNV-based phylogenetic tree was constructed, and SNVs shared by all isolates within the clades identified in the phylogenetic tree were further analyzed. BPP43, 44, and 45 were grouped in the same clade in the phylogenetic tree. The clade did not include any other Japanese isolates, indicating their genetic distinction from previous Japanese isolates. Six SNVs were identified as unique to the isolates in this clade. These findings suggest that the strain carrying these unique genetic features spread in Japan.

P1-011

Clinical utility of new MLST scheme in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak analysis

○柳原 正志¹, 狩野 真樹^{1,2,3}, 原田 哲也⁴, 須合 恵美³, 狩野 瑞紀³, 大瀧 博文², 花田 浩之³, 高野 徹³, 倭 正也³, 岡本 成史¹ (1阪大院・医保・生体病態情報科学, 2関西医療大・保・臨検, 3りんくう総合医療センター, 4大安研・微生物部)

○Masashi Yanagihara¹, Masaki Karino^{1,2,3}, Tetsuya Harada⁴, Megumi Sugo³, Mizuki Karino³, Hirofumi Ohtaki², Hiroyuki Hanada³, Toru Takano³, Masaya Yamato³, Shigefumi Okamoto¹ (1Dept. Clin. Lab. Biomed. Sci., Grad. Sch. Med., Osaka Univ., 2Dept. Med. Tech., Fac. Health Sci., Kansai Health Sci. Univ., 3Rinku Gen. Med. Ctr., 4Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is still used as a molecular epidemiology tool for controlling nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) infections in clinical laboratories despite the increasing availability of whole genome sequencing. As PFGE equipment was commercially unavailable, alternative tools that can be implemented in clinical laboratories are needed. To clarify the clinical utility of new Bezdicek multilocus sequence typing (MLST), we compared both original and new MLST schemes with PFGE using 68 VRE isolates collected during an outbreak at a Japanese tertiary medical center in 2019. PFGE analysis identified nine clusters among the 68 strains, including two predominant clusters. The original scheme identified five sequence types (ST_{OS}), of which 82.4% were ST_O192. The new scheme identified nine sequence types (ST_{BS}), subdividing the original ST_O192 into ST_B1162 (30/56), ST_B610 (25/56), and ST_B895 (1/56). Simpson's index of diversity values were 0.635, 0.317, and 0.648 for PFGE, original, and new scheme, respectively. Combining the new scheme with admission records provided clearer outbreak visualization, indicating that two distinct ST_{BS} independently caused sequential outbreaks. With high discriminatory power comparable to PFGE, the new Bezdicek MLST is a useful tool for controlling nosocomial VRE infections in clinical laboratories.

P1-012/FL1-04

Virulence-type IV secretion system and cell wall-anchored protein folding structures in CA-MRSA/J

○Tsai-Wen Wan^{1,2}, Lee-Jene Teng², 山本 達男¹ (1国際医学教育研究センター・疫学ゲノム進化解析部, 2国立台湾大・医)

○Tsai-Wen Wan^{1,2}, Lee-Jene Teng², Tatsuo Yamamoto¹ (1Dept. Epidemiol. Genomics Evol., Intl. Med. Edu. Research Center, 2Dept. Clin. Lab. Sci. Med. Biotechnol., National Taiwan Univ.)

Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) exhibits phase switching, epidemic skin infections versus severe invasive infections. Molecular mechanisms for the phase switching are not fully understood. In this study, we investigated CA-MRSA/J (ST8/SCC *mecIV*), through genome sequencing, plasmid analysis, protein folding structure prediction, and HEp-2 cell infection assay. CA-MRSA/J possessed conjugative plasmid pWtra, encoding type IV secretion system (T4SS), and non-conjugative p32kb, carrying toxin genes *citA*-*B*-*C*; pWtra/p32kb exhibiting high frequency mobilization. The CA-MRSA/J core-genome encoded large cell wall-anchored (CWA) protein SPJ, with novel folding structures, possibly reinforcing the cell wall compartment. CA-MRSA/J achieved the clinical phase switching through mutations of the virulence-T4SS system pWtra/p32kb and changes of hypervariable SPJ structures. Epidemic skin infection cases had pWtra/p32kb and long SPJ; long SPJ acted as adhesin and T4SS enhanced SPJ adherence. In contrast, a severe iliopsoas abscess case possessed p32kb only and short SPJ (a strong invasion factor). A necrotizing pneumonia case possessed *citA*⁺ (*citB*⁻, *citC*⁻) p32kb mutant and long SPJ, suggesting crucial action of superantigen *CitA* and lung adherence. SPJ (novel class of CWA protein) and pWtra/p32kb (novel virulence-T4SS system) open new research fields.

P1-013

細菌ゲノム解析パイプライン(SNPcaster)の開発および共有化方法の構築

○李 謙¹, 森田 昌知¹, 泉谷 秀昌¹, 伊豫田 淳¹, 中村 佳司², 山岸 敏明¹, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細1, ²九大・医・細菌)

SNPcaster: core genome-SNP analysis pipeline for bacteria

○Ken-ichi Lee¹, Masatomo Morita¹, Hidemasa Izumiya¹, Sunao Iyoda¹, Keiji Nakamura², Toshiaki Yamagishi¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Bacteriol., Fac. Med. Sci., Kyushu Univ.)

【背景と目的】近年、高速シーケンサーの実用に伴い、病原菌の集団感染調査や系統解析に全ゲノム配列 (whole-genome sequence, WGS) から抽出したコアゲノム SNP (cgSNP) を用いることで、菌株間の関連性を高精度で明らかにすることが可能となっている。しかし、解析には多様なプログラムを複数組み合わせる必要があるため、インストールの難易度が高く、また解析条件の統一化が困難であった。そこで、docker コンテナおよび JupyterLab を用いることで、OS を選ばずに簡単にインストールおよび解析が可能な環境の構築を行った。【プログラム詳細】次の2種の解析パイプラインを構築した: 1) アセンブリ・クオリティチェック (grape_qc_assembly), 主に SPAdes または SKESA を用いてアセンブリを行い、checkM 等を用いてショートリードデータのクオリティチェックを行う; 2) cgSNP 解析 (SNPcaster), 主に BactSNP および Snippy を用いた cgSNP 解析を行う。これらのパイプラインを、数行のコマンド操作で docker コンテナ内にインストールできるような命令ファイルおよびマニュアルを作製した。解析の実行はマニュアルと一体化した JupyterLab で行い、ボタン操作で実行可能とした。【結果および考察】本パイプラインでは、BactSNP を用いることで高精度な cgSNP 解析を、Snippy を用いることで高速な再解析を行うことを可能とした。試験的に10以上の研究機関に配布し、簡便なインストールおよび実行が可能であることを確認済みである。本プログラムを使用することで解析条件を統一することが可能となり、複数自治体における集団感染等においても、結果の共有が容易になると考えられる。

P1-014

富山県の A 群溶血性レンサ球菌感染症における M1UK 系統の分離状況

○齋藤 和輝, 池田 佳歩, 清水 ひな, 金谷 潤一, 木全 恵子, 大島 萌愛, 大石 和徳 (富山県衛生研究所 細菌部)

Isolation of M1UK lineage from patients with Group A Streptococcus infections in Toyama Prefecture

○Kazuki Saito, Kaho Ikeda, Hina Shimizu, Junichi Kanatani, Keiko Kimata, Moe Oshima, Kazunori Oishi (Dept. Bacteriol., Toyama Inst. Health)

【背景および目的】A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) は、咽頭炎や化膿性皮膚感染症などの原因菌である。加えて、ショックを伴い急激に進行する劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (Streptococcal toxic shock syndrome: STSS) の原因菌の一つである。わが国では 2023 年下半期以降、GAS 咽頭炎および STSS の患者報告が増加している。STSS 患者由来株では、英国を中心に流行し、高病原性である M1UK 株が 2018 年以降に検出され始め、検出率が増加しつつある。しかしながら、現時点で咽頭炎由来 GAS と M1UK 株の関連についてはほとんど知見がない。本研究では、富山県の GAS 咽頭炎および STSS 患者における M1UK 株の侵襲状況を把握することを目的とした。【方法】富山県内の2つの医療機関の協力を得て、主に小児咽頭炎由来 GAS を収集した。emm 型を決定し、emm1 型については M1UK 系統かを解析した。行政検査で当所に搬入された GAS による STSS 患者由来株についても同様に解析した。【結果および考察】emm 型および M1UK 系統の分離状況は2医療機関で異なった。医療機関 A、B ではそれぞれ emm1, emm4 が半数を占めた。加えて、医療機関 A では M1UK 株が半数を占めたのに対し、医療機関 B では中間系統 M1_{intermediate} 株のみが検出された。2医療機関は異なる生活圏に位置していることから、咽頭炎由来株の地域流行が示唆された。STSS 患者由来株についても、解析数は少数だが M1UK 系統株が検出された。今後も GAS 感染症の発生動向を注視し、M1UK 系統の疫学的特徴を把握していく必要がある。

P1-015

エンテロトキシン P 遺伝子 (sep) 保有黄色ブドウ球菌食中毒事例及び分離株の遺伝子学的解析

○土井 りえ, 吉田 理沙, 山崎 悠華, 久保川 竣介, 古山 裕樹, 千葉 雄介, 成澤 一美 (埼玉衛研)

A food-poisoning case due to Staphylococcus aureus carrying sep and the characteristics of isolates

○Rie Doi, Risa Yoshida, Yuka Yamazaki, Shunsuke Kubokawa, Yuki Koyama, Yusuke Chiba, Kazumi Narisawa (Saitama Inst. Public Health)

【背景】黄色ブドウ球菌毒素 (SEs) は 1970 年代にエンテロトキシン A～E (SEA～SEE, 古典的 SEs) が同定されていたが、近年、SEA～SEE 以外の嘔吐活性を持つ毒素 (新型エンテロトキシン, 新型 SEs) が複数報告された。現在、新型 SEs は 20 種以上が報告されているが、健康被害事例の報告はわずかで、黄色ブドウ球菌の各毒素の保有状況やヒトにおける嘔吐活性などその実態はよく分かっていない。

2024 年に埼玉県内で SEP 遺伝子保有黄色ブドウ球菌による食中毒が発生した。当該食中毒事例では分離菌株について Multilocus Sequence Typing による分子疫学解析を実施した。また、過去に埼玉県で発生した食中毒事例等由来の黄色ブドウ球菌の保存菌株についても同様に SEs 保有状況及び MLST を確認し、併せて分子疫学解析を実施したので報告する。

【結果及び考察】2024 年 8 月、埼玉県内の福祉施設で仕出し弁当を喫食した 19 名中 4 名が喫食後約 4 時間半で嘔吐、下痢等を発症した。原因究明のための細菌及びウイルス検査の結果、発症者、従事者、食品及び施設等ふき取り検体から黄色ブドウ球菌が検出された。また、分離された各菌株の SEs 遺伝子検査を実施したところ、全ての分離株に共通して古典的 SEs は検出されず、新型 SEs である SEP 遺伝子のみが検出されたことから、当該事例は SEP 遺伝子保有黄色ブドウ球菌による食中毒と断定された。MLST による分子疫学解析では全ての分離株は ST7 に分類された。過去の黄色ブドウ球菌保存菌株の遺伝子保有状況等については解析中のため、本学会で統合して結果及び考察を報告する。

P1-016

我が国の牛群における *Salmonella* Dublin の遺伝的集団構造と流行動態

○新井 暢夫¹, 山田 真喜子², 山本 彩乃³, 松本 実香⁴, 玉村 雪乃¹, 桃木 杏奈¹, 渡部 綾子¹, 岩田 剛敏¹, 秋庭 正人⁵, 楠本 正博^{1,6} (¹農研機構・動衛研, ²北海道・網走家保, ³北海道・十勝家保, ⁴農研機構・食品研, ⁵酪農大・獣医細菌, ⁶大阪公立大院・獣医)

Population structure and epidemic dynamics of *Salmonella* Dublin isolated from cattle in Japan

○Nobuo Arai¹, Makiko Yamada², Ayano Yamamoto³, Mika Matsumoto⁴, Yukino Tamamura¹, Anna Momoki¹, Ayako Watanabe¹, Taketoshi Iwata¹, Masato Akiba⁵, Masahiro Kusumoto^{1,6} (¹Natl. Inst. Anim. Health, NARO, ²Abashiri Live. Hygi. Serv. Cent., Hokkaido Pref., ³Tokachi Live. Hygi. Serv. Cent., Hokkaido Pref., ⁴Inst. Food Res., NARO, ⁵Lab. Vet. Bac., Dept. Pathobiol., Rakuno Gakuen Univ., ⁶Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

【背景】*Salmonella* Dublin (SD) は牛のサルモネラ症における主要な原因血清型であり、近年は分離頻度が上昇している。一方で、近年の分離株と各年代及び海外株との遺伝的関係性は不明である。本研究では、全ゲノム情報を基に我が国の牛群に分布する SD の遺伝的集団構造を解析するとともに、流行系統及びその特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】1977～2023 年に 28 都道府県の牛から分離された SD 212 株を収集し、全ゲノム塩基配列情報を取得した。公共データベースより 1956～2023 年に 19 か国で分離された SD 199 株の全ゲノム情報を取得し、合計 411 株のコアゲノム塩基多型による系統解析を実施した。さらに国内主要系統について有効集団サイズ (Ne) の推移を調べた。各株のドラフトゲノムを対象に薬剤耐性遺伝子及びプラスミドを検索し、代表株について完全長ゲノムを決定した。【結果・考察】系統解析の結果、SD は 7 つのクレードに分けられ、国内株はクレード 3, 4, 6, 7 に集約された。各クレードを構成する菌株の主な分離年代は、クレード 3 及び 4: 1990 年以前、クレード 6: 1990～2010 年、クレード 7: 2015 年以降であった。主要系統の中で、クレード 6 の Ne は 1990 年代にピークに達した後、減少した。一方、国内株と北米株で構成されるクレード 7 は 2010 年代より Ne が増大し、近年の流行系統と考えられた。クレード 7 は、5～10 種類の薬剤耐性遺伝子を搭載した IncC プラスミドを保有しており、その内部構造にバリエーションが認められた。以上の結果から、近年、我が国の牛群において、過去の国内株とは遺伝的背景が異なり、多剤耐性の特徴とする海外株と近縁な SD クレード 7 の浸潤が示唆された。

P1-017

Molecular epidemiological analysis of PVL-positive MSSA isolates in Japan

栗原 陸斗, 金子 寛, 〇中南 秀将 (東京薬大・薬・臨床微生物)

Rikuto Kurihara, Hiroshi Kaneko, 〇Hidemasa Nakaminami (Dept. Clin. Microbiol., Sch. Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Object: In recent years, there has been a marked increase in infections caused by highly virulent MRSA strains that produce Panton-Valentine leukocidin (PVL) in Japan. Despite their high virulence, little is known about PVL-positive MSSA. The objective of this study was to investigate the molecular epidemiological characteristics of PVL-positive MSSA isolated in Japan.

Methods: A total of 1,801 MSSA strains were included in this study, isolated from patients who visited 58 medical institutions across Japan between the years 2013 and 2021. PCR was conducted to detect a range of genes, while molecular epidemiological characteristics were analyzed using MLST, PFGE, spa typing, and phage typing.

Results and Discussion: Of the 1,801 MSSA strains examined, 38 (2.1%) were PVL-positive, exhibiting a significantly lower PVL-positive rate than that of MRSA ($P < 0.01$). A total of 65.8% of PVL-positive MSSA were derived from deep-seated skin infections. Furthermore, 34.2% of PVL-positive MSSA were classified as CC8, while the remainder were assigned to various CCs, including CC22, CC30, and CC88. The findings of this study indicate that PVL-positive MSSA strains isolated from the community in Japan, despite being less frequently isolated than PVL-positive MRSA strains, are associated with severe skin infections and exhibit diverse genotypes.

P1-018/FL1-05

緑膿菌の国内臨床分離株における病原因子に基づくグルーピング

〇佐野 隆之¹, 山崎 浩平¹, 北川 浩樹², 今井 一男³, 市村 辰太郎³, 萩谷 英大⁴, 柏本 孝茂¹ (¹北里大・獣医・獣医公衆衛生, ²広島大病院・感染症科/感染制御部, ³埼玉医科大病院・中央検査部, ⁴岡山大病院・感染症内科)

Classification of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* based on virulence genes

〇Takayuki Sano¹, Kohei Yamazaki¹, Hiroki Kitagawa², Kazuo Imai³, Shintaro Ichimura³, Hideharu Hagiya⁴, Takashige Kashimoto¹ (¹Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ., ²Dept. Infect. Dis., Hiroshima Univ. Hosp., ³Central Lab., Saitama Med Univ. Hosp., ⁴Dept. Infect. Dis., Okayama Univ. Hosp.)

緑膿菌は病原性遺伝子の保有状況により、グループ 1; 孔形成毒素 *exlA* (-), T3SS machinery *pscL* (+), T3SS effector *exoU* (-), グループ 2; *exlA* (-), *pscL* (+), *exoU* (+), グループ 3; *exlA* (+), *pscL* (-), *exoU* (-) の 3 つのグループに分けられる。グループ 2 はホスホリパーゼ A2 活性を持つ *ExoU* を有しており、本グループに属する緑膿菌に感染した患者では、早期の敗血症リスクが高まることが報告されている。グループ 3 は検出例が少ないものの、代表株を用いたマウス実験系において、*ExlA* が出血性肺炎を引き起こすことが示され、患者で認められる症状を再現できたとの報告がある。グループ 1 は、グループ 2, 3 以外であり、他のグループと比較して特徴的臨床症状を示さない、いわゆる一般的な緑膿菌とされている。以上のように各グループにより引き起こされる症状が異なっていることから、どのグループの緑膿菌に感染しているのかを知ることは有益な情報となりうる。本研究では、グルーピングに必要な遺伝子の検出系を確立し、大学病院において血液から分離された緑膿菌 120 株についてグルーピングを実施した。結果、グループ 1 は 82.5%、グループ 2 は 17.5%、グループ 3 は 0%であった。早期敗血症に陥るリスクが高いとされているグループ 2 に属する株が約 2 割の確率で検出され、注意を要すると考えられた。グループ 3 に属する株は検出されず、国内における存在率あるいは感染率が低い可能性が示唆された。今後、血液以外からの分離株も収集し、検体数を増やして調査を継続すると共に、患者情報との照合を進め、各グループにおける重症化率等に違いが認められるか否か解析する予定である。

P1-019

Occurrence and cross contamination of *Escherichia albertii* in retail chicken outlets in Bangladesh

〇日根野谷 淳^{1,2,3,4}, Jayedul Hassan⁵, Kishor Sosmith Utsho⁵, Susmita Karmakar⁵, Md. Wohab Ali⁵, Sharda Prasad Awasthi^{1,2,3}, 宇山 千晴⁴, 畑中 律敏^{1,2,3,4}, 山崎 伸二^{1,2,3,4} (¹大公大・獣医・獣医国際防疫, ²阪公大・アジア健科研, ³阪公大・大阪国際感染症研究セ, ⁴大府大・生命・獣医, ⁵Dept. Microbiol. Hyg., Bangladesh Ag. Univ.)

〇Atsushi Hinenoya^{1,2,3,4}, Jayedul Hassan⁵, Kishor Sosmith Utsho⁵, Susmita Karmakar⁵, Md. Wohab Ali⁵, Sharda Prasad Awasthi^{1,2,3}, Chiharu Uyama⁴, Noritoshi Hatanaka^{1,2,3,4}, Shinji Yamasaki^{1,2,3,4} (¹Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metrop. Univ., ²Asian Health Sci. Res. Inst., Osaka Metrop. Univ., ³Osaka Int. Res. Cent. Infect. Dis., Osaka Metrop. Univ., ⁴Fac. Vet. Sci., Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., ⁵Dept. Microbiol. Hyg., Bangladesh Ag. Univ.)

Escherichia albertii is an emerging foodborne pathogen, with poultry meats being considered as a key source of human infections. However, little is known about the distribution and characteristics of this bacterium in Bangladesh. This study investigated the occurrence, antimicrobial resistance, and virulence of *E. albertii* in retail chicken meats in Bangladesh. We collected samples from 61 dressed chickens across 17 retail shops from 4 upazilas, along with swabs from cloaca, processing utensils, and worker hands. Detection of *E. albertii* by species-specific PCR revealed substantial occurrence of *E. albertii* in retail chicken meat (63.7%), cloaca (71.4%), human hand (45.5%), cone (13.3%) and blade (10%). Almost all the *E. albertii* isolates (94.4%) exhibited resistance to at least one of the tested antimicrobials, among which 50% were multidrug resistant. WGS analysis identified the presence of corresponding antimicrobial resistance genes and virulence genes (*eae*, *Eadct*) in the isolates. wgSNP-based phylogenetic analysis revealed that some of the isolates from the same shop displayed clonal relationships among meats, cloacal swabs, and human hand swabs, indicating contamination during processing. These findings highlight the public health risk posed by *E. albertii* in retail poultry, underlining the poultry's role as a potential vector for zoonotic transmission.

P1-020

Emergence of new subtypes of US *Neisseria meningitidis* urethritis clade isolates in Japan

〇高橋 英之¹, 森田 昌知¹, 安田 満², 大濱 侑季¹, 志牟田 健¹, 明田 幸宏¹, 大西 真³ (¹感染研・細菌1, ²札幌医大・感染制御・臨床検査医学講座, ³沖縄県衛生環境研究所 感染症研究センター)

〇Hideyuki Takahashi¹, Masatomo Morita¹, Mitsuru Yasuda², Yuki Ohama¹, Ken Shimuta¹, Yukihiro Akeda¹, Makoto Ohnishi³ (¹Dept. Bacteriol 1, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Infect. Cont. Lob. Med., Sch. Med., Sapporo Univ., ³Cent. Infect. Dis. Res.)

Neisseria meningitidis causes invasive meningococcal diseases and has also been identified as a causative agent of sexually transmitted diseases, including urethritis. Unencapsulated sequence type (ST)-11 meningococci with the gonococcal *aniA-norB* locus, named the United States *N. meningitidis* urethritis clade (US_NmUC), are causative agents of urethral infections predominantly among men who have sex with men in the U.S.A. In the present study, we identified two subtypes of unencapsulated ST-11 meningococci that were phylogenetically close to US_NmUC, and named them the Japan *N. meningitidis* Urethritis Clade (J_NmUC). The present study suggest that an ancestor for US_NmUC and J_NmUS urethritis-associated meningococci disseminated worldwide.

P1-021

Genome Characterization of *mecA*-positive *M. fleurettii*: the origin and evolution of SCC/SCC*mec* units

○漆原 範子¹, Meiji Soe Aung¹, 佐々木 崇², 川口谷 充代¹, 大橋 伸英^{1,3}, 小林 宣道¹ (¹札幌大・医・衛生, ²札幌大・医・動物実験施設, ³札幌大・医・口腔外科)

○Noriko Urushibara¹, Meiji Soe Aung¹, Takashi Sasaki², Mitsuyo Kawaguchiya¹, Nobuhide Ohashi^{1,3}, Nobumichi Kobayashi¹ (¹Dept. Hygiene, Sch. Med., Sapporo Medical Univ., ²Animal Research Center, Sch. Med., Sapporo Medical Univ., ³Dept. Oral Surgery, Sch. Med., Sapporo Medical Univ.)

Mammaliococcus, formerly classified under *Staphylococcus* until 2020, was reassigned to a novel genus based on genome-wide phylogenetic analysis. Both genera share similar beta-lactam resistance mechanisms, including the Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*). Despite its name, SCC*mec* is believed to have originated in the chromosomal DNA of *M. fleurettii*, where the native *mec* operon (*mecA*, *mecR1*, and *mecI*) is organized. *M. sciuri* likely contributed to SCC*mec* evolution, while *M. fleurettii* played a role in assembling the *mec* complex.

In this study, we sequenced the genomes of three *mecA*-positive *M. fleurettii* isolates from retail meat (P22, P23, P26). All isolates carried an SCC unit at the 3'-terminal end of the *rlmH* gene, with *mecA* encoded downstream, outside the SCC unit. However, two isolates (P22, P23) were oxacillin-susceptible due to a frameshift mutation in *mecR1* of their native *mec* operon. This supports the role of *mecR1* as a beta-lactam sensor protein in the native operon. Each SCC unit also carried cassette chromosome recombinase genes (*ccr*), which showed >90% homology to *S. aureus* *ccr* genes. In addition, P22, P23 harbored *ccrC* in their SCC units, marking the first report of *ccrC* in *M. fleurettii*. These findings raise the possibility that *M. fleurettii* may have contributed not only to the assembly of the *mec* complex but also to the shaping of SCC/SCC*mec* units.

P1-022

Salmonella status monitoring using bulk milk and calf sera and antibiogram of *Salmonella* isolates

○岡村 雅史¹, 相川 知宏¹, 佐々木 貴正¹, 鈴木 正太郎¹, 草場 信之² (¹帯広畜産大・獣医, ²帯広畜産大・畜産フィールド科学センター)

○Masashi Okamura¹, Chihiro Aikawa¹, Yoshimasa Sasaki¹, Shotaro Suzuki¹, Nobuyuki Kusaba² (¹Dept. Vet. Med., Obihiro Univ. Agri. Vet. Med., ²Field Center Anim. Sci. Agri., Obihiro Univ. Agri. Vet. Med.)

Outbreaks of bovine salmonellosis have occurred worldwide, causing significant economic losses. In Hokkaido, where dairy farming is well developed, there have been many outbreaks of salmonellosis in cattle, and effective measures to reduce this disease are strongly required on a national basis. In this study, antibody tests were performed on bulk milk and calf sera from farms with a history of outbreaks of salmonellosis due to serovar Dublin in order to monitor the status of *Salmonella* infection in the herd. In addition, with the aim of finding epidemiological associations among isolates not only from cattle but also from other livestock and the environment, antibiogram of *Salmonella* strains isolated from cattle, horses, and pigs in Hokkaido between FY 2018 and FY 2022 were also examined. Antibody testing of bulk and aggregate milk proved useful and feasible in monitoring infection status of herds. It was also suggested that high and low PP values could be used to distinguish infected and vaccinated cows. Antibody testing of calves reflected well the antibody trend after the outbreak, and provided the possibility of estimating the duration of antibodies after infection and detecting new outbreaks at an early stage. The isolates of serovar Dublin in Hokkaido showed nearly identical antibiogram, suggesting that the relative strains may be endemic throughout the Hokkaido area.

P1-023/FL1-06

等温核酸増幅法を用いた *Streptococcus intermedius* 検出システムの開発

○芝藤 あす香¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Development of detection system for *S. intermedius* with isothermal nucleic acid amplification assay

○Asuka Shibatou¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci. & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】アンギノアサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内常在性の日和見レンサ球菌である。この AGS の一構成菌種である *Streptococcus intermedius* は、主要な病原因子としてヒト細胞に特異的な作用を示す細胞溶解毒素である Intermedilysin (ILY) を産生する。この ILY のコード遺伝子を *S. intermedius* のマーカー遺伝子として選択し、核酸増幅法による高感度で迅速な検出システムの構築を目的とした。特に等温核酸増幅法は、迅速性に加え、特別な装置が不要なため簡易検査が可能で注目されている。そこで本研究は、ILY を分子標的とした等温核酸増幅法による *S. intermedius* 検出システムの構築を目的とし、検出感度や検出限界を PCR と比較検討した。

【方法】検出対象の *S. intermedius* において高度に保存されている ILY のコード遺伝子から、各核酸増幅法に適したプライマーを設計した。核酸増幅反応の鋳型として ILY 遺伝子全長の精製断片および精製ゲノム DNA 等を選択し、各核酸増幅反応を実施して、アガロースゲル電気泳動の結果に基づき、目的断片の増幅率や検出感度を PCR と比較評価した。

【結果・考察】等温核酸増幅法である Recombinase polymerase amplification (RPA) 法と PCR 法を比較すると、検出感度について PCR の方が高い結果が得られたが、RPA は反応時間が大幅に短縮でき、さらに 40°C 程度の一定温度で反応が進行することより、迅速性と簡便性に優れていた。よって、RPA 法による検出システムはオンサイトでの汎用性が高い検査系としての実用化が期待できる。現在、RPA の検出感度や反応特異性を向上させるための検討を進めている。

P1-024/FL1-07

血清中 Ag85B 抗体価検出による結核診断法の有用性評価と最適化

○山崎 智也¹, Desak Nyoman Suria Suamertia Dewi^{1,2}, 吉田 豊¹, 石川 智史^{1,3}, Ni Made Mertaniasih⁴, 尾関 百合子¹, Amina Shaban¹, 西山 晃史¹, 立石 善隆¹, 松本 壮吉¹ (¹新潟大・医学部総合・細菌学, ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³福山市立動物園, ⁴Dept. Microbiol., Sch. Med., Airlangga Univ.)

Evaluation of the usefulness of tuberculosis diagnostic method by detection of Ag85B antibody titer

○Tomoya Yamazaki¹, Desak Nyoman Suria Suamertia Dewi^{1,2}, Yutaka Yoshida¹, Satoshi Ishikawa^{1,3}, Ni Made Mertaniasih⁴, Yuriko Ozeki¹, Amina Shaban¹, Akihito Nishiyama¹, Yoshitaka Tateishi¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (¹Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Ciputra Univ., ³Fukuyama Zoo, ⁴Dept. Microbiol., Sch. Med., Airlangga Univ.)

現在世界人口の約 4 分の 1 に上ると推定されている結核菌の無症候感染者における結核発症を早期に検出し、治療につなげることが結核菌の感染拡大防止において肝要である。結核菌の感染診断法として利用されている IFN-gamma 遊離試験法 (IGRA) は感染の有無を判別できるが、無症候感染者の発症検知はできない。先行研究において、ヒトおよびゾウにおいて一部結核菌抗原に対する血清中抗体価検出により、結核菌の無症候感染時の発症リスクを検出することが示唆された。本研究では結核菌診断候補抗原の Ag85B に着目し、血清中抗体価による活動性結核診断の有用性を確かめるとともに、その方法の最適化を図った。先行研究において、Native 抗原と異なる精製タグ等の余剰の配列を持つ場合、抗体反応を阻害する可能性が示唆された。そこで我々は精製タグをエンテロキナーゼによって取り除くことによって Native 抗原と同一の配列をもつ大腸菌組換え抗原を構築した。この組換え抗原と Native 抗原に対する健康者および結核患者血清中 IgG の反応性を ELISA およびマルチプレックス解析である MAGPIX システムで比較した。タグなしの組換え抗原は結核患者血清において Native 抗原と同等の反応性を示した。大腸菌組換え抗原を用いた診断は Native 抗原と同程度の高い特異度を示した。また WHO により使用が推奨されていない既存の血清診断キットと比較して高い感度を示した。結核菌 Native 抗原と同様の配列をもつ大腸菌組換え抗原はエビトープの構造が共通し、同様の反応性を示すことから、活動性結核患者の検出に有用であると考えられる。

P1-025/FL1-08

Development of anti-*Helicobacter cinaedi* antibody titer assay

○深井 俊宏¹, 吉田 翔¹, 村上 裕輔¹, 佐藤 正樹¹, 青木 沙恵², 林原 絵美子², 荒岡 秀樹³, 齊藤 慈円⁴ (¹栄研化学株式会社, ²感染研・細菌第二部, ³虎の門病院・臨床感染症科, ⁴名古屋市・東部医療センター・心臓血管外科)

○Toshihiro Fukai¹, Sho Yoshida¹, Yusuke Murakami¹, Masaki Sato¹, Sae Aoki², Emiko Rimbara², Hideki Araoka³, Jien Saito⁴ (¹EIKEN CHEMICAL CO., LTD., ²Dept. Bacteriol. II, NIID, ³Dept. Infect. Dis., Toranomon Hospital, ⁴Dept. Cardiovasc. Surg., Nagoya City Univ., NEMC)

Helicobacter cinaedi is a bacterium that infects the human gut and is associated with infected aortic aneurysms. Diagnostic tools for *H. cinaedi* infection are currently limited to culture-based methods or PCR assays. In this study, we identified target antigens of *H. cinaedi* and developed an antibody titer assay for its detection.

Target antigens were isolated using immunoprecipitation with antibodies generated in mice immunized with whole bacterial cell lysates. The target antigens were identified through proteomic analysis and were subsequently produced using the *E. coli* expression system. An antigen solid-phase ELISA was performed to assess sera from individuals infected with both *H. cinaedi* and *H. pylori*.

Proteomic analysis revealed four target antigens. Among these, the neutrophil-activating protein (NapA) and one other antigen showed significantly higher reactivity in sera from individuals infected with *H. cinaedi* compared to those with *H. pylori*.

These findings suggest that our assay is capable of specifically detecting serum antibodies against *H. cinaedi* target antigens. Based on previous reports and proteomics analysis in this study, these target antigens are likely outer membrane proteins or secreted proteins, potentially associated with antibody response following infection.

P1-026/FL1-09

ケニア・クワレ地区における横断的研究から得られた潜在性結核感染(LTBI)診断に関する知見

○尾関 百合子¹, 山崎 智也¹, Amina Kaboso Saban¹, 立石 善隆¹, 西山 晃史¹, 阿部 透¹, 濱野 真二郎², 松本 壮吉¹ (¹新潟大院・医歯学総合・細菌, ²長崎大・熱研・寄生虫)

Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Insights from a Cross-Sectional Study in Kwale, Kenya

○Yuriko Ozeki¹, Tomoya Yamazaki¹, Amina Kaboso Saban¹, Yoshitaka Tateishi¹, Akihito Nishiyama¹, Thoru Abe¹, Shinjiro Hamano², Sohkiichi Matsumoto¹ (¹Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ., ²Dept. Paragitol., Nekken, Nagasaki Univ.)

結核は、年間1,000万人が新規に発症し、150万人が死亡する、世界最大級の細菌感染症である。サハラ以南のアフリカ(Sub-Saharan Africa)は、世界で最も結核の発生率が高い地域の一つである。この地域では結核に加えてHIVや寄生虫感染も高頻度で見られ、これらはしばしば重複して発生する。結核には排菌を伴う活動性結核と、感染しても症状が現れない潜在性結核(LTBI)があり、LTBI患者の5-10%が生涯のうちに活動性結核へ移行する。しかし、HIVや寄生虫感染との併存が活動性結核への移行を促進することが知られている。そのため、活動性結核の母体となるLTBIの集団を正確に特定することが必要不可欠である。現行のLTBI診断法では、結核菌抗原であるESAT6とCFP10を用いたIFN-gamma release assay (IGRA)が広く用いられているが、HIVや寄生虫感染が重複する場合、偽陰性が生じるなど、正確な診断が難しいという課題がある。私たちはLTBIの実態を把握し、そのリスク因子を探ることを目的としてケニアのクワレ地区にある6校の小学生を対象に調査研究を実施した。具体的にはIGRAの標準抗原であるESAT6やCFP10に加え、他の結核菌抗原についてもIFN-gammaの産生を調査した。また、寄生虫感についても並行して調査を行った。その結果、ESAT6やCFP10と非常に強く関連する抗原がみつかり、これらの抗原を併用することで、LTBI診断の精度が向上する可能性が示唆された。さらに、特定の抗原が寄生虫感染と強く相関していることも明らかとなった。

P1-027/FL1-10

Development and application of PCR-based *Leptospira* serogroup identification for Japanese isolates

○及能 和輝¹, 柿田 徹也², 高部 響介³, 高野 愛⁴, 小泉 信夫³, 下田 宙¹, 早坂 大輔¹ (¹山口大・獣医微生物, ²沖縄衛研・感染症研究センター, ³感染研・細菌第一, ⁴山口大・獣医疫学)

○Kazuki Kiuno¹, Tetsuya Kakita², Kyosuke Takabe³, Ai Takano⁴, Nobuo Koizumi³, Hiroshi Shimoda¹, Daisuke Hayasaka¹ (¹Dept. Micro., Vet. Med., Yamaguchi Univ., ²Inst. Health & Environ., Okinawa Pref., ³Dept. Bacteriol. I, Nati. Inst. Infect. Dis., ⁴Dept. Epi., Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Introduction: *Leptospira* spp. are the causative agents of a zoonotic disease, leptospirosis, and are classified into various serogroups. Although a PCR-based molecular serogroup typing (MST) has been reported by Wenderlein et al., it is uncertain whether this method can be applied to *Leptospira* isolates in Japan. The aim of this study was to develop a MST using multiplex PCR for *Leptospira* spp. isolated in Japan. **Methods:** The results of serogroup identification by microscopic agglutination test and whole genome data for 201 Japanese isolates including eleven serogroups were used in this study. As a result, the MST reported by Wenderlein et al. was not applicable for three serogroups (Autumnalis, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae) on whole genome data. New primers were designed for three serogroups, Autumnalis, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae, based on the sequence of the *rflB* locus. The reported and newly designed primers were evaluated by using DNA extracted from isolates. **Results:** A multiplex PCR for five serogroups including Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae and that for six serogroups including Ballum, Cynopteri, Grippotyphosa, Javanica, Pomona and Pyrogenes successfully amplified target sequences from Japanese isolates. **Conclusion:** We could establish new MST methods using multiplex PCR for Japanese isolates.

P1-028/FL1-11

Streptococcus 属の口腔常在菌が眼感染症リスクに与える影響について

○木村 優那, 渡邊 愛, 角出 泰造 ((株) メニコン)

Effects of oral resident bacteria in the genus *Streptococcus* on risk of ocular infections

○Yuna Kimura, Ai Watanabe, Taizo Sumide (Menicon Co., Ltd.)

オルソケラトロジー (OK) は、内面形状が特殊なハードコンタクトレンズを就寝時に装着し、角膜前面が平坦化することで一時的に近視を軽減させる治療法である。OK レンズ装着時、レンズケースは洗面台で乾燥・保管される場合が多い。先行研究で実使用 OK レンズケースから *Streptococcus* 属の口腔常在菌が複数検出された。その中でも *Streptococcus salivarius* 共存下で結膜嚢常在菌 *Staphylococcus epidermidis* のバイオフィルム (BF) 形成能の増大及び角膜感染症の原因微生物 *Acanthamoeba castellanii* 増殖性の促進が明らかとなった。本研究では、*Streptococcus* 属の口腔常在菌 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis* に着目し、共存による *S.epidermidis* の BF 形成能及び *A.castellanii* 増殖性を評価した。

1. *S.epidermidis* BF 定量評価: *S.epidermidis* 播種後、培養用インサートを介して共存菌と共培養させ、クリスタルバイオレット染色法により、*S.epidermidis* の BF 形成量を定量した。

2. *A.castellanii* 増殖性評価: 共存菌を播種した翌日に *A.castellanii* を播種し、7日間培養後、*A.castellanii* 数を計数した。

S.mutans および *S.parasanguinis* 共存下において、*S.epidermidis* の BF 形成量は増加し、*A.castellanii* 増殖性も促進した。これまでの結果より、*Streptococcus* 属の口腔常在菌は *S.epidermidis* の BF 形成能や *A.castellanii* の増殖性に影響を与える可能性が示唆された。レンズケースの洗面台での乾燥・保管は、飛沫による口腔常在菌混入により眼感染症起炎微生物増殖の可能性があり、眼感染症のリスクが懸念される。眼感染症を防ぐため、レンズケースの保管場所にも考慮する必要がある。

P1-029/FL1-12

微生物有害情報リスト：学名の変更に対応したリニューアル

○木村 明音, 魚原文, 石田 亜紀子, 黄地 祥子, 中谷 諒介, 仲里 猛留, 市川 夏子 (NITE-NBRC)

Redesigning of the Microorganism Risk Information List to consider changes in scientific names

○Akane Kimura, Aya Uohara, Akiko Ishida, Shoko Ohji, Ryosuke Nakatani, Takeru Nakazato, Natsuko Ichikawa (NITE-NBRC)

微生物を安全に取り扱うには、法令文書やバイオセーフティレベル (BSL) 分類リスト等様々な資料を参照して利用微生物の危険度／有害性を判断しなければならない。一方、次世代シーケンス技術の急速な発展に伴い、微生物のゲノム配列の分類への応用が進展している。さらに真菌については、2012年の命名規約の改訂により二重命名法が廃止され学名統一の議論が進められており、これらの分類体系の再編成や学名の変更も、微生物の安全性の判断を難しくしている。NITEは、微生物の安全かつ適切な利用を支援するために、細菌や真菌の散在するリスク情報を一元化したデータベース「微生物有害情報リスト」を公開している。微生物有害情報リストは、微生物の取扱いに関する国内法令やBSL分類等の出典資料のリスク情報を収集し、種・亜種に指定されたリスク情報 (属・株等に指定されている場合はそれらを含む) を集約して提供している。この中で、真菌のリスク情報を一元化した「真菌リスト」を2018年からExcel形式で公開しており、この度本リストについて、ユーザーの利便性、操作性向上を目的としたリニューアルを予定している。リニューアルでは、真菌の学名データベースであるMycobankなどの情報を参照して異名同士の関係を対応付け、出典資料には記載情報がない学名でもその異名が出典資料に記載されている場合には、異名のリスク情報を参照できるように補足記号を記載する予定である。また、Excelのフィルタ機能を用いてこれらの関連する学名の情報をまとめて表示できるように検討を行っている。本発表ではリニューアル内容について紹介する。

P1-030/FL1-13

バンコマイシン耐性腸球菌感染マウスにおけるファージ療法の検討

○小島 新二郎¹, 山下 和可奈^{1,2}, 氣賀 恒太郎¹ (¹感染研・治ワク,²早大・先進理工・生命医科)

Evaluation of phage therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in mice

○Shinjiro Ojima¹, Wakana Yamashita^{1,2}, Kotaro Kiga¹ (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Sch. Adv. Sci. Engr., Waseda Univ.)

腸球菌はヒトや動物の腸管内に常在するグラム陽性球菌である。近年、術後患者や基礎疾患を持つ患者に対して敗血症や腹膜炎、心内膜炎等の重篤な感染症を引き起こす、バンコマイシン耐性腸球菌 (以下VRE) による院内感染が問題となっている。最近では、VREに対して有効とされていたリネゾリドに対する耐性菌も報告され始めており、使用可能な薬剤の選択肢が減少している。そのため、腸球菌感染症は、バクテリオファージを用いたファージ療法の適応が望まれる感染症の一つとなっている。本研究では、腸球菌を対象にファージを採取し、マウス感染モデルを用いて治療効果を比較検討した。腸球菌感染マウス腹膜炎致死モデルにおいて、採取した3種類の異なる科に属する腸球菌ファージの治療効果を比較検討したところ、*in vitro* で溶菌活性の高かったEfm7ファージが、腹腔内投与、静脈内投与のいずれにおいても、他2種のファージと比較して高い生存率を示し、治療効果が認められた。次に、腸球菌への感染性を高める改変を行い、その治療効果を検討した。腸球菌感染マウス腹膜炎致死モデルにおいて、改変ファージは親株ファージよりも有意に生存率を向上させた。本研究で得られた結果は、VREによる感染症において、治療確度の高いファージ療法を行うための重要な知見を提供する。

P1-031

Isolation of gut microbes using liquid-liquid co-culture and discussion of symbiotic relationships

○久富 敦, 大熊 盛也, 坂本 光央 (理研・バイオリソース・微生物材料)

○Atsushi Hisatomi, Moriya Ohkuma, Mitsuo Sakamoto (RIKEN BRC-JCM)

Background: Gut microbes are of critical importance in various industrial fields including drug development; therefore, the isolation, cultivation, and classification of difficult-to-culture microorganisms and novel species are essential. We performed liquid-liquid co-cultures to obtain isolates using a previously unreported method.

Methods: Selectively filtered fecal samples were anaerobically co-cultured under the influence of supporting bacteria through a membrane filter. Isolates were tested for characterization and genomic analysis. Supporting bacteria were identified by TOF-MS. The isolate was co-cultured with the specific bacterial species in supporting bacteria.

Results: Genomic analyses revealed that the isolates were identified as either *Walteria intestinalis* or *Walteria acetigignens*. Filter-treated isolates grew only in the co-culture. Isolates in broth medium had short cells during the early stages of growth, but became longer with longer incubation times. It was found that specific bacterial species was dominant within the supporting bacteria and promoted colony formation of the isolate.

Conclusions: Short and thin cells passed through the filter and were isolated by the liquid-liquid co-culture method. It was suggested that these cells were bacterial species of the genus *Walteria* and grew under the influence of specific bacterial species in supporting bacteria.

P1-032

難培養性細菌が共生するアメーバの細菌運搬現象を規定する細菌側および環境因子の探索

○竹田 碧碧, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Bacterial and environmental factors that determine the bacterial backpacking in symbiotic amoebae

○Ruo Takeda, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

私達は、*Acanthamoeba* (以下アメーバ) とその細胞内でしか生きられない難培養性細菌との共生関係について、宿主と病原体との相互作用を紐解く一つのモデルとして研究を進めてきた。このモデルはクラミジアの一種 *Neochlamydia* が共生するアメーバ (土壌から独自に株化) の共生体である。これ迄の研究で、この共生アメーバが他のアメーバに比べて周囲の菌を取り込みにくい一方で、その大腸菌を共生細菌依存的に背負って運ぶことを発見した。また Na^+/H^+ トランスポーター NhaA 遺伝子の破壊に伴い伸長した大腸菌では運搬現象は減弱した。更に本現象は、運搬開始地点周囲に運搬に関わらない細菌が発育すると喪失した。何故、生きたまま細菌を背負って運ぶのか。また何故、運搬しなくなるのか。その現象には捕食に関わる根幹的な原理原則が潜んでいる可能性がある。そこで私達は本現象の生物学的意義を明らかにするために、本現象を規定する細菌側および環境因子の探索を試みた。具体的には、大腸菌の菌体長と菌濃度そして培地 pH が本現象に与える影響について検討した。菌体長が異なる大腸菌 31 株は、KEIO コレクション (大腸菌遺伝子破壊株ライブラリー 3909 株) から菌体長を踏まえ選別し運搬実験に供した。その結果、菌体長が長くなるほど本現象は減弱した (相関係数 -0.73)。土台となる寒天培地の pH を 6.0-8.5 として運搬現象を観察した結果 pH の上昇に伴い喪失した。さらに運搬される大腸菌量の減少に伴い本現象は不明瞭になった。これらの結果より、本運搬現象は捕食活動に制限がある共生アメーバが、栄養源の枯渇をいち早く察知して多くの細菌をアメーバの軌道の上に備蓄するために起こしている可能性を示唆している。

P1-033/FL1-14

Evaluation of the anti-obesity effect of *Christensenella minuta* feeding using *Caenorhabditis elegans*

○筑波 叶夢^{1,2}, 谷本 佳彦^{1,2,3}, 中台 枝里子^{1,2,3} (1大公大院・生科, 2京大院・生命, 3京大・医研)

○Kanam Chikuba^{1,2}, Yoshihiko Tanimoto^{1,2,3}, Eriko Nakadai^{1,2,3} (1Grad. Sch. Human Life & Ecology, Osaka Metropolitan Univ., 2Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., 3LiMe. Kyoto Univ.)

Christensenella minuta is an obligate anaerobic gram-negative bacterium that has been reported to be particularly abundant in the intestines of humans with low BMI, suggesting an anti-obesity effect. However, the detailed mechanisms of its interaction with the host are still unclear. In this study, the anti-obesity effects of *C. minuta* were evaluated using *Caenorhabditis elegans* as a model host. One-day-old larvae of wild-type *C. elegans* N2 were reared until 3-day-old using *E. coli* strain OP50, and then divided into OP50 control group, *C. minuta* fed group (Cm), and mixed fed group of OP50 and *C. minuta* (OP&Cm), and their survival were checked and counted daily. Fat accumulation was assessed that N2 larvae were reared on OP50 until 3-day-old and then fed for 3 days in 4 groups: OP50 group, Cm group, OP&Cm group, and a mixed feeding with OP50 and Orlistat (anti-obesity drug) group. Each nematode was stained with Oil Red O stain solution, and quantified the red intensity. As a result, the lifespan of Cm group was significantly shorter than OP50 group, while the OP&Cm group showed no difference compared to OP50 group. Oil Red O staining intensity was significantly reduced in the Cm and OP&Cm groups to the same level as in the Orlistat group compared to OP50 group. These results suggest that *C. minuta* has some detrimental effects and has anti-obesity effects.

P1-034/FL1-15

An investigation into the benefits of *Legionella* to their protist hosts

○渡邊 健太, 清水 隆, 度会 雅久 (山口大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○Kenta Watanabe, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai (Dept. Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' disease, replicates within protist hosts. Many protist species including *Paramecium* spp. are potential hosts for *Legionella*. However, the advantages in *Paramecium* hosts when they maintain *Legionella* have not been confirmed. In this study, the growth rate, temperature tolerance, and salt tolerance of *Paramecium* maintaining *Legionella* were analyzed, yet no such acquisition of advantages was identified. Meanwhile, phagocytosis was strongly inhibited in *Paramecium* cells fed with *Legionella*, indicating that this relationship can prevent the uptake of harmful organisms. Similar phagocytosis inhibition was observed when *Paramecium* cells were treated with *Legionella* culture supernatant. Even when phagocytosis was inhibited, if live *Legionella* cells were present within the host cells, *Paramecium* did not starve to death. Rather, their cellular numbers exhibited a tendency to increase. These results suggest that *Legionella* has some mechanisms that can nutritionally support the survival of *Paramecium* cells. Although it is difficult to definitively state whether the relationship between *Legionella* and *Paramecium* host is completely mutualistic symbiosis, the data provided the first evidence of a mutualistic relationship between *Legionella* and *Paramecium*.

P1-035/FL1-16

ウェルシュ菌バイオフィーム形成時の細胞外 DNA 放出機構の解析

○安東 剛¹, 尾花 望^{2,3}, 野村 暢彦^{2,4} (1筑波大・生命地球科学研究群, 2筑波大・MiCS, 3筑波大・医・TMRC, 4筑波大・生命環境系)

Analysis of the mechanism of eDNA release during biofilm formation in *Clostridium perfringens*

○Takeshi Ando¹, Nozomu Obana^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,4} (1Degree. Programs. Life. Earth. Sci., Univ. Tsukuba, 2MiCS, Univ. Tsukuba, 3TMRC, Inst. Med., Univ. Tsukuba, 4Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は温度に反応してバイオフィーム形態を変化させて、環境に適応して生存している。宿主体内温度である 37°C では付着型のバイオフィームを形成するのに対し、外界環境温度の 25°C では粘弾性に富んだペリクル状のバイオフィームを形成し、酸素や抗生物質に対する耐性が向上する (Obana *et al.* (2020) npj biofilm and microbiomes)。ペリクル状バイオフィーム中では細胞外タンパク質 BsaA と細胞外 DNA (eDNA) が細胞外マトリクスとして構造形成に寄与するが、本菌の eDNA 産生機構は明らかになっていない。そこで本研究では、eDNA 産生に関与する遺伝子の同定を目指した。細胞外マトリクス中の eDNA のシーケンス解析の結果、ゲノムの全領域がほぼ均一に検出された。このことより、本菌ではプロファージなどの可動性因子が eDNA 産生に関与する可能性は低いと考えられた。また、細胞外マトリクス中には eDNA のみならず eRNA が多量に検出された。このことより、eDNA 産生は溶菌を介しており、放出された細胞内容物には RNA 分子も含まれていると考えられた。eDNA を放出した細胞の遺伝子発現パターンが eRNA に反映されると予想し、RNA-seq によって eRNA を解析した。その結果、グリコーゲン代謝に関与すると予想される遺伝子群の転写産物が細胞内と比較して細胞外で高度に蓄積していた。これらの遺伝子の破壊株は野生株と同等の生育を示したが、ペリクル状バイオフィームの構造が脆弱になった。以上の結果より、同定した遺伝子群はバイオフィーム構造に寄与する新規遺伝子であると考えられる。また、本菌では糖代謝が溶菌と eDNA 産生に関連する可能性が示唆された。

P1-036

Bacterial Diversity and Potential Pathogenic Bacteria on Mobile Phones of Thai Medical Cadets

○Tanit Boonsiri¹, Passara Wongthai¹, Pimwan Thongdee¹, Paphavee Lertsethtakarn², Kasidach Chuenchom³, Kanlaya Krataipech³, Jantima Raksatham³, Pongthorn Narongroeknawin¹, Putt Narongdej¹ (1Dept. Microbiol., Phramongkutklao College of Med., Thailand, 2Dept. Bacterial and Parasitic Diseases, Armed Forces Res. Inst. of Med. Sci., Thailand, 3Dept. Biol. Sch. Science, King Mongkut Inst. of Technol. Ladkrabang, Thailand)

Mobile phones (MPs) are essential for medical cadets, serving both academic and social functions. However, they are prone to acting as reservoirs for pathogenic bacteria and, in communal dormitories where cadets live closely together, can facilitate the easy spread of bacteria. This study assessed bacterial contamination on MPs of 94 cadets at a military medical school in Thailand. Swabs were analyzed using MALDI-TOF MS, identifying 207 bacterial isolates across 29 species. *Staphylococcus epidermidis* (29.47%) was the most prevalent, followed by *Staphylococcus aureus* (10.63%) and *Bacillus cereus* (10.14%). The bacterial diversity included 9 *Staphylococcus* species (62.80%), 4 *Bacillus* species (14.98%), and 3 species each of *Pseudomonas* (4.83%) and *Acinetobacter* (1.93%). Most *A. baumannii*, *E. faecalis*, and *S. aureus* isolates were susceptible to multiple antibiotics, as determined by the Sensititre system. However, PCR detected the *mecA* gene in 3 *S. aureus* isolates (13.64%), suggesting potential oxacillin resistance (OS-MRSA), although these isolates were phenotypically susceptible. These findings highlight that medical cadets' MPs harbor a diverse range of bacteria, including species with pathogenic and resistance potential. This underscores the importance of hand and mobile phone hygiene to reduce contamination and minimize the risk of healthcare-associated infections.

P1-037

In vitro における *Streptococcus* spp. バイオフィームに対する各種殺菌剤の効果検証

○小松原 万里奈¹, 桑木 星里香¹, 後藤 和義¹, 内山 淳平², 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (¹岡山大学・保健学研究科, ²岡山大学・医歯薬研究科・病原細菌, ³徳島大学・医歯薬学・口腔機能管理学)

In vitro evaluation of the efficacy of various disinfectants against *Streptococcus* spp. biofilms

○Marina Komatsubara¹, Serika Kuwagi¹, Kazuyoshi Gotou¹, Jumpei Uchiyama², Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (¹Grad. Sch. Health Science, Okayama Univ., ²Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ³Oral Health Care and Rehabilitation, Inst of Biomed. Sci. Tokushima Univ.)

【背景と目的】*S. mutans* は齲蝕の主な原因菌である。また、多くの *Streptococcus* 属は口腔内での増殖に伴い感染性心内膜炎や肺炎等のリスクが上昇する。一方で、*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. gordonii* は口腔内から高頻度に分離される連鎖球菌で、齲蝕原生細菌のコロニー形成を抑制する働きがあると考えられている。したがって、齲蝕予防の用途で口腔洗浄剤を使用する場合、口腔内の菌の総量を抑えるだけでなく、齲蝕原生細菌と非齲蝕原生細菌のバランスを保つことが理想的であると考えられる。そこで、各種洗浄剤作用後の"バイオフィームの総量"および"菌の生存数"を菌種間で比較し、齲蝕予防効果を検証することを目的として以下の実験を行った。【方法】*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. gordonii* を、TSB 培地を用いて、37°C, 10%CO₂ 環境下で24時間静置培養した。上記の方法で形成された各菌のバイオフィームに対して2種類の市販薬とオゾン水をそれぞれ30秒間作用させ、CV染色、ATPの定量、CLSMによるDAPI染色像の観察に用いた。【結果と考察】CV染色の結果、実験に供した洗浄剤30秒間の作用におけるバイオフィーム除去効果はほとんど見込めないことが示唆された。ATP値の結果からは *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. gordonii* の生菌数が一部の殺菌剤で減少することが示唆され、*S. mutans* はどの殺菌剤においても生菌数が有意に減少しなかった。一方、今回使用した3種の洗浄剤のうち、オゾン水は最も *S. mutans* のATP値が低く、非 *S. mutans* の著しい殺菌効果がないことから、口腔内の生態系を維持しつつ、齲蝕を抑制することが期待される。

P1-038

Occurrence of *Legionella pneumophila* in Hospital Water Systems at Phramongkutklao Hospital, Thailand

○Pongthorn Narongroeknawin¹, Tanit Boonsiri¹, Nitchatorn Sungsin¹, Piyanate Kesakomol¹, Sirachat Nitchapanit¹, Pimwan Thongdee¹, Passara Wongthai¹, Anuthida Kuisakhon², Poorin Phuminart², Veerachai Watanaveeradej³ (¹Dept. Microbiol., Phramongkutklao College of Medicine, Thailand, ²Dept. Biol., Sch. Sci., King Mongkut Inst. of Technol. Ladkrabang, Thailand, ³Dept. Peds, Phramongkutklao Hospital, Thailand)

Hospital water systems are critical sources of hospital-acquired Legionnaires' disease. Faucets and water outlets, especially those generating aerosols like showers, are potential transmission routes for *Legionella pneumophila* and other pathogens. This study assessed the risk of *L. pneumophila* contamination in water outlets at a tertiary referral hospital in Bangkok, Thailand, using culture techniques and MALDI-TOF MS. A total of 25 swab samples were collected from showerheads and faucets in medical and pediatric wards (17 and 8 samples, respectively). *L. pneumophila* was detected in 80% of samples, with concentrations ranging from 1.00×10^1 to 4.12×10^3 CFU/mL. Prevalence of *L. pneumophila* was 94% in pediatric wards and 50% in medical wards. Additional pathogens included *Pseudomonas aeruginosa* (12%), *Bacillus cereus* (12%), and *Burkholderia cepacia* (8%). Opportunistic pathogens such as *Fictibacillus arsenicus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Brevundimonas aurantiaca* were also identified. Our findings highlight that hospital water systems, particularly showerheads and faucets, can act as reservoirs for *L. pneumophila* and other pathogens. Regular monitoring and preventive strategies are essential to mitigate the risk of infections among vulnerable patients.

P1-039

Analysis of antagonistic effect of commensal bacteria on MRSA

○田嶋 亜紀子^{1,2}, 金城 雄樹^{1,2} (¹慈恵医大・医・細菌, ²慈恵・バイオフィーム研究センター)

○Akiko Tajima^{1,2}, Yuki Kinjo^{1,2} (¹Dept. Bacteriol. The Jikei Univ. Sch. Med., ²Jikei Ctr. Biofilm Sci. & Tech.)

The human microbiome is symbiotic with the host and has the potential to synthesize diverse small molecules (natural products) which serve as mediators in a variety of microbe-microbe and host-microbe interactions. The natural products are often encoded by biosynthetic gene clusters (BGCs), but most of the BGCs are not, or only weakly, expressed under standard laboratory growth conditions. We found that *Corynebacterium* sp., a common human commensal, inhibited growth of *Staphylococcus aureus* including MRSA in the presence of subinhibitory concentration of unsaturated FFAs. Based on genome analysis, we identified the BGC which was due to antimicrobial activity and consisted of genes encoding a putative bacteriocin, which belongs to a family of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). RiPPs are a class of peptide harboring post-translational modifications and produced from a short precursor peptide. The bioinformatic analysis and mutant-based verification showed that core operon of the BGC contains genes involved in post-translational modification, transport, immunity, and two precursor peptides. The expression of both putative bacteriocin peptide genes was required for antimicrobial activity. These results suggested that *Corynebacterium* sp. exhibited antagonistic activity due to production of two-component bacteriocin encoded in the BGC.

P1-040

植物由来成分を含む新規培地を用いて分離した未記載種細菌の性状解析

○田淵 史晃¹, 宮内 将暢¹, 三上 雄大^{1,2}, 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣¹ (¹帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, ²帝京大院・医療技術・臨床検査, ³武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Undescribed bacterial species isolated using a novel plant-derived culture medium

○Fumiaki Tabuchi¹, Masanobu Miyauchi¹, Kazuhiro Mikami^{1,2}, Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita¹ (¹Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., ²Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab. Sci., Teikyo Univ., ³Lab. Mol. Cell Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

地球上には、未知の種を含む多様な微生物が存在している。これまで、環境微生物を培養するために様々な工夫がなされてきたが、微生物生態系の一部にしか理解が及んでいないのが現状である。未だに把握されていない環境微生物群を明らかにするためには、従来の方法とは異なる新しい培養法が必要である。本研究では、植物由来成分を含む新規の寒天培地を作製し、土壌サンプルから新規細菌種の分離を試みた。まず、環境中から採集した土壌サンプルをYME培地および植物成分寒天培地に塗布し、培養したところ、大小さまざまなコロニーが生育した。次に、それぞれの培地から57株および51株のコロニーを採取し、16S rRNA遺伝子配列のシーケンス解析を行った。その結果、YME寒天培地から得られた株の多くは、*Bacillus* 属（または *Priestia* 属）の細菌であった。一方、植物成分寒天培地からは、*Streptomyces* 属の放線菌や *Rhizobium* 属の根粒細菌が多く分離された。さらに、植物成分寒天培地上で生育した微小なコロニーに着目し、これらの16S rRNA遺伝子配列をシーケンス解析し、データベース上の既存の菌種と配列を比較した。その結果、既存の種との16S rRNA遺伝子配列の一致度が98.7%を下回る細菌を複数株同定した。これらは、未記載種であると考えられる。以上の結果は、土壌サンプル中の微生物を植物成分寒天培地で培養することにより、YMEなどの汎用的な栄養培地では得られない異なる微生物群を分離できることを示唆している。また、植物成分寒天培地上で生育した微小コロニーを採取することによって、効率的に未記載種を分離できることを示唆している。

P1-041

Fusobacterium nucleatum と *Streptococcus mutans* の共凝集メカニズムの解明

○米澤 英雄, 国分 栄仁, 菊池 有一郎, 石原 和幸 (東京歯大・微生物)

Analysis of the co-aggregation mechanism of *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus mutans*

○Hideo Yonezawa, Eitoyo Kokubu, Yuichiro Kikuchi, Kazuyuki Ishihara (Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Col.)

【目的】*Fusobacterium nucleatum* は菌体表面に様々な付着因子を持ち、多種の細菌と凝集する。ヒト口腔内において *F. nucleatum* は初期付着細菌と歯周病原性細菌との橋渡しをすることから、病原性の高いマイクロバイオーーム形成に不可欠な細菌である。今回私たちは *F. nucleatum* と *S. mutans* との共凝集メカニズムの解明を行った。【方法】*F. nucleatum* は ATCC 25586 株、*S. mutans* は UA159 株および臨床分離株 KYD187 株を用いた。*S. mutans* の親株および表層タンパク質欠損株を凝集試験に共試した。共凝集は吸光度による測定にて行った。【結果・考察】*F. nucleatum* ATCC 25586 株と共試した *S. mutans* 株は強く共凝集した。*F. nucleatum* ATCC 25586 株を 60 mM galactose にて処理しても共凝集には影響を与えなかったものの、60 mM Arginine 処理でやや凝集の抑制が認められ、60 mM Lysin 処理で強い凝集抑制が認められた。また *S. mutans* UA159 株では SpaP および GbpD が、KYD187 株では Cnm および GbpC が共凝集に関与していることが明らかとなった。しかしこれらの表層タンパク質欠損株では凝集能は親株と比較して約 20%程度の凝集抑制率であったことから、他にも凝集因子が存在していることが明らかとなった。現在他の他の凝集因子について検討を行っている。

P1-042/FL1-17

Cross-feeding analysis of *Streptococcus* and *Rothia* isolated from the oral cavity

塙 莊太郎^{1,2}, ○孫 安生², 野口 一馬¹, 大前 堯之¹, 吉川 恭平¹, 松尾 禎之³, 加藤 完⁵, 山根 康嗣⁴, 石戸 聡², 岸本 裕充¹ (¹兵庫医大・医・歯科口腔外科, ²兵庫医大・医・病原微生物, ³関西医大・医・綜研, ⁴兵庫医大・医・病理学, ⁵理研・IMS)

Soutaro Hanawa^{1,2}, ○Aoi Son², Kazuma Noguchi¹, Takayuki Ohmae¹, Kyohei Yoshikawa¹, Yoshiyuki Matsuo³, Tamotsu Kato⁵, Koji Yamanegi⁴, Satoshi Ishido², Hiromitsu Kishimoto¹ (¹Dept. Oral and Maxillofacial Surgery, Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ³Dept. Inst. Bionomedical Science, Kanasai Med. Univ., ⁴Dept. Pathology, Sch. Med., Hyogo Medical Univ., ⁵IMS, Riken)

Microbiota commensally inhabit through biological correspondences; so-called cross-feeding. In oral cavity, nearly 750 species of bacteria reside and could maintain oral ecology. Although it has been intensively addressed how pathobionts potentially lead to oral diseases, it is not yet fully understood how oral ecosystem is maintained through interbacterial communication among beneficial symbionts. To address it, we mined beneficial symbiont candidates by comparison of microbiota from healthy volunteers and oral cancer patients and examine possible interaction of beneficial symbiont candidates. Cancer patients showed different index of beta diversity and decreased relative abundance of genera *Rothia* and *Streptococcus* compared with healthy volunteers. In addition, both genera further decreased in cancer patients with cervical metastasis, highlighting them as beneficial candidates in oral cavity. Further mining microbes showing co-occurrence with genus *Rothia* demonstrated genus *Streptococcus* as the candidate with positive fitness impact. These results suggest that *Streptococcus-Rothia* interaction is one of machineries for the maintenance of oral ecosystem.

P1-043/FL1-18

ホスホフルクトキナーゼの欠損は植物抽出液中の大腸菌の増殖能を増大させる

○山口 咲季, 石川 一也, 古田 和幸, 垣内 力 (岡大・院医歯薬・分子生物学)

Phosphofructokinase deficiency enhances growth of *Escherichia coli* in plant extracts

○Saki Yamaguchi, Kazuya Ishikawa, Kazuyuki Furuta, Chikara Kaito (Lab. Mol. Biol., Fac. Pharm., Okayama Univ.)

大腸菌は生野菜に付着してしばしば食中毒の原因となるが、大腸菌と植物の関係については未だほとんど解明されていない。本研究では、野菜ジュースを原料とした培地 (V8 培地) を用いて、大腸菌の野菜環境中での増殖に関わる遺伝子を探索した。その結果、V8 培地において、ホスホフルクトキナーゼ 1 (PfkA) の欠損株が野生株に比べて高い増殖能を示すことを見出した。さらに、PfkA と PfkA のアイソザイムとして知られる PfkB の二重欠損株 (Δ pfkAB) は pfkA 単欠損株に比べて V8 培地での増殖能が上昇した。また、 Δ pfkAB に対して pfkA もしくは pfkB のどちらかを相補することで V8 培地での増殖能上昇が失われたことから、ホスホフルクトキナーゼ活性の喪失が V8 培地での大腸菌増殖能の上昇をひき起こすことが示唆された。 Δ pfkAB においては、ホスホフルクトキナーゼの基質であるフルクトース-6-リン酸 (F6P) が蓄積し、F6P が機能性 RNA である SgrS を発現誘導していると推定された。 Δ pfkAB において、SgrS の転写促進因子である sgrR を欠損させたところ、V8 培地における増殖能の上昇がみられなくなった。以上の結果から、ホスホフルクトキナーゼの欠損は SgrR の活性化を介して V8 培地での増殖能上昇を引き起こすことが示唆された。LB 培地と比較して V8 培地ではグルコースとフルクトースが多く含まれているため、V8 培地における Δ pfkAB の増殖能の増大には SgrS を介した糖利用能の変化が関わっている可能性がある。

P1-044

The Role of MreB in the Intrabacterial Nanotransportation System for VacA in *Helicobacter pylori*

○呉 紅¹, 藤岡 良彦¹, 岩井 伯隆², 坂口 翔一¹, 鈴木 陽一¹, 中野 隆史¹ (¹大阪医大・医・微生物学・感染制御学, ²東科学大 生命理工学院 生命理工学系)

○Hong Wu¹, Yoshihiko Fujioka¹, Noritaka Iwai², Shoichi Sakaguchi¹, Youichi Suzuki¹, Takashi Nakano¹ (¹Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ., ²Dept. Life Science and Technology, Science Tokyo)

Helicobacter pylori possesses an intrabacterial nanotransportation system (ibNoTS) responsible for transporting VacA, CagA, and urease within the bacterial cytoplasm. This system is regulated by the extrabacterial environment. Although the transport routes of the system for VacA have not been extensively studied, our immunoelectron microscopy demonstrated that VacA closely localizes with MreB in the bacterium. However, in *H. pylori* treated with the MreB polymerization inhibitor A22, VacA did not localize closely to MreB compared with non-A22-treated *H. pylori*. Furthermore, A22 obstructs the transport of VacA by ibNoTS. Using the freezing and thawing method, we found that VacA closely localizes with the MreB filament by immunoelectron microscopy. These findings suggest a close association between the route of ibNoTS for VacA and the MreB filament. Additionally, it was confirmed that VacA does not closely associate with the bacterial filament FtsZ, which is involved in the transport of the virulence factor urease, as previously suggested. We propose that the route of ibNoTS for VacA is associated with the MreB filament in *H. pylori*.

P1-045

***Staphylococcus aureus* extracellular vesicles enhance *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity via PslE**

サブソムウォンパーウィニー¹, 渡部 菜穂子¹, 中根 明夫², ○浅野 クリスナ^{1,2} (¹弘前大・院医・感染生体防御学, ²弘前大・院医・生体高分子健康科学)

Phawinee Subsomwong¹, Naoko Watabe¹, Akio Nakane², ○Krisana Asano^{1,2} (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Depart. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

We have shown that *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles (SaEVs) promote the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) by enhancing lipopolysaccharide (LPS) production, biofilm formation, epithelial cell invasion and impairment of Pa uptake by macrophages. Proteomic analysis revealed that LPS biosynthesis protein (PslE) in Pa was significantly increased after SaEV treatment but the role of Psl exopolysaccharide polymerization on SaEV-mediated Pa pathogenicity is unclear. In this study, a Pa *pslE* deletion mutant (PaΔ *pslE*) was constructed using Cre- *loxP* system and the effect of SaEVs on Pa pathogenicity was evaluated. We found that SaEVs failed to enhance the expression of the five polysaccharide polymerization genes (*pslA*, *E*, *J*, *K*, and *L*) in PaΔ *pslE*. LPS production and biofilm formation were reduced in PaΔ *pslE* compared to wild-type Pa (PaWT). SaEVs-treated PaWT, but not SaEV-treated PaΔ *pslE*, showed a significant reduction in Pa uptake by macrophages. No significant difference was observed in the ability of PaWT and PaΔ *pslE* to invade human keratinocytes when treated with SaEVs. In conclusion, we clearly demonstrated that the *pslE* gene is required for SaEV-mediated Pa pathogenicity. Molecules within SaEVs interacting with *pslE* gene or PslE protein would be potential targets for treating *S. aureus* and Pa co-infection.

P1-046/FL1-19

Cleavage cascade of the sigma regulator FecR orchestrates TonB-dependent signal transduction

○横山 達彦¹, 宮崎 亮次², 鈴木 健裕³, 堂前 直³, 永井 宏樹¹, 塚崎 智也², 久堀 智子¹, 秋山 芳展⁴ (¹岐阜大・医学系研究科・病原体制御学, ²奈良先端大・バイオ, ³理研・CSRS, ⁴京大・医生研)

○Tatsuhiko Yokoyama¹, Ryoji Miyazaki², Takehiro Suzuki³, Naoshi Dohmae³, Hiroki Nagai¹, Tomoya Tsukazaki², Tomoko Kubori¹, Yoshinori Akiyama⁴ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Gifu Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, ³CSRS, RIKEN, ⁴Inst. Life Med. Sci., Kyoto Univ.)

TonB-dependent signal transduction is a versatile mechanism widely observed in gram-negative bacteria, coupled with the energy-dependent substrate transport. In the iron acquisition system of *Escherichia coli*, the cytoplasmic membrane-anchored TonB-ExbBD motor complex energizes the TonB-dependent transporter FecA to facilitate ferric citrate uptake. FecA also acts as a ferric citrate sensor, transmitting the signal to the cytoplasmic membrane protein FecR. We previously demonstrated that FecR undergoes three successive cleavage steps, with the final cleavage product targeting the cytoplasmic sigma factor FecI to induce transcription of the *fec* genes. Here, we describe the comprehensive mechanism by which the progression of the FecR cleavage cascade mediates ferric citrate signaling, involving both FecA and TonB. FecR undergoes an initial cleavage by autoprolysis prior to membrane integration. In the periplasm, the soluble C-terminal domain (CTD) fragment of FecR, co-translocated with the N-terminal domain (NTD) via the Tat system, prevents the second cleavage through its physical interaction with the NTD. TonB-dependent alterations in FecA properties enable FecA to bind the FecR CTD, allowing the ferric citrate signal to release the CTD blockage from the NTD. This release permits the FecR cleavage cascade to proceed, which is essential for inducing *fec* gene expression.

P1-047

***Clostridium* 属細菌の運動及び走化性応答の解析**

○西山 宗一郎, 小池 祥平, 足助 翔太, 赤塚 拓夢 (新潟薬科大・応用・食品安全)

Chemotactic responses and motilities of *Clostridium* spp.

○So-ichiro Nishiyama, Shohei Koike, Shota Asuke, Takumu Akatsuka (Fac. App. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Med. Life Sci.)

芽胞を形成する *Clostridium* 属細菌はグラム陽性の偏性嫌気性菌であり、一部はヒトに対し病原性を示す。食中毒の原因となるボツリヌス菌 *C. botulinum* や代替菌の毒素非産生性スποロゲネス菌 *C. sporogenes* は、べん毛運動や走化性を担う遺伝子群を備え、走化性のセンサーである走化性受容体ホモログも 30 種前後備えている。当研究室では *Clostridium* 属細菌の病原性と走化性の相関を見出すことを目的として、当該菌の走化性能の解析を進めており、スποロゲネス菌やボツリヌス菌が複数のアミノ酸に対して誘引応答を示すことを見出し、アミノ酸走性を媒介する受容体を同定している。また酪酸菌 (*C. butyricum*) の解析も始めており、この菌が軟寒天培地で優れた遊泳能 (スウォーム能) を示すことも見出ししている。乳児ボツリヌス症については腸内細菌叢が未熟であることが発症の一因であるとされ、成人では通常起こらない。この現象はボツリヌス菌と他の腸内細菌の間に何らかの相互作用が生じていることを示唆する。一般に病原細菌の定着に走化性が関与することから、本研究では *Clostridium* 属細菌同士での走化性応答の相互作用を解析した。酪酸菌はスποロゲネス菌に誘引される一方、A 型毒素産生性のボツリヌス菌は一部のスποロゲネス菌株を忌避した。またボツリヌス菌と酪酸菌では互いの干渉は検出されず、スウォームリングが融合した。これらの結果から、走化性応答においても菌同士の相互作用が存在すること、栄養の枯渇のようなシンプルな理由では説明が難しいことが示唆された。今後はボツリヌス菌の他の菌株や *Clostridium* 属以外の他の腸内細菌も対象に入れ、解析を継続していく予定である。

P1-048

大腸菌膜ストレス応答センサーキナーゼ BaeS のマルチリガンド認識機構

○田島 寛隆^{1,2}, 武井 陸³, 山本 健太郎⁴, 川岸 郁朗^{1,2,3} (¹法政大・生命科学・生命機能, ²法政大・ナノテクセンター, ³法政大・院理工・生命機能, ⁴国立感染症研・感染制御)

Multiple ligand recognition mechanisms of the *Escherichia coli* membrane stress sensor kinase BaeS

○Hirota Tajima^{1,2}, Riku Takei³, Kentaro Yamamoto⁴, Ikuro Kawagishi^{1,2,3} (¹Dept. Frontier Biosci., Hosei Univ., ²Res. Cen. Micro-Nano Tech., Hosei Univ., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., ⁴Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID)

大腸菌二成分制御系センサーキナーゼ BaeS は、レスポンスレギュレーターである転写調節因子 BaeR を介して、ペリプラズムシャペロン Spy や異物排出系構成因子 MdtABCD, AcrD などの遺伝子の発現を調節する。BaeS はインドール、フラボノイド、銅イオンやタングステン酸などによる膜ストレスを感知すると考えられていた。しかし最近、銅イオンは BaeS に直接結合すると報告されている。当研究室では、BaeS が細胞内インドールを感知することを示唆する結果を得た。そこで、BaeS が刺激を感知するメカニズムを解明するため、BaeS によるインドール、タングステン酸感知機構を調べた。まず、*acrD* に対するプロモーターアッセイにより、インドール、タングステン酸の添加による BaeS を介した *acrD* 発現の上昇が検出された。ペリプラズムドメインを欠失した BaeS はタングステン酸感知能を失ったが、インドール感知能は保持していた。BaeS ペリプラズムフラグメントを構築・精製して等温熱量滴定 (ITC) を行ったところ、タングステン酸が BaeS ペリプラズムドメインに直接結合することが示された。したがって、BaeS はタングステン酸が引き起こす何らかのストレスではなく、タングステン酸を直接感知すると推定された。一方、BaeS ペリプラズムフラグメントはインドールと結合しなかった。さらに、BaeS 細胞質ドメインの系統的変異導入により、インドール感知能を特異的に失った変異体が得られた。したがって、BaeS はタングステン酸とインドールを異なるドメインで感知していると考えられた。

P1-049

Elucidating the role of MamJ in the polymerization process of actin-like protein MamK

○潘 遠媛¹, 福森 義宏², 田岡 東^{2,3} (¹金沢大・院・自然科学, ²金沢大・理工・生命理工, ³金沢大・ナノ生命)

○Yuanyuan Pan¹, Yoshihiro Fukumori², Azuma Taoka^{2,3} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ³NanoLSI, Kanazawa Univ.)

MamK is one of the bacterial actin-like proteins known for its distinctive feature, which can be utilized to position magnetosome organelle within magnetotactic bacterial cells. While it has been reported that MamJ plays a role in regulating MamK filament *in vivo* and contributes to maintaining dynamic filaments, the molecular role of MamJ in the MamK polymerization process remains inadequately elucidated. In this study, we analyzed MamJ activity on MamK polymerization using purified *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 MamJ and MamK proteins. According to the light scattering assay, adding MamJ caused decreasing intensities derived from MamK polymers in a MamJ concentration-dependent manner, indicating that MamJ affects the MamK polymer structure. HS-AFM observation revealed that MamK formed short filaments in the presence of MamJ. Then, we analyzed the effect on the MamK critical concentration using the light scattering assay. Surprisingly, the MamK critical concentration dramatically increases as MamJ concentrations increase. These results showed that MamJ elongates the lag phase of MamK polymerization, suggesting that MamJ inhibits the nucleation in MamK polymerization process. Our results suggested that MamJ puts the brakes on MamK polymerization activity and contributes to keeping MamK monomer concentration to ensure dynamic MamK filaments in cells.

P1-050/FL1-20

Characterization of novel actin-like protein Mad28 encoded in magnetotactic *Thermodesulfobacteriota*

○下茂 梨乃¹, 下重 裕—², 福森 義宏³, 田岡 東^{3,4} (¹金沢大・院・自然科学, ²東洋大・バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター, ³金沢大・理工・生命理工, ⁴金沢大・ナノ生命)

○Rino Shimoshige¹, Hirokazu Shimoshige², Yoshihiro Fukumori³, Azuma Taoka^{3,4} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ., ³Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ⁴NanoLSI, Kanazawa Univ.)

Magnetotactic bacteria (MTB) synthesize magnetic organelles called magnetosomes. Actin-like MamK cytoskeletal filaments are associated with magnetosomes and organize their positioning. MTB belong to the phyla *Nitrospirota* and *Thermodesulfobacteriota*, which have two actin-like proteins, MamK and Mad28. We searched to understand the molecular features and function of Mad28. At first, we purified *Solidesulfobivrio magneticus* RS-1 Mad28 and MamK are generated polyclonal antibodies. We confirmed expressions and localizations of Mad28 and MamK in RS-1 and *Fundidesulfobivrio magnetotacticus* FSS-1. We confirmed that both MamK and Mad28 were expressed in RS-1 and FSS-1. Immunofluorescence microscopy showed that Mad28 localized in linear structures along the long axis of the RS-1 and FSS-1 cells. Furthermore, to determine whether Mad28 has a similar function with MamK, we expressed either Mad28^{RS-1} or MamK^{RS-1} in the *mamK* deletion mutant of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 and examined whether Mad28 could rescue proper magnetosome positioning that MamK^{AMB-1} maintains. According to live-cell imaging, MamK^{RS-1} could rescue magnetosome positioning, whereas Mad28^{RS-1} expression did not affect magnetosome positioning. These results suggested that Mad28 does not have a function that overlaps with MamK but has an alternative function in MTB belonging to the phylum *Thermodesulfobacteriota*.

P1-051

磁性細菌の磁気オルガネラ表層蛋白質 MamA のマグネトソーム分散における役割

○大平 竜生¹, 森口 裕太², 福森 義宏², 田岡 東^{2,3} (¹金沢大・院・自然科学, ²金沢大・理工・生命理工, ³金沢大・ナノ生命)

The role of magnetosome surface protein MamA in the dispersion of magnetosome particles

○Ryuki Ohira¹, Yuta Moriguchi², Yoshihiro Fukumori², Azuma Taoka^{2,3} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²Fac. Biol. Sci. Tech., Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ³NanoLSI, Kanazawa Univ.)

磁性細菌は、地磁気感知のためにマグネトソームを形成する。マグネトソームは磁石である磁鉄鉱結晶を含むにもかかわらず、溶液中で磁気相互作用で凝集せず分散した状態が保たれる。この分散能は、マグネトソームが細胞内で容易に直鎖構造を維持し、磁気双極子の形成に貢献すると考えられる。マグネトソームは、マトリクスと呼ばれる蛋白質層に覆われており、この蛋白質層がマグネトソームの分散を亢進していると予想した。*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 からマグネトソームを単離し、磁石を設置した分光光度計を用いてマグネトソームの沈降速度を測定した。NaCl 濃度を高めると沈降速度が増加したことから、静電的相互作用がマグネトソームの分散に関わっていることが示唆された。本研究では、マグネトソームに豊富に含まれる蛋白質の1つであり、マトリクスの構成成分である MamA に着目した。MamA は、単離したマグネトソームをアルカリ処理 (pH 11) することで除去できる。そこで、アルカリ処理で MamA を取り除いたマグネトソームの沈降速度を測定したところ野生株由来のマグネトソームの約 10 倍に増加した。さらに、*mamA* 遺伝子欠損株から単離したマグネトソームの沈降速度も増加していた。現在、*mamA* 遺伝子欠損株において野生型または変異型 MamA をプラスミドから発現させ、マグネトソームに含まれる MamA の蛋白質質量や変異蛋白質のマグネトソームの沈降速度における影響を調べている。得られた結果から MamA のマグネトソーム表層における機能モデルを提唱する。

P1-052/FL1-21

原子間力顕微鏡を用いたウリ類炭疽病菌の付着器の細胞壁のナノスケール構造計測

○田中 准¹, 宮澤 佳甫^{1,2}, 熊倉 直祐³, 松森 海晴¹, 白須 賢³, 福間 剛士^{1,2} (¹金沢大・院・自然科学, ²WPI-NanoLSI, ³理化学研究所)

Nanoscale AFM measurement of cell wall of *Colletotrichum orbiculare*

○Jun Tanaka¹, Keisuke Miyazawa^{1,2}, Naoyoshi Kumakura³, Kaisei Matsumori¹, Ken Shirasu³, Takeshi Fukuma^{1,2} (¹Grad. Sch., Nat. Sci. Tech., Kanazawa Univ., ²WPI-NanoLSI, ³RIKEN)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、液中で微生物表面構造を直接観察できる手法である。近年、グラム陽性菌のペプチドグリカン層 (Nature, 2020) やグラム陰性菌の外膜 (PNAS, 2021) を 10-30 nm 程度の空間分解能で可視化した例が報告されており、AFM を用いた微生物表面構造解析が注目されている。一方で、細胞壁における原子レベル AFM 構造観察は達成されておらず、空間分解能の向上が求められている。そこで、我々は AFM を用いた微生物の細胞壁の原子スケール構造解析手法の開発を目指している。

本研究ではウリ類炭疽病菌の付着器をモデル系として扱った。ウリ類炭疽病菌は、植物細胞の表面に付着した胞子から感染の専門細胞である付着器を分化し、付着器が発生する極めて高い膨圧により硬い植物表面に穴を開けて植物細胞に侵入する。付着器の細胞壁は水分子より大きな分子を通さない直径 1 nm 程度の細孔を持つ半透膜として機能し、浸透圧により内部に水分子を取り込むことで膨圧を形成する (PNAS, 1991; Nature, 1997)。しかしながら、この細孔を可視化する技術はこれまで報告されていない。

そこで我々は、AFM を用いて付着器の細胞壁を観察し、内側に半透膜として機能しうる高密度の充填構造を確認した。一方で、本実験で用いた AFM (NanoWizard 4, Bruker) では原子レベルの計測は達成されておらず、直径 1 nm 程度の細孔の可視化には至っていない。今後は、これを可視化するために、我々が独自に開発している超解像液中 AFM 技術を用いて細胞壁の原子スケール構造解析に取り組む。これにより、細胞壁内部で水分子の半透膜をどのように形成して強固な膨圧に耐えるのか、その詳細を構造学的に明らかにする。

P1-053

ペリプラズム空間のリン脂質輸送を担う MlaC-MlaD 複合体の結晶構造

小津 彩夏, 松本 大輝, ○渡邊 康紀 (山形大・理)

Crystal structure of the MlaC-MlaD complex involved in the periplasmic phospholipid transport

Sayaka Ozu, Daiki Matsumoto, ○Yasunori Watanabe (Fac. Sci., Yamagata Univ.)

グラム陰性細菌の外膜は非対称構造であり、内葉はリン脂質で構成され、外葉はリポ多糖に富んでいる。この非対称性は抗生物質など外的ストレスから細胞を保護するために重要である。複数の Mla タンパク質から構成される Mla システムによって、外膜から内膜へリン脂質が輸送されることで外膜の脂質非対称性が維持されている。ペリプラズム空間に局在している MlaC は外膜から受け取ったリン脂質を内膜の MlaFEDB 複合体へ引き渡す。MlaFEDB 複合体中の MlaD に MlaC が結合することでリン脂質が内膜へ輸送されるが、MlaC に結合したリン脂質がどのように MlaD へと輸送されるのか詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、外膜-内膜間のリン脂質輸送のメカニズムの解明を目指して MlaC-MlaD 複合体の構造機能解析を行った。緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 MlaC および MlaD について、MlaC-MlaD 複合体の結晶化に成功し、立体構造を 3.5 Å 分解能で決定した。MlaD はリング状に 6 量体を形成し、6 量体に対して MlaC が 3 分子結合することが分かった。興味深いことに、3 分子の MlaC のうち 1 分子の MlaC の C 末端ヘリックスの電子密度が観察されず、その結果、脂質結合ポケット内部が露出していた。C 末端ヘリックスを欠損させた MlaC 変異体は野生型 MlaC と比べてリン脂質との結合が弱くなることが分かった。また、C 末端ヘリックスの電子密度が観察されなかった MlaC は、他の MlaC と比べて脂質結合ポケットを MlaD に向けた配向で結合していた。以上より、MlaC は C 末端ヘリックスが揺らぐことで脂質結合ポケットを開くと同時に、MlaD に向けた配向で相互作用することでリン脂質を引き渡すことが示唆された。

P1-054

APLICoT 法の確立とヌクレオチド交換因子 GrpE の必須機能の解明

○石川 李津¹, 重盛 林太郎^{1,2,3}, 原 慧一郎^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3} (1)慈恵医大・医・細菌学, (2)慈恵医大・先端医学・バイオフィーム研究センター, (3)慈恵医大・プロジェクト研究部・アミロイド制御研究室)

Development of the APLICoT Method for Unraveling the Essential Role of GrpE

○Liz Ishikawa¹, Rintaro Shigemori^{1,2,3}, Keiichiro Hara^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3} (1)Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., (2)Cent. Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., (3)Lab. Amyloid Regulation, Jikei Univ. Sch. Med.)

GrpE は分子シャペロン DnaK のヌクレオチド交換因子であり、幅広い細菌や真核生物のミトコンドリアに保存されている。興味深いことに、DnaK は大腸菌の生存に必須ではないが、GrpE は必須である。しかし、なぜ GrpE が大腸菌の生育に必須なのかは長らく謎であった。本研究では、ATP 依存性プロテアーゼ ClpXP が C 末端 SsrA タグ標識タンパク質を特異的に分解する系とライブセルイメージング技術を融合させた Aimed Proteolysis and Live cell Imaging Coupled Technology (APLICoT) 法を確立し、GrpE の必須機能の解明を目指した。

まず、細胞分裂に必要な FtsZ を用いて APLICoT 法の妥当性を検証した。SsrA-tag 遺伝子で大腸菌 $\Delta clpP$ 株の *ftsZ* の 3'末端に挿入し、アラビノース誘導型プラスミドで ClpXP を相補した FtsZ ノックダウン株を作製した。この株をアラビノース添加培地で培養すると、10 分以内に細胞内 FtsZ が顕著に分解された。その後、ライブセルイメージングで観察したところ、細胞分裂の阻害による菌体のフィラメント化と、それに続く細胞膜の破綻（溶菌）が観察された。同様の手法を用いて GrpE ノックダウン株を構築し観察した結果、FtsZ ノックダウン株と同様に細胞がフィラメント化し、細胞膜が破綻して溶菌する様子が確認された。また、GrpE ノックダウン株に DnaK と相互作用できない変異型 GrpE を発現させると、正常に分裂・増殖した。さらに、GrpE ノックダウン株では一部の細胞分裂関連タンパク質の分裂面への局在化やペプチドグリカンの新生合成が阻害されていることが判明した。以上の結果を踏まえ、APLICoT 法の有用性と GrpE の DnaK 非依存的な細胞機能について議論したい。

P1-055

The diversity of rhamnosyltransferases in serotype-specific glycopeptidolipid biosynthesis

○藤原 永年¹, 中屋 慎², 星野 仁彦², 前田 伸司³ (1)帝塚山大・現代生活・食物栄養, (2)国立感染症研究所ハンセン病研究センター, (3)北海道科学大・薬・薬学科)

○Nagatoshi Fujiwara¹, Makoto Nakaya², Yoshihiko Hoshino², Shinji Maeda³ (1)Dept. Food and Nutrition, Facul. Contemp. Hum. Life Sci., Tezukayama Univ., (2)Nat. Inst. Infect. Disea., Lep. Res. Cent., (3)Facul. Pharm., Hokkaido Univ. Scie.)

MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) is classified into 28 serotypes by the serotype-specific glycopeptidolipid (GPL). In this study, we showed that a clinical isolate, *M. intracellulare* Ku11 produced a novel GPL. Its oligosaccharide was defined as α -Rha-(1 $\rightarrow$ 3)-2-O-Me- α -Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-6-d- α -Tal. We analyzed the gene cluster involved in the GPL biosynthesis, and found the eight open reading frames (*orfs*) of Ku11. *M. intracellulare* NF113 produces serotype1-GPL composed of just only α -Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-6-d- α -Tal. We introduced the *orf1*-8 of Ku11 into NF113, and the GPL was replaced to Ku11-GPL. We made Ku11 mutant of *orf* deletion by CRISPR-Cas9 system and NF113 mutant overexpressing *orf*. It was clarified that *orf1*, 6, 8 were functionally responsible for glycosyltransferase. The *orf1* and *orf8* were identified as glycosyltransferase at second and third Rha position, respectively. On the other hand, no sugar transfer was detected by the overexpression of *orf6* in NF113. It is reported two types of rhamnose transferases in bacteria, one is to transfer rhamnose from deoxy thymidine diphosphate-L-rhamnose (dTDP-Rha) and the other is to transfer rhamnose from guanosine diphosphate rhamnose (GDP-Rha). It was suggested that ORF1 and ORF8 are the former type (dTDP-Rha), and ORF6 is the latter type (GDP-Rha).

P1-056/FL1-22

Streptococcus mutans が放出する膜小胞 (MV) が歯科矯正力を受けた際の骨吸収に与える影響についての研究

○松浦 孝将¹, 根岸 慎一¹, 泉福 英信² (1)日本大松戸・歯・歯科矯正, (2)日本大松戸・歯・感染免疫)

Effects of membrane vesicles released by *S.mutans* on bone resorption during orthodontic force

○Kosuke Matsuura¹, Shinichi Negishi¹, Hidenobu Senpuku² (1)Dept. Orthodontics., Sch. Dent., Nihon Univ. Matsudo, (2)Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent., Nihon Univ Matsudo)

口腔内には 700 種類を超える細菌が存在するため、矯正歯科治療を行う際に口腔細菌の影響を受ける可能性が高い。中でも *Streptococcus mutans* は歯表面にバイオフィームを形成し矯正歯科治療中に齲蝕を発生させ、治療の障害になることがある。近年、*S. mutans* が放出する膜小胞 (MV) がバイオフィーム形成に大きく関わる事やワクチン抗原として有用であることが明らかになった。MV は抗原性が高くナノサイズであることから歯根膜へ侵入し免疫原性を発揮する可能性がある。そこで本研究では歯科矯正力による骨及び歯根吸収に関して *S. mutans* の MV がどのように影響を与えるか明らかにするために、歯科矯正力を受けた際のこれらの関連サイトカインである IL-6 の増加が *S. mutans* の MV の添加によってどう変化するか検討を行った。荷重実験：歯根膜細胞を 100 mm dish で 10%FBSaMEM により培養後、荷重をかけない群 (NC), 直径 80 mm MICRO COVER GLASS を乗せる群 (PC), ガラスの上に分銅 60 g (1.0g/cm²) を荷重する群, 200g (4.0g/cm²) を荷重する 4 群に分けた。さらにそれぞれの群を二つに分け、片方の dish には MV を 0.2 μ g/ml 加えた。1%FBSaMEM により 20 時間培養後、培養上清を採取した。これらの試料における IL-6 の分泌量を、Western blotting と ELISA を行い測定した。対照群として *S. sanguinis* の MV を加えて同一の実験を行った。*S. mutans* の MV を加えた群は、IL-6 の濃度が NC, PC および荷重のみの群よりも有意に高かった。しかし *S. sanguinis* の MV は荷重をかけても IL-6 の濃度に変化はなかった。これらのことから、歯科矯正力を受けた際 *S. mutans* の MV の影響で骨及び歯根吸収が増強される可能性があることが考えられた。

P1-057

大腸菌の外膜透過性向上と細胞壁細孔形成による膜小胞産生

○谷下 駿¹, 鈴木 絵梨佳¹, 田原 悠平², 宮田 真人², 二又 裕之^{1,3}, 田代 陽介¹ (1静大院・総合科技, 2大阪公大院・理, 3静大・グリーン研)

Increased membrane vesicle production by altered membrane conditions in *Escherichia coli*

○Shun Tanishita¹, Erika Suzuki¹, Yuhei Tahara², Makoto Miyata², Hiroyuki Futamata^{1,3}, Yosuke Tashiro¹ (1Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., 2Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., 3Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

グラム陰性菌である大腸菌は、細胞膜から直径 20-400 nm の球状構造体である膜小胞を産出する。膜小胞はタンパク質や核酸など菌体由来の物質を含有して輸送する機能を持ち、ワクチンやドラッグデリバリーシステムなどへの応用が期待されている。膜小胞を用いた応用展開を目指す上で、由来となる細菌の表層状態と膜小胞特性の理解は極めて重要な課題である。従来の研究において、外膜タンパク質など細菌表層に関わる遺伝子の欠損株で膜小胞形成量増加が示されているものの、その表層状態と放出される膜小胞の特性・形状についての関係は未解明な部分が多い。そこで本研究では、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 膜小胞過剰生産株において、各細菌表層状態からどのような膜小胞が放出されるのか、その理解を目指した。各変異株の外膜透過性を細胞内への NPN (N-phenyl-1-naphthylamine, 219 Da) 取り込み度により評価した結果、膜小胞形成との間に正の相関が見られた。一方、バンコマイシン(1450 Da)による外膜透過性測定結果では、外膜-内膜の架橋欠損である $\Delta tolA$ で高い透過性が確認された。また、放出された膜小胞を透過電子顕微鏡で観察したところ、 $\Delta tolA$ の他に、細胞壁合成不全を引き起こす $\Delta ponB$, $\Delta nlpI$ で多重膜小胞が形成されていた。さらに細菌の細胞壁を抽出し観察したところ、多重膜小胞を産生する変異株の細胞壁には多くの細孔が生じていた。以上の結果から、大腸菌の膜小胞形成には外膜のバックリング欠損が必要であること、さらに多重膜小胞形成には細胞壁穿孔が関与することが示唆された。

P1-058/FL1-23

Unraveling Biofilm Initiation through Active Matter Physics and Microfluidics Engineering

○横山 文秋, 竹内 一将 (東大・理・物理)

○Fumiaki Yokoyama, Kazumasa Takeuchi (Dept. Phys., Sch. Sci., UTokyo)

When do bacterial cells form a biofilm, and where does it start within a population? Understanding the entire biofilm formation process is not only of biological interest but also crucial for its regulation. While much is known about the pre-biofilm and maturation phases, where cell attachment and extracellular matrix production play key roles, the initial steps of structural design in biofilm formation remain poorly understood. We show that active matter physics offers a new perspective on biofilm initiation, where bacterial cells begin producing extracellular matrix to rigidify their structure and adopt vertical alignment as the first step in forming a 3D biofilm. Active matter physics studies the collective behavior of energy-consuming particles, such as bacterial cells, which display activities like locomotion and proliferation with orientational order. Using *Escherichia coli* confined in a microfluidic device, we found that spatial matrix production aligned with cell orientation patterns. By altering the microfluidic confinement structure, we controlled these orientation patterns and localized matrix production. Our findings suggest that bacterial cells accumulate at specific points defined by orientation and experience mechanical stress due to crowding, which triggers extracellular matrix production to initiate biofilm formation.

P1-059

DNA phase separation mechanism by mycobacterial dormancy-inducing intrinsically disordered protein

○西山 晃史¹, 野尻 健介¹, 古寺 哲幸², 白井 剛³, 伊東 孝祐⁴, 眞柳 浩太⁵, 清水 将裕⁶, 塩谷 美夏¹, 吉田 豊¹, 松本 壮吉¹ (1新潟大・医・細菌学, 2金沢大・ナノ生命科学研究, 3長浜バイオ大・バイオサイエンス, 4新潟大・院・自然研, 5九州大院・薬・創薬構造解析学, 6京都大・複合原子力研)

○Akihito Nishiyama¹, Kensuke Nojiri¹, Noriyuki Kodera², Tsuyoshi Shirai³, Kosuke Ito⁴, Kouta Mayanagi⁵, Masahiro Shimizu⁶, Mika Shioya¹, Yutaka Yoshida¹, Sohkiichi Matsumoto¹ (1Dept. Bacteriol., Niigata Univ. Sch. Med., 2NanoLSI, Kanazawa Univ., 3Dept. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. & Technol., 4Grad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., 5Dept. Drug Discov. Struct. Biol., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ., 6Inst. Integr. Radiat. Nuclear Sci., Kyoto Univ.)

Mycobacteria are the major human pathogens that are prone to become dormant persisters. As for tuberculosis (TB), latent infection with dormant *Mycobacterium tuberculosis* is the major source of active TB. Mycobacteria express a unique histone-like protein, mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) which is one of the abundant proteins of dormant mycobacteria. MDP1 has a histone tail-like intrinsically disordered region (IDR) which is rare in bacteria. Inducible expression of MDP1 induced dormancy phenotypes (e.g. chromosome compaction, growth suppression) via IDR function in MDP1-knockout *M. smegmatis*. We have reported the dynamic DNA crosslinking mechanism by MDP1 in which MDP1 cross-links DNA duplexes by using its IDR like “double-sided tape”, resulting in side-by-side DNA bundle formation. We also found that MDP1 induces the different types of phase separation with various DNA strands via its IDR function. In this study, we further investigated the mechanism of DNA/MDP1 phase separation, including the structure of DNA/MDP1 complexes, DNA/MDP1 ratio, and the role of N-terminal globular region of MDP1. Here, we summarize our current findings of MDP1/DNA phase separation.

P1-060

Staphylococcal nucleoid clogging enhances ureE expression and confers acid tolerance

○牛島 由理¹, Tan Tin Ming², Mais Maree¹, 大庭 良介¹, 森川 一也¹ (1筑波大・医・微生物, 2筑波大・人間総合科学研究科・微生物)

○Yuri Ushijima¹, Tan Tin Ming², Mais Maree¹, Ryosuke L Ohniwa¹, Kazuya Morikawa¹ (1Inst. Med. Microbiol., Univ. Tsukuba, 2Grad. Sch. Comprehensive Human Sciences, Univ. Tsukuba)

Background: A dynamic structural change of the staphylococcal nucleoid under oxidative stress conditions, from fibrous to clogged states, did not directly protect genome DNA as clarified in *E. coli*. Based on the transcriptome analysis, our current working hypothesis is that nucleoid clogging affects a series of gene expressions around ori, thereby contributing to infection processes.

Aim: To demonstrate that nucleoid clogging promotes complex stress tolerance through gene regulation.

Methods: We focused on *ureE*, which encodes urease and is upregulated in nucleoid-clogged cells. We tested survival under acidic conditions using *ureE* mutant and wild-type strains pre-exposed to oxidative stress to induce nucleoid clogging.

Results: After exposure to oxidative stress, the wild-type strain clogged the nucleoid and upregulated the *ureE* gene. It showed a 3-fold better survival in acidic conditions in the presence of urea than in the absence of oxidative stress or in the absence of urea, while neither $\Delta ureE$ (nucleoid-clogged cells) nor $\Delta mrgA$ (deficient in nucleoid clogging) promoted survival.

Discussion: The present results suggest that oxidative stress-inducible nucleoid clogging confers cell acid tolerance through the *ureE* gene. It may play an important role in the infection process, especially in the survival within macrophages where the cells are challenged by both oxidative and acid stress.

P1-061

Clostridium sporogenes の SpoIVA タンパク質は耐性芽胞の形成に必須である

○桑名 利津子¹, Bruno Dupuy², Isabelle Martin-Verstraete², 高松 宏治¹ (1)摂南大・薬, (2)Institut Pasteur)

SpoIVA is an essential morphogenetic protein for a mature spore in Clostridium sporogenes NBRC 14293

○Ritsuko Kuwana¹, Bruno Dupuy², Isabelle Martin-Verstraete², Hiromu Takamatsu¹ (1)Pharm. Sci. Setsunan. Univ., (2)Institut Pasteur)

Clostridium sporogenes は、*Clostridium botulinum* と遺伝的に近縁であるが、毒素遺伝子を持たない嫌気性の芽胞形成細菌である本研究では、*C. sporogenes* NBRC14293 株における芽胞形成機構を明らかにするために、SpoIVA の機能解析を行った。spoIVA 変異株芽胞は、熱およびリゾチームに対する耐性を消失していた。透過型電子顕微鏡観察から野生株の芽胞は外側からエキソスポリウム、コート、コレテックス、コアの構造があり、spoIVA 変異株では母細胞内に異常な渦巻き状の構造体が観察され、またフリーの芽胞ではエキソスポリウム、コートが十分に形成できず、コアの脱水も不十分な芽胞が観察された。このspoIVA 変異株の異常な細胞形態は蛍光試薬を用いた蛍光顕微鏡観察においても母細胞内の異常な構造体、および母細胞から放出されたフリーの芽胞が観察できた。これらのことから、spoIVA 変異株ではエキソスポリウムとコートタンパク質がミスアセンブルし、それらが母細胞に蓄積していることがわかった。本研究結果から、SpoIVA は *C. sporogenes* の芽胞に必須の形態形成タンパク質であり、耐性獲得に関与することが明らかになった。特に、spoIVA 変異株において異常な構造であるがフリーの芽胞が観察されたことから、*Bacillus* と *Clostridium* では SpoIVA タンパク質の機能が異なることが考えられる。また種々の蛍光試薬を用いた蛍光顕微鏡観察は芽胞の構造解析だけでなく芽胞の検出にも有用であることを報告する。

P1-062

枯草菌の芽胞形成期におけるハウスキーピングタンパク質の局在部位の解析

○高松 宏治, 桑名 利津子 (摂南大・薬・微生物)

Analysis of the localization of housekeeping proteins during sporulation in *Bacillus subtilis*

○Hiromu Takamatsu, Ritsuko Kuwana (Pharm. Sci., Setsunan Univ.)

バチラス属やクロストリジウム属の細菌は長期休眠能と耐久性を備えた芽胞を形成する。芽胞形成菌はライフサイクルを通じて少なくとも5つの細胞形態(栄養細胞, 母細胞, プレスポア, フォアスポア, 成熟芽胞)を示す。枯草菌は芽胞形成菌のモデル生物として全ゲノム配列が決定され、各遺伝子の発現や機能に関する網羅的な解析が進められている。本研究では枯草菌の芽胞形成過程におけるハウスキーピングタンパク質の役割を解明することを目的とし、核様体形成、転写、翻訳、翻訳後修飾、代謝などに関与する増殖必須タンパク質を中心に GFP 融合タンパク質を作成し、蛍光顕微鏡観察により発現時期と局在部位について検討した。芽胞形成期において、母細胞、プレスポア、フォアスポアでは、多くのハウスキーピングタンパク質の存在比率や局在部位が栄養細胞と比較して変化することが分かった。例えば、核様体形成に関与する Hbs は栄養増殖期から成熟芽胞まで、全ライフサイクルの細胞で観察された。しかし、フォアスポアの DNA は紫外線抵抗性に関与する SASPs (small acid-soluble spore proteins) と優先的に結合して核様体を形成し、Hbs と結合しないことが示唆された。母細胞内では転写因子である GerR/YlbO が発現し、Hbs と共に部分的に凝集した状態の核様体を形成することが分かった。ハウスキーピングタンパク質の機能はライフサイクルを通じて変化し、特に不等分裂後に母細胞とプレスポアで生じる変化は細胞分化を決定付ける要因として重要と考えられる。本研究の成果は芽胞による感染症や変敗の防止に寄与すると期待される。

P1-063

Tolerance to oxidative stress by sulfide; quinone oxidoreductase in *Mycobacterium smegmatis*

○松尾 祐一¹, 志波 智夫², 岸川 淳一², 伊豫田 健次², 中井 宇響², 太田 明菜², 澤 智裕³, 豊元 柊弥³, 北 潔^{4,5}, 稲岡 健ダニエル^{4,6} (1)熊本大・医・保健学科, (2)京都工芸繊維大院・工芸科学・応用生物学, (3)熊本大・医・微生物, (4)長崎大院・熱帯医学グローバルヘルス研究科, (5)長崎大・熱帯医学研究所・感染生化学分野, (6)長崎大・熱帯医学研究所・感染分子ダイナミックス分野)

○Yuichi Matsuo¹, Tomoo Shiba², Jun-ichi Kishikawa², Kenji Iyoda², Uta Nakai², Akina Ota², Tomohiro Sawa³, Touya Toyomoto³, Kiyoshi Kita^{4,5}, Daniel Ken Inaoka^{4,6} (1)Dept. Health Sciences., Sch. Med., Kumamoto Univ., (2)Dept. Appl. Biol., Grad Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst of Technol., (3)Dept. Microbiol., Sch. Med., Kumamoto Univ., (4)Sch. Trop. Med. and Glob. Health, Nagasaki Univ., (5)Dept. Host-Defense Biochem., Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ., (6)Dept. Molecular Infection Dynamics, Inst. of Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, is an extremely successful pathogen that adapts to survive within the host. Hydrogen sulfide enhances the growth of Mtb by activating oxygen respiration via sulfide; quinone oxidoreductase (SQOR). However, the biochemical features of MtbSQOR are unclear. In this study, enzyme kinetics and crystal structure of MtbSQOR were revealed by using recombinant MtbSQOR. In Proteobacteria, SQOR utilizes hydrogen sulfide, quinone, and sulfur acceptor as a substrate, and flavin adenine dinucleotide as a cofactor for electron transfer. However, the sulfur acceptor was unnecessary for MtbSQOR. And MtbSQOR structure at 2.18 Å demonstrated the active center, consisting of two cysteine residues, Cys-160 and Cys-338. Moreover, ¹⁶⁰Cys-S-S₄-S-³³⁸Cys bridge was confirmed by cocrystallization with hydrogen sulfide and ubiquinone-1. And MtbSQOR produced H₂S₂ and H₂S₃ as sulfur products, which have antioxidant.

Understanding a physiological function of MtbSQOR, it was overexpressed in *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) lacking SQOR, evaluating the tolerance of oxidative stress by hydrogen peroxide. MtbSQOR contributed to resistance to oxidative stress in *M. smegmatis*. In conclusion, Mtb may produce supersulfide by SQOR and resist oxidative stress in phagosome.

P1-064/FL1-24

ウェルシュ菌自己溶解酵素オートリシンの細胞壁結合部位の機能解析

○白神 望夢¹, 青野 りよ², 成谷 宏文³, 松永 望⁴, 関谷 洋志⁵, 玉井 栄治⁵, 片山 誠一⁴ (1)岡山理科大院・理工・自然科学, (2)香川県立保健医療大・臨床検査, (3)十文字学園女子大・人間生活学・食品開発学科, (4)岡山理科大・理・臨床生命科学, (5)松山大・薬・感染症学)

Functional analyses of the cell wall-binding domain of autolysin in *Clostridium perfringens*

○Miyu Shiraga¹, Riyo Aono², Hirofumi Nariya³, Nozomu Matsunaga⁴, Hiroshi Sekiya⁵, Eiji Tamai⁵, Seiichi Katayama⁴ (1)Dept. Natural Sci., Grad. Sch. Sci. and Technol., Okayama Univ. Sci., (2)Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. of Health Sci., (3)Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ., (4)Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., (5)Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ.)

自己溶解酵素(オートリシン)は、ペプチドグリカンを分解する酵素であり、細菌の細胞分裂に必須の酵素である。ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は、ヒトにガス壊疽と食中毒を起こす偏性嫌気性芽胞細菌であり、オートリシンである Acp が細胞分裂に大きく関与していることが知られている。Acp は、シグナルペプチドと10個のSH3サブドメイン(CWB)からなる細胞壁結合ドメインとN-アセチルグルコサミダーゼドメイン(AcpCD)からなる分子量120 kDaの酵素である。我々は、Acpの3番目と4番目のCWBの間で切断された7つCWBを持つAcp(95 kDa)が隔壁および極に局在すること、CWBがないAcpCDを持つ菌では細胞分裂に異常をきたし菌体が長くなることを明らかにしてきた。本研究では、Acpの機能にCWBがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。さまざまな長さのCWBを持つAcpの遺伝子をキシロース誘導型プロモーターを持つ発現ベクターにクローニングし、acp遺伝子欠失株(NH13 acp::erm)に形質転換した。0.05%キシロース存在下において、これらの遺伝子を発現させ菌体の長さを測定した。その結果、5つのCWBを持つAcp(6-10CWB+CD)は完全なAcp(1-10CWB+CD)とほぼ同じであったが、2つのCWBしか持たないAcp(9-10CWB+CD)では長くなっていた。CWBの数がある一定以上少なくなると細胞分裂に異常をきたすことから、CWBの数がAcpによる細胞分裂に影響を与えることが示された。

P1-065

Evaluating MDP1 gene regulation and its role in survival of *Mycobacteria tuberculosis* var. BCG

○Amina Kaboso Shaban¹, Geberemichal Geberetsadik^{1,2}, 袴田 真理子^{1,3}, 滝原 速仁⁴, 西山 晃史¹, 尾関 百合子¹, 立石 善隆¹, 山口 雄大^{1,5}, 奥田 修二郎⁴, 松本 壮吉^{1,6} (¹新潟大・細菌学, ²Biology Dept., Assosa Univ., Assosa, Ethiopia, ³新潟大・呼吸器・感染症内科, ⁴新潟大・バイオインフォマティクス分野, ⁵大阪首都大・薬, ⁶Tuberculosis Lab. Tropical Disease Inst. Airlangga Univ., Indonesia)

○Amina Kaboso Shaban¹, Geberemichal Geberetsadik^{1,2}, Mariko Hakamata^{1,3}, Hayato Takihara⁴, Akihiro Nishiyama¹, Yuriko Ozeki¹, Yoshitaka Tateishi¹, Takehiro Yamaguchi^{1,5}, Shujiro Okuda⁴, Sohkiichi Matsumoto^{1,6} (¹Dept. Bacteriol., Niigata Univ., ²Biology Dept., Assosa Univ., Assosa, Ethiopia, ³Respiratory Medicine and Infectious Disease Dept., Niigata Univ., ⁴Bioinformatics Dept., Niigata Univ., ⁵Pharmacology Dept., Osaka Metropolitan Univ., ⁶Tuberculosis Lab. Tropical Disease Inst. Airlangga Univ., Indonesia)

The effectiveness of the live attenuated BCG vaccine against tuberculosis is hinged on BCG survival in harsh host environments. Survival ensures continuous immune response induction and protection against tuberculosis. *hupB* is an essential gene in BCG that codes for Mycobacterial DNA binding protein 1 (MDP1). Despite being a nucleoid associated protein, there is limited knowledge on how MDP1-DNA interaction influences BCG growth and survival. Here, we demonstrate for the first time that suppression of MDP1 resulted in significantly low BCG growth in vitro and increased its susceptibility to antibiotics and oxidative stress. MDP1-cKD BCG also exhibited low infectivity and survival in THP-1 macrophages and mice, indicating possible susceptibility to host mediated stress, which resulted in reduced cytokine (IFN-gamma and TNF-alpha) production by splenocytes. Temporal transcriptome profiling revealed that MDP1 is a global gene repressor. Notable was the deferential expression of genes involved in stress response (*sigI*), maintenance of DNA integrity (*mutT1*), REDOX balance (*WhiB3*), and host interactions (*PE/PE_PGRS*). Furthermore, pathway analysis showed suppression of biosynthetic pathways that coincide with low in vitro growth. Thus, we illustrate MDP1's importance in BCG survival and highlight MDP1-dependent gene regulation suggesting its role in growth and stress adaptation.

P1-066

Regulation of iron Uptake machinery with curli formation via the BasS/BasR-CsgD cascade in *E. coli*

○松吉 志^{1,2}, 小笠原 寛^{2,3,4,5} (¹信州大・総合医理工, ²信州大・基盤研究セ, ³信州大・総合人間科学, ⁴信州大・RCAM, ⁵信州大・IFES)

○Nozomi Matsuyoshi^{1,2}, Hiroshi Ogasawara^{2,3,4,5} (¹Grad. Sch. Med., Sci. Tech., Shinshu Univ., ²Res. Ctr. Adv. Sci. Tech., Div. Gene Res., Shinshu Univ., ³Acad. Assy. Sch. Hum. SoSci. Inst. Hum., Shinshu Univ., ⁴Rn. Ctr. Appl. Microbiol., Shinshu Univ., ⁵Inst. Fiber Eng., Shinshu Univ.)

Curli, amyloid fibers produced by *E. coli* and *S. enterica*, are key components of biofilms and act as virulence factors in host infections. *csg* genes, essential for curli formation, are regulated by CsgD. *fepDGC* encode inner membrane transporter for importing Fe³⁺-enterobactin complexes into the cytoplasm. In this study, we identified the binding site of CsgD in the *fepD* promoter and investigated the mechanism of regulation of *fepDGC* expression. Using the *fepD* promoter-*lacZ* fusion plasmid, *fepD* promoter activity was measured in wild-type *E. coli* (BW25113) and the *csgD*-deficient strain, the *fepD* promoter activity in the *csgD*-deficient strain was significantly reduced compared to the wild-type strain. In addition, the *fepD* promoter activity was also reduced in the *basS*- and *basR*-deficient strains, suggesting that BasS/R two-component regulatory system that senses Fe³⁺, is involved in *fepDGC* expression upstream in the cascade via upregulation of CsgD expression. Curli formation and biofilm formation were also significantly reduced in the three mutants (*basS*-, *basR*-, and *fepD*-deficient strains), respectively. Additionally, the *sodB*, encoding an iron-dependent superoxide dismutase, was also positively regulated by CsgD, suggesting *fepDGC* and *sodB* co-regulated to suppress Fenton reaction induction. Further studies are ongoing to clarify the direct regulation of *sodB* by CsgD.

P1-067

ArcB/ArcA 二成分制御系による *Vibrio alginolyticus* の側鞭毛発現調節機構の解析

○藤井 萌¹, 横田 憲治², 美間 健彦¹ (¹愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査, ²岡山大学・院保健)

Regulation of lateral flagellum by ArcB/ArcA two-component regulatory system in *Vibrio alginolyticus*

○Moe Fujii¹, Kenji Yokota², Takehiko Mima¹ (¹Microbiol., Dept. Med. Techn., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci., ²Okayama Univ. Grad. Sch. Health Sci.)

二成分制御系は、細菌が環境の変化に適応するための最も主要な機構である。二成分制御系の一つに、ArcB/ArcA 二成分制御系がある。ArcB/ArcA 二成分制御系は他の細菌において、遊走能を制御することが明らかとなっている。しかし、その制御は菌種によって全く異なっている。本研究では、*Vibrio alginolyticus* の ArcB/ArcA 二成分制御系の遊走制御への寄与を明らかにし、その制御機構を解析した。野生株の染色体 DNA 上の *arcA* または *arcB* を欠失させた変異株を作製して遊走能を調べた結果、野生株と比較し、*arcA* 欠失株および *arcB* 欠失株は遊走能が低下した。また、*arcA* 欠失株に *arcA* 発現プラスミドを導入した相補株は、野生株と同程度の遊走能を示した。以上より、ArcB/ArcA 系は本菌においても遊走能を制御することが明らかとなった。本菌は、水中での遊走に関わる極鞭毛と固体表面での遊走に関わる側鞭毛の二種類の鞭毛を保有する。遊走に関わる側鞭毛関連遺伝子の発現量を qRT-PCR により調べた結果、野生株と比較し、*arcA* 欠失株および *arcB* 欠失株では *motY*, *lafK*, *flgB*, *lafA*, *fliM* の発現量が有意に低下した。また、*arcA* 相補株におけるそれら遺伝子の発現量は、野生株と同程度であった。これらより、ArcB/ArcA 系は側鞭毛関連遺伝子の発現を調節することが明らかとなった。今後は、ArcB/ArcA 系の側鞭毛関連遺伝子の発現調節機構の詳細について検討したい。

P1-068

Sponge RNAs: the regulators of bacterial small RNAs

○宮腰 昌利 (筑波大・医・感染生物学)

○Masatoshi Miyakoshi (Dept. Infect. Biol., Inst. Med., Univ. Tsukuba)

In bacteria, gene expression is regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels. Small RNA (sRNA) is one of the major post-transcriptional regulators and regulates the initiation of translation and/or the stability of target mRNAs by base-pairing at the 5' untranslated region (UTR). The steady-state levels of many sRNAs are determined by the velocities of de novo transcription and degradation. Sponge RNAs are an emerging class of sRNAs that base-pair with sRNAs. Sponge RNA competes with sRNA for its target mRNAs and, in some cases, facilitates the degradation of the target sRNA. This study identifies a few sRNAs for GcvB sRNA, the global regulator of amino acid metabolism in gamma-Proteobacteria such as Enterobacteriaceae and Vibrionaceae, and reveals their mechanisms of action. Interestingly, the sponge RNAs for GcvB are found in the 3' UTRs of GcvB target mRNAs and the attenuator of an amino acid biosynthetic operon.

P1-069/FL1-25

TsrA-mediated gene regulation in *Vibrio parahaemolyticus*

○Tan Paramita Wibowo Sutanto, Andre Pratama, 石井 英治, 飯田 哲也, 松田 重輝 (阪大・微研・細菌感染)

○Tan Paramita Wibowo Sutanto, Andre Pratama, Eiji Ishii, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda (Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ.)

Nucleoid-associated proteins (NAPs) in bacteria play important roles not only in chromosome organization but also in modulating virulence gene expression. The best-studied NAP is the histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS), which often functions in concert with co-regulators. We have reported that H-NS regulates virulence gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*, a major cause of seafood-borne gastroenteritis. TsrA, a small protein conserved among *Vibrio* species, has been implicated as a co-regulator of H-NS in *V. cholerae* even without a DNA-binding motif, but remains poorly characterized. Here, we show the negative regulatory role of TsrA for virulence gene expression in *V. parahaemolyticus*. In our transcriptome analysis, genes with increased expression in the *tsrA*-deleted strain compared to the parental strain RIMD2210633 were exclusively located in the pathogenicity island region. Further studies are underway to elucidate the detailed mechanism of TsrA regulation. In this poster presentation, I would like to discuss the regulatory mechanism of TsrA and how it compares to H-NS in *V. parahaemolyticus*.

P1-070

Phosphorothioate modification in *Helicobacter cinaedi* and its association with host response

○林原 絵美子, 青木 沙恵, 見理 剛 (Bacteriology II, NIID)

○Emiko Rimbara, Sae Aoki, Tsuyoshi Kenri (Bacteriology II, NIID)

DNA phosphorothioate (PT) modification is a defense system against foreign DNA, which is widespread in prokaryotes. However, unlike methylation, not all target motifs are modified, and the biological significance of PT modification to bacterial host has not been fully elucidated. We have found that, by pan-genomic analysis, strains belonging to CC9, which caused hospital outbreaks, specifically have the *dnd* genes involved in PT modification. Analysis of *dnd* knockout mutant for DNA modification using SMRT analysis platform indicated that the target motif is predicted as RGAGCY with a frequency of 10.6%. The frequency of PT modification by knockout of the gene encoding DndB, which is supposed to control PT modification negatively, increased to 20.1%. In addition, comparative transcriptome analysis indicated that, *dnd* knockout significantly reduced the expression of genes encoding two component regulator DccR, Legionaminic acid biosynthesis protein, poly(beta-D-mannuronate) O-acetylase AlgI, and RND efflux system. Among them, the expression of some genes containing *algI* were increased significantly by *dndB* knockout. Caco-2 cell infection experiment indicated that the cytotoxicity of *H. cinaedi* infection measured by the lactate dehydrogenase assay was significantly increased by *dnd* knockout. These findings indicated the possible role of PT modification in host responses.

P1-071

Oxidative stress promotes the expression of Mfa1 fimbriae in *Bacteroides vulgatus*

○Emmanuel Munyeshyaka¹, 今大路 治之¹, 山崎 尚², 多田 彩乃¹, Nafisa Tabassum¹, 桑原 知巳¹ (¹香川大・医・微生物, ²兵庫医大・生物)

○Emmanuel Munyeshyaka¹, Haruyuki Imaohji¹, Hisashi Yamasaki², Ayano Tada¹, Nafisa Tabassum¹, Tomomi Kuwahara¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., ²Dept. Biology, Hyogo Med. Univ.)

The genus *Bacteroides* is an important component of the human gut microbiota, providing the health benefits to human host, but also associating with opportunistic infections or inflammatory bowel diseases. In particular, *Bacteroides fragilis* has evoked the specific proteins to resist oxygen stress. We recently identified a locus that regulates Mfa1 fimbriae production in *B. vulgatus* ATCC8482. In this study, we investigated whether the regulation of Mfa1 fimbriae expression is involved in the physiological adaptation of *B. vulgatus* to oxidative stress. Exposure of *B. vulgatus* to hydrogen peroxide significantly increased the transcriptional level of Mfa1 fimbriae locus. *B. vulgatus* cells were found to aggregate when exposed to hydrogen peroxide. Furthermore, immunostaining of *B. vulgatus* cells exposed to hydrogen peroxide with an anti-Mfa1 polyclonal antibody indicated that the production of Mfa1 fimbriae is promoted in response to oxidative stress. These results suggest that the oxidative stress is one of the environmental signals that stimulate the expression of Mfa1 fimbriae in *B. vulgatus*.

P1-072/FL1-26

VirR/S, VR-RNA 欠損ウェルシュ菌における phased A-tracts の機能

○城 愛未¹, 松井 佐弥², 橋川 直也³, 佐藤 日南太², 相原 一欽², 田中 千春², 成谷 宏文⁴, 松永 望³, 片山 誠一³ (¹岡山理科大学・理工・自然科学, ²岡山理科大学・理・臨床生命科学, ³岡山理科大学・理・臨床生命科学, ⁴十文字学園女子大学・人間生活学・食品開発)

Function of phased A-tracts on α -toxin gene expression of *Clostridium perfringens virRS* mutant

○Manami Jou¹, Saya Matsui², Naoya Hashikawa³, Hinata Sato², Kazuyoshi Aibara², Chiharu Tanaka², Hirofumi Nariya⁴, Nozomu Matsunaga³, Seiichi Katayama³ (¹Dept. Natural Sci., Grad. Sch. Sci. and Technol., Okayama Univ. Sci., ²Dept. Life Sci., Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., ³Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ⁴Dept. Food Sci., Fac. Human Life, Jumonji Univ.)

ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は複数の毒素を産生する。その中の一つ α 毒素 (ホスホリパーゼ C) は、ガス壊疽の原因毒素として知られている。 α 毒素遺伝子(*plc*)の発現は、*virR* 遺伝子がコードする small RNA 分子である VR-RNA を介して二成分制御系である VirR/S によって制御されている。一方、 α 毒素遺伝子(*plc*)プロモーターの上流には、5 から 6 個のアデニンが連なった A-tracts が 3 つ周期的に現れる phased A-tracts (3A) が存在する。この配列によって低温依存的に *plc* 遺伝子の発現が促進されることが *in vitro* で明らかになっている。phased A-tracts の機能を明らかにするために、 $\Delta virR$ 変異株、および phased A-tracts を A-tracts が無い配列に置換した株 (0A) を作製した。これらの変異株の α 毒素 (PLC) 産生と *plc* 遺伝子発現量を調べると、HN13 $\Delta virR$ /pJIR418(3A) と HN13 $\Delta virR$ /pvrr(3A)の両方で、*plc* 遺伝子の転写レベルは低温依存的に有意に上昇した。0A 株では、低温依存的な発現促進は認められなかった。以上のことから、phased A-tracts は *in vivo* においても *plc* 遺伝子の発現を低温依存的に促進していることが示された。さらに二成分制御系 VirR/S の影響を全く受けない HN13 $\Delta virRS \Delta virR$ 変異株を作製し、その 3A 株、0A 株を、in-frame deletion 法を用いて作製した。これらの株で *plc* 遺伝子の転写レベルの変化を調べた。

P1-073

Vibrio alginolyticus の遊走に関わる遺伝子の探索

○楠 眞由, 藤井 萌, 美間 健彦 (愛媛県立医療技術大・保健科学・臨床検査・微生物検査)

Identification of genes involved in swarming motility in *Vibrio alginolyticus*

○Mayu Kusunoki, Moe Fujii, Takehiko Mima (Microbiol., Dept. Med. Techn., Fac. Health Sci., Ehime Pref. Univ. Health Sci.)

Vibrio alginolyticus は、ゼラチンを添加した培地でのみ遊走し、コラゲナーゼを産生する。このことから、本菌はゼラチンを感知する機構を有すると考えられる。遊走能がゼラチンによって制御されることから、遊走に関わる遺伝子を探索することで、ゼラチン感知に関わる遺伝子を同定できる可能性がある。そこで、トランスポゾン (Tn)・ランダムミュータジェネシスを用いて、野生株 I.029 の遊走に関わる遺伝子を探索した。839 株の Tn 挿入変異株の遊走能を調べた結果、123 株で遊走能の低下が見られた。遊走能が低下した株の Tn 挿入遺伝子を決定した結果、4 つの二成分制御系が遊走に関わると予想された。それら二成分制御系をコードする遺伝子をそれぞれ欠失させた変異株を作製して遊走能を親株と比較した結果、VarS/VarA 二成分制御系のレスポンス・レギュレーター VarA と未解析の二成分制御系のセンサー・キナーゼをそれぞれ欠失した変異株は、親株よりも低い遊走能を示した。VarS/VarA 二成分制御系は、以前に我々がコラゲナーゼの産生に関わることを明らかにした。前述の通り、本菌の遊走能とコラゲナーゼ産生はともにゼラチンで制御されることから、VarS/VarA 二成分制御系は、ゼラチン認識機構に何らかの関与をすると考えられる。他方、未解析の二成分制御系は、ATCC 17749 株には保存されておらず、*V. diabolicus* などの一部の *Vibrio* 属細菌にのみ保存されていた。本研究で見出された二成分制御系が実際にゼラチンを認識するかなど、本菌のゼラチン認識機構の解明を目指して今後の詳細な解析が期待される。

P1-074

Construction of knockout mutants in nontuberculous mycobacteria

○立石 善隆, 西山 晃史, 尾関 百合子, 松本 壮吉 (新潟大・医・細菌)

○Yoshitaka Tateishi, Akihito Nishiyama, Yuriko Ozeki, Sohkiichi Matsumoto (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Niigata Univ.)

Background: Nontuberculous mycobacterial disease has emerged worldwide over the past 20 years. However, there are currently few reports on the established technique for constructing knockout mutants of nontuberculous mycobacteria. Therefore, gene recombination techniques for nontuberculous mycobacteria require further research. **Results:** We constructed vector pPR23LHR that harbors the ribosomal protein S12 gene (rpsL+) as a dominant negative selection marker and the hygromycin (Hyg) and lacZ cassettes as positive selection markers. We constructed knockout mutants of proteasomal genes, which we found to be required for hypoxic pellicle formation in *Mycobacterium intracellulare* by functional genomic analysis. The knockout mutants showed impaired hypoxic pellicle formation, consistent with previous data using epoxomicin, a proteasomal inhibitor. **Conclusions:** Our findings demonstrate that rpsL+ is an efficient dominant negative selection marker for gene recombination in nontuberculous mycobacteria. Our temperature-sensitive rpsL+ method for the construction of knockout mutants will facilitate functional assays to validate the virulence factors of nontuberculous mycobacteria and the pathogenesis of nontuberculous mycobacterial disease.

P1-075

歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* における自然形質転換機構

○安部 公博¹, 矢原 寛子², 中尾 龍馬¹, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細菌Ⅱ, (2)国際医療センター・ゲノム医科)

Natural competence in *Porphyromonas gingivalis*

○Kimihiro Abe¹, Hiroko Yahara², Ryoma Nakao¹, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiro Akeda¹ (1)Dept. Bacteriol. I, NIID, (2)Genome Med. Sci., NCGM)

P. gingivalis は、歯周病の主要な原因菌である。本菌は口腔内の歯周ポケット内に棲息し、バイオフィルムを形成して周囲の細菌と遺伝子交換を行っていることが推測されていたが、そのメカニズムについては未解明であった。最近、発表者らは、*P. gingivalis* の自然形質転換能を利用することで効率的に *P. gingivalis* に外来遺伝子を導入できることを報告した(Abe *et al.*, 2024)。本手法は、*P. gingivalis* を外来 DNA と混合し、寒天培地上でコロニーバイオフィルムを形成させて遺伝子を導入するもので、特殊な技術・試薬や装置を用いない非常に簡便な方法である。また同時に、本手法は、然形質転換が本菌のバイオフィルム中での遺伝子伝達に自大きく貢献している可能性を示唆している。しかしながら、*P. gingivalis* の自然形質転換の分子メカニズムについてはまったく知見が無い。そこで我々は、*P. gingivalis* における自然形質転換能発現の分子メカニズムの解明を目指して研究を行っている。相同性検索の結果、*P. gingivalis* ATCC 33277 株において、PGN_0421 がペリプラズムにおける DNA 輸送を担う ComEA をコードし、PGN_0519 がペリプラズムから細胞質に DNA を取り込むトランスポーターである ComEC をコードすることが明らかとなった。上記の形質転換法により作製したこれらの遺伝子の欠損株は、自然形質転換能を完全に消失していたことから、ComEA と ComEC は、*P. gingivalis* の自然形質転換に必須な因子であることが明らかとなった。現在は、*P. gingivalis* の自然形質転換に関わる新規因子の探索と検証を行っており、本発表では、最新のデータを交えて ComEA と ComEC 以外の因子についても議論したい。

P1-076

染色体数の変動がコレラ菌の表現型に及ぼす影響

○山本章治¹, 東 孝真², 斉藤 康憲¹, 李 謙一¹, 明田 幸宏¹ (1)感染研・細菌第一, (2)北里大院・薬・微生物学)

Effect of chromosome number variation on the growth phenotype of *Vibrio cholerae*

○Shouji Yamamoto¹, Takamasa Azuma², Yasunori Saito¹, Ken-ichi Lee¹, Yukihiro Akeda¹ (1)Dept. Bac. I., Natl. Inst. Infect. Dis., (2)Dept. Microbiol., Grad. Sch. Pharm. Sci, Kitasato Univ.)

コレラ菌などのビブリオ属細菌は大きさが異なる 2 本の染色体をもっており、その複製と分配のメカニズムは複数の染色体を有する細菌の中では最もよく研究されてきた。最近では完全長ゲノム配列を取得することが従来よりも容易になったせいか、2 本の染色体が融合して 1 本になった株が同定されつつある。このことから、コレラ菌の染色体数は必ずしも 2 本と決まっておらず、変動している可能性が考えられる。染色体数の違いがコレラ菌の生存戦略に果たす役割を明らかにするために、同一の遺伝的背景において染色体数が 1 本もしくは 2 本のバリエーションを構築し(それぞれ、SCV: Single Chromosome Variant もしくは TCV: Two Chromosome Variant)、表現型の違いを解析した。その結果、TCV と同様に SCV においても大小両方の染色体の *ori* から複製が開始されるものの、SCV は TCV に比べて増殖能が低いことがわかった。また、SCV と TCV のトランスクリプトームを比較したところ、SCV では TCV に比べて *Vibrio* Seventh Pandemic Island 1 (VSP1) にコードされた遺伝子群と CTX ファージの複製に関わる遺伝子群の発現が 3 倍から 6 倍程度上昇していた。VSP1 は cyclic-GMP-AMP の生合成に関わる genomic island として今から 10 年以上前に報告されていたものの、最近になってファージに対する防御機構を担っていることが明らかにされつつある。今後は、コレラ菌染色体の単一化、CTX ファージ複製の活性化、ファージ防御機構の活性化の因果関係について詳細な解析が必要である。

P1-077

Development of highly efficient and convenient transformation method for minimal genome mycoplasma

○水谷 雅希¹, John I Glass², 深津 武馬^{3,4,5}, Yo Suzuki², 柿澤 茂行³ (1学
習院大・物理, 2J. Craig Venter研・合成生物, 3産総研・生物プロセス, 4東
大・院理・生物科学, 5筑波大・院・生命環境科学)

○Masaki Mizutani¹, John I Glass², Takema Fukatsu^{3,4,5}, Yo Suzuki²,
Shigeyuki Kakizawa³ (1Dept. Phys., Gakushuin Univ., 2Synt. Biol., J. Craig
Venter Inst., 3Bioproduct. Res. Inst., AIST, 4Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci.,
Univ. Tokyo, 5Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Mycoplasmas are a group of parasitic and pathogenic bacteria characterized by a lack of bacterial cell wall and their tiny genomes. Several species have been widely investigated for their pathogenicity, as well as for genomics and synthetic biology. Conventionally, transformation of mycoplasmas was not highly efficient, less than 10^{-7} transformants/cells/ μ g plasmid DNA, therefore, a large amount of plasmid DNA and freshly cultured cells were needed. In the present study, we developed a highly efficient transformation method for the minimal genome mycoplasma JCVI-syn3B, which was created through streamlining of the genome of *Mycoplasma mycoides*. Transformation efficiency was drastically varied depending on the growth levels even in the exponential stage, and cells prepared from young cultures showed high transformation efficiencies around 10^{-2} to 10^{-3} transformants/cells/ μ g plasmid DNA. Moreover, we established a transformation method using frozen stocks of competent cells which is the first report in mycoplasmas. These procedures and findings could simplify and enhance the transformation process of JCVI-syn3B, facilitating advanced genetic engineering and biological research using JCVI-syn3B.

P1-078/FL1-27

Phage Displayed Peptides: Exploring Cancer Specificity and Therapeutic Potentials

○Varsha Rani, Myat Thu, Vivekanandan Palaninathan, Srivani Veerananarayanan, 相羽 由詞, Tan XinEe, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Varsha Rani, Myat Thu, Vivekanandan Palaninathan, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, Tan XinEe, Kazuhiko Miyanaaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Phage display has emerged as a powerful platform for targeted cancer therapeutics. Cancer is a serious illness because of its severity and tendency to recur. Unlike chemotherapy and radiotherapy, which are often limited by systemic toxicity and non-specificity, phage-displayed peptides offer high specificity and minimal toxicity by targeting dysregulated and overexpressed receptors on cancer cells. In this study, targeting-peptide sequences were engineered into the coding regions of phage capsid protein genes, allowing the display of targeting peptides on phage capsids with enhanced specificity. The targeting efficiency of these displayed peptides was evaluated in vitro using cancer cell lines (MCF-7 and HeLa) alongside normal cell lines. Biocompatibility, cytotoxicity and immunogenicity of the engineered phages were analyzed using hemocompatibility assay, cell viability assay (prestoblu method and live/dead cells imaging by confocal microscopy), and cytokine release profiles in THP-1-derived macrophages. Although these phage-displayed targeting peptides do not directly kill tumor cells, they modulate the tumor microenvironment by triggering favorable anti-tumor responses. The specificity, versatility, cost-effectiveness, and reduced systemic toxicity of phage display technique position it as a potential tool for revolutionizing current cancer therapeutic options.

P1-079/FL1-28

Engineering of Phage capsid with antibiofilm enzyme targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

○Esakiraj Palanichamy, 渡邊 真弥, Geoffrey Peterkins Kumwenda, 川口 智史, 崔 龍洙 (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Esakiraj Palanichamy, Shinya Watanabe, Geoffrey Peterkins Kumwenda, Tomofumi Kawaguchi, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium and a common cause of nosocomial infections such as pneumonia and cystic fibrosis especially in immunocompromised patients. Biofilm formation is a crucial initial step of pathogenesis, comprising macromolecules such as polysaccharides, proteins, lipids, and nucleic acids secreted by the bacteria. This matrix facilitates bacterial attachment to tissues, promoting further disease progression. The biofilm matrix also reduces antibiotic penetration, making infections difficult to treat. Enzymes that target biofilm macromolecules, especially polysaccharides, offer a promising approach to combating infections. This study aims to engineer *P. aeruginosa*-specific phage capsids that carry glycoside hydrolase enzyme to target the polysaccharide component of the biofilm. Preliminary experiments showed that glycoside hydrolase enzyme can inhibit the biofilm formation by 35-45% in the laboratory strain *P. aeruginosa* PAO1. Based on this, we constructed and purified a phage capsid carrying the glycoside hydrolase enzyme. This engineered phage capsid effectively inhibit the biofilm formation by 45-50% in *P. aeruginosa* PAO1 within 16 hours, compared to phage lacking the glycoside hydrolase. This study highlights the potential of enzyme-based phage engineering for targeting key components of pathogenic biofilms.

P1-080

予防的抗菌薬投与による口腔内細菌叢への影響

○高田 まゆこ^{1,2}, 宮脇 昭彦², 齋藤 光正¹, 福田 和正¹ (1産業医科大・医・微生物, 2産業医科大学病院・歯科口腔外科)

Effect of the antibiotics prophylaxis on oral microbiota

○Mayuko Takada^{1,2}, Akihiko Miyawaki², Mitsumasa Saito¹, Kazumasa Hukuda¹ (1Dept. Microbiol. Sch. Med., UOEH., 2Dept. Dentistry and Oral Surgery. Hosp., UOEH)

近年、予防的抗菌薬の乱用や長期投与による薬剤耐性 (antimicrobial resistance : AMR) 菌の出現が問題となっている。歯科領域の予防的抗菌薬投与は AMR 対策の主項目として重要な監視項目となっている。本研究では予防的抗菌薬投与の頻度の高い下顎埋伏智歯抜歯手術における口腔内細菌叢への抗菌薬の影響を明らかにするために定量的・定性的な評価を行った。抜歯の必要性があると判断された患者 10 名から舌と頬粘膜のスワブとうがい液を採取した。予防的抗菌薬としてはアモキシシリン (AMPC) 250mg を用いて、抜歯 1 時間前に初回投与を行い、以後抜歯 48 時間後まで 1 日 3 回経口投与した。抗菌薬初回投与前、初回投与 1 時間後および投与 1 週間後の各検体中の細菌数と細菌叢の変化について調査した。EtBr 蛍光染色法と培養法による細菌数計測の結果、いずれも抗菌薬投与前後で細菌数の有意な変化は認められなかった。また 16S rRNA V3 領域を対象とした細菌叢解析の結果、抗菌薬投与 1 週間後には 10 名とも口腔内細菌叢は変化し、投与 1 週間後では従来の細菌叢に戻る群 (4 名)、細菌叢が変化したまま戻らない群 (6 名) に分かれることが明らかとなった。細菌叢が投与前後で変化した群は抗菌薬投与前の細菌叢よりも偏性嫌気性菌の割合が有意に高くなり、う蝕や歯周炎の原因菌の割合も有意に高くなった。予防的抗菌薬投与により細菌量は有意な変化がないにも関わらず、う蝕や歯周炎になりやすい細菌叢に変化し、口腔内環境の悪化につながる可能性が示唆された。よって、患者背景を考慮した上で予防的抗菌薬投与の検討が必要と考えられた。

P1-081/FL1-29

Understanding Bacteriophage Internalization Kinetics in Mammalian Cells

○菅野 貴史, Veerananarayanan Srivani, 相羽 由詞, 宮永 一彦, Tan XinEe, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Takashi Sugano, Veerananarayanan Srivani, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyana, Tan XinEe, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Dept. Infection & Immunol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophages (phages) hold great potential as novel gene delivery vectors for medical applications due to their numerous advantages. Despite extensive research, the behavior of phages within human cells remains poorly understood. While it has been established that phages can be internalized by mammalian cells, their intracellular dynamics have not yet been fully elucidated. Gaining such insight is crucial for advancing phage-based applications. In this study, we investigated the dynamics of internalized phages within mammalian cells using two types of quantitative analysis: PFU (Plaque-Forming Unit) assay to count viable phage particles, and qPCR to quantify phage genome copies. Notably, the qPCR results were higher on average than those from PFU assay, which can be attributed to phages undergoing capsid degradation via the endo/lysosomal pathway, rendering them non-viable and thus undetectable by PFU assay. Since qPCR quantifies the phage genome, it remains effective even after capsid degradation. In conclusion, our study demonstrated that qPCR is a more suitable method for quantifying internalized phage numbers compared to PFU methods. A comprehensive understanding of phage dynamics within cells necessitates further investigation, including studies involving diverse phage types, cell types, cell lines, and endosomal inhibition pathways.

P1-082

Elongation, division and fusion manipulation in the minimal synthetic bacterium JCVI-syn3B

○Algiffari Muhammad¹, 木山 花¹, 宮田 真人^{1,2} (¹大阪公立大・院理, ²大阪公立・複合先端)

○Algiffari Muhammad¹, Hana Kiyama¹, Makoto Miyata^{1,2} (¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

JCVI-syn3B (syn3B), a minimal synthetic bacterium derived from the wall-less bacterium *Mycoplasma*, has a genome that contains only the essential genes required for propagation. This bacterium serves as a model for exploring fundamental cellular processes, including motility and the genetic basis of life. In our study, we developed methods to control cell division and fusion in syn3B. Cell division was inhibited by expression of long coiled-coil proteins and by alkaline growth conditions. Furthermore, using low concentrations of surfactants such as Tween 60, Triton X-100, and SDS, we successfully induced membrane curvature to promote cell division. Additionally, we induced cell fusion using polyethylene glycol (PEG), enabling the mixing of cytosolic components and membrane lipids. Cell fusion efficiency was influenced by the PEG type, temperature, and medium, resulting in diverse cell shapes. These techniques enable more versatile experimental approaches to investigate motility and the fundamentals of life.

P1-083/FL1-30

新規ウェルシュ菌構成的発現ベクターの構築とキシラン分解酵素遺伝子の探索

○小泉 ありさ, 内山 奈奈香, 加藤 史帆, 森山 龍一, 宮田 茂 (中部大・院・応用生物)

Construction of novel expression vectors for *C. perfringens* and screening of xylan-degrading enzymes

○Arisa Koizumi, Nanako Uchiyama, Shiho Kato, Ryuichi Moriyama, Shigeru Miyata (Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】化石燃料源に代わる選択肢の一つとして水素の生物的生産が注目されている。ウェルシュ菌は、ヘミセルロース利用能はないが、比較的 aerotolerant で増殖能が高く、水素生産性の高い菌である。本研究では、ヘミセルロースの主要成分であるキシランを効率的に分解し、水素生産可能なウェルシュ菌の構築を目的とし、キシロース利用能の付与とキシラン分解酵素の探索を試みた。

【方法・結果】キシロース利用能を付与するために、*Clostridium beijerinckii* のキシロース利用オペロンを、ウェルシュ菌の θ 毒素遺伝子と置換した。得られた置換株をキシロース含有培地で培養した結果、野生株と比較して高い増殖性と水素生産性を示した。次に、ウェルシュ菌で高い発現量と酵素活性を示すキシラン分解酵素遺伝子をスクリーニングするために、当研究室で開発した各種ウェルシュ菌発現ベクターに、*C. acetobutylicum* 及び *C. cellulolyticum* 由来の候補遺伝子のクローニングを試みた。その結果、一部の分泌シグナルを有する酵素遺伝子は、T7 プロモーター下流にはクローニングできたが、構成的発現ベクター pCC11N にはクローニングできなかった。大腸菌で発現するためだと考えられたため、pCC11N のフェレドキシン・プロモーター下流に *lac operator* 配列を挿入した新規構成的発現ベクター pCC26 を構築した。pCC26 には、pCC11N にクローニングできなかった *C. acetobutylicum* のエンドグルカナーゼ遺伝子がクローニングでき、得られたプラスミドでウェルシュ菌を形質転換した結果、酵素の分泌生産に成功した。現在、キシランから直接水素生産可能な菌株の構築を目指して、キシロシダーゼ遺伝子の探索を進めている。

P1-084

Genetic variation of hemolysin co-regulated protein 1 of *Burkholderia pseudomallei*

○Sarunporn Tandhavanant^{1,2}, Ratana Charoenwattanasatien³, Andrey A Lebedev⁴, Eric R Lafontaine⁵, Robert J Hogan⁵, Claire Chewapreecha⁶, T Eoin West⁷, Paul J Brett⁸, Mary N Burtnick⁸, Narisara Chantratita^{2,6} (¹Dept. Bacteriol., NEKKEN, NU, ²Dept. Microbiol. Immunol., FTM, MU, ³Beamline Div, SLR Inst, ⁴CCP4, RCaH, ⁵Dept. Infect. Dis., CVM, UGA, ⁶MORU, FTM, MU, ⁷Dept. Med., UW, ⁸Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., UNR)

Hcp1 is a component of the T6SS1 that plays a key role during the intracellular lifecycle of *Burkholderia pseudomallei* (Bp). Hcp1 is recognized as a promising target antigen for developing melioidosis diagnostics and vaccines. While the gene encoding Hcp1 is retained across Bp strains, variants of *hcp1* have recently been identified. This study examined the prevalence of *hcp1* variants in clinical isolates and assessed the antigenicity of the Hcp1 variants, and the ability of strains expressing these variants to stimulate MNGC formation in comparison to strains expressing wild-type Hcp1 (Hcp1^{wt}). Sequence analysis of 1,283 clinical isolates of Bp demonstrated the presence of 8 *hcp1* alleles encoding 3 types of Hcp1 proteins, including Hcp1^{wt} (98.05%), Hcp1^A (1.87%) and Hcp1^B (0.08%). Compared to strains expressing Hcp1^{wt}, those expressing the dominant variant, Hcp1^A, stimulated lower levels of Hcp1^A-specific antibody responses in melioidosis patients. Interestingly, when Hcp1^A was expressed in Bp K96243, this strain retained the ability to induce MNGC in A549 cells. In contrast, however, similar experiments with the Hcp1^B demonstrated a decreased ability of Bp to generate MNGC. Collectively, these results show that Bp strains expressing variants of Hcp1 elicit variable antibody responses in melioidosis patients and differ in their ability to promote MNGC formation in cell culture.

P1-085

Analysis of the relationship between temperature and activity of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase

○八代 龍¹, 金 玄², Pondpan Suwanthada³, Charlotte Poussier³, 中島 千絵³, 鈴木 定彦³, 阿戸 学¹, 中田 登¹ (¹国立感染症・感染制御・ハンセン研, ²国立感染症・細菌第二部, ³北大・人獣共通感染症国際共同研・バイオリソース)

○Ryu Yashiro¹, Hyun Kim², Pondpan Suwanthada³, Charlotte Poussier³, Chie Nakajima³, Yasuhiko Suzuki³, Manabu Ato¹, Noboru Nakata¹ (¹Leprosy Res. Ctr., Dept. Mycobacteriology, NIID, ²Dept. Bacteriology 2, NIID, ³Div. Bioresources, Intl. Inst. for Zoonosis Control, Hokkaido Univ.)

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (ML) that mainly affects the skin and peripheral nerves. The optimum temperature for the *M. leprae* metabolic activity is 28°C-33°C. The relatively low optimal temperature for ML metabolism is partly due to the nature of its DNA gyrase (DG). We analyze the effect of temperature on DG activity. DG consists of two subunits, Gyr A and Gyr B. The *gyrA* and *gyrB* genes of ML, *M. haemophilum* (MH), and *M. bovis* BCG (BCG) were cloned into the pET20b. Recombinant proteins were expressed and purified. Purified recombinant enzymes were assayed at 30°C and 37°C with a combination of GyrA and GyrB subunits for DNA supercoiling activity. DG of MH and BCG showed sufficient activities at 30°C and 37°C, but DG of ML did only at 30°C. We then investigated whether GyrA or GyrB is the main reason for ML DG not exhibiting sufficient activity at 37°C. We assayed using Gyr A and Gyr B, each derived from different mycobacteria. At 37°C, the combination of MH GyrA and ML GyrB showed sufficient activity, but the combination of ML GyrA and MH GyrB did not, suggesting that the temperature-sensitive (TS) activity is mainly due to ML GyrA. Next, we created several hybrid GyrAs that partially linked GyrA from ML and GyrA from MH and tested their activities at 37°C. Some parts of ML GyrA were suggested to be important for the TS property.

P1-086/FL1-31

Growth history under starvation influences subsequent reproduction in a clonal bacterial microcolony

○高野 壮太郎^{1,2}, 梅谷 実樹^{3,4,5}, 中岡 秀憲⁶, 宮崎 亮^{2,7,8} (¹理研・BRC・統合情報, ²産総研・生物プロセス, ³東大院・総合文化, ⁴東大・複雑系生命システム研究センター, ⁵東大・生物普遍性研究機構, ⁶徳島大・先端研究推進センター・バイオイメージング, ⁷筑波大・生命環境系, ⁸産総研・CBBDOIL)

○Sotaro Takano^{1,2}, Miki Umetani^{3,4,5}, Hidenori Nakaoka⁶, Ryo Miyazaki^{2,7,8} (¹IBID, BRC, RIKEN, ²Bioprod. Res. Inst., AIST, ³Dept. Basic Sci., Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo, ⁴Res. Center for Complex Syst. Biol., The Univ. of Tokyo, ⁵UBI, The Univ. of Tokyo, ⁶Dept. Optical Imaging, Adv. Res. Promotion Center, Tokushima Univ., ⁷Fac. Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁸CBBDOIL, AIST)

In natural environments including biofilms, most microbial cells barely receive nutrients, forcing them to be in a slow- or non-growing state. How quickly they can resume growth upon an influx of new resources is crucial to occupy niches. Isogenic microbial populations usually harbor only a fraction of cells with rapid growth resumption; however, the links between physiological characteristics and timing of growth resumption in individual cells are not well characterized yet. Here, we tracked the growth of individual *Escherichia coli* cells in microcolonies under fluctuating nutrient conditions using a microfabricated device. Shifting from high- to low-nutrient conditions caused stalling of cell growth with few cells continuing to divide extremely slowly, a process which was dependent on lipid turnover. Resuming high-nutrient inflow after low-nutrient conditions resulted in cells resuming fast growth, but with different lag times. Cellular genealogy and spatiotemporal analysis indicated the lag time was contingent on the growth history during low-nutrient conditions rather than intercellular interactions and thus inherited phenotype. Our study demonstrates the impact of epigenetic inheritance, growth history of individual cell, on emergence of rapid growing subpopulation, further implicating its role in the life cycle of bacterial population residing as biofilms.

P1-087

肺炎球菌が産生する過酸化水素が非典型オートファジーから典型オートファジーへの移行に与える影響の解析

○零石 早矢佳, 小川 道永, 明田 幸宏 (感染研・細1)

Effect of bacteria-derived hydroxy oxidase on the autophagy dynamism in pneumococci infected cells

○Sayaka Shizukuishi, Michinaga Ogawa, Yukihiro Akeda (Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis.)

肺炎球菌は主にヒトの鼻咽頭に常在しており, 小児や免疫力が低下した高齢者に敗血症や髄膜炎といった侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)を引き起こす。IPD 発症メカニズムの一つとして, 肺炎球菌は鼻咽頭上皮細胞などの宿主細胞へ定着すると, 宿主のエンドサイトシス経路を利用して細胞内に侵入する。上皮細胞は自然免疫における一次バリアとして機能していることが知られているが, 上皮細胞に侵入した肺炎球菌と宿主細胞との相互作用については不明な点が多く残されている。現在までに我々は, 肺炎球菌を感染細胞において感染1時間後に一過性に非典型的な一重膜オートファジー(conjugation of Atg8s to single membranes (CASM))が誘導され, CASM が終息した後の感染2時間後からは殺菌性を有する典型的な二重膜からなる典型的なオートファジーであるゼノファジーが誘導され, 菌は排除されることを報告している。さらに, その誘導過程ではオートファゴソーム形成の主要因子である個々のAtg8 パラログ(LC3A/B/GBRP/GBRPL1/GATE16)が個々に機能を発揮していることも明らかになってきた。しかし, その誘導過程で菌の病原因子が果たす役割については不明な点が多く残されている。今回, 我々は肺炎球菌が細胞内で産生する過酸化水素が階層性オートファジーの進行に関与することを見だし, その分子機構について解明を行った結果, 興味深い結果を得たので報告する。

P1-088

Chlamydia trachomatis (L2 434/Bu) の封入体周囲に集積するリン酸化 Akt の定量化

○出口 大揮, 黒岩 青空, 根城 美佑, 中村 眞二, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

Quantification of phospho-Akt accumulated around the inclusions of *Chlamydia trachomatis* (L2 434/Bu)

○Taiki Deguchi, Sora Kuroiwa, Miyu Neshiro, Shinji Nakamura, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

Chlamydia trachomatis (以下 Ct)は偏性細胞内寄生性細菌であり, 性器クラミジア感染症の起原菌である。Ct は宿主となる細胞に感染すると封入体と呼ばれる増殖の場を形成し, III 型分泌装置を介してエフェクターを封入体内部から細胞質へ分泌することで, 宿主細胞の種々の機能を増殖に利用する。Ct が利用する宿主細胞の機能の一つに PI3K/Akt シグナル伝達経路があり, 経路の中核となる分子 Akt のリン酸化(Ser473)は, 細胞の生存応答の促進および低酸素環境への適応に寄与する。Ct (L2 434/Bu)は低酸素環境で 10-100 倍増殖が促進されるとともに, Ct 感染細胞では Akt の過剰なリン酸化が認められ, Akt リン酸化の阻害は Ct の増殖を抑制する。すなわち Ct はリン酸化 Akt (pAkt)を利用し, 低酸素環境への適応および宿主細胞の生存応答の促進により, 菌体の増殖を促進していると考えられる。しかし Ct による pAkt 修飾機構の全容については未解明である。そこで Ct 感染細胞内における pAkt の局在を免疫蛍光染色(IF)の共焦点顕微鏡像より確認したところ, 感染細胞内の封入体周囲に pAkt (Ser473)シグナルが集積することを見出した。これは Ct が封入体膜を介して感染細胞の Akt を利用していることを示唆している。そこで Difference of Gaussians (DoG)という画像解析手法を用いて, IF 画像中の集積した pAkt シグナル面積・数の機械的な定量方法の確立に成功した。さらに pAkt シグナル面積・数の統計解析により, 酸素分圧に関わらず Ct 感染細胞の封入体周囲に pAkt が集積することを明らかにした。今後 Ct 封入体周囲への pAkt 集積機構について, Akt 強制発現細胞や Akt-KO 細胞への感染実験により分子レベルの解析を進める予定である。

P1-089

抗酸菌の病原性に関連した細胞傷害活性の解析

○瀧井 猛将^{1,2,3}, 山田 博之¹, Jordi Torrelles⁴, Joanne Turner⁴, 大原 直也^{5,6} (¹結核予防会・結研・抗酸菌, ²北里大・大村智記念研, ³名市大・院薬・衛生化学, ⁴Texas Biomed. Res. Inst., ⁵岡山大・院医歯薬・口腔微生物, ⁶岡山大・腸健康科学研究セ)

Analysis of the cytotoxicity to host cell related to the pathogenicity of Mycobacteria

○Takemasa Takii^{1,2,3}, Hiroyuki Yamada¹, Jordi Torrelles⁴, Joanne Turner⁴, Naoya Ohara^{5,6} (¹Dept. Mycobacterium Ref. & Res., RIT, JATA, ²Memori. Inst. Omura Satoshi, Kitasato Univ., ³Dept. Hyg. Chem., Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ., ⁴Texas Biomed. Res. Inst., ⁵Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. Deental. Phar. Sci., Okayama Univ., ⁶Ctr. Intestinal. Helt. Sci., Okayama Univ.)

【背景・目的】我々は、毒力のことなる抗酸菌とヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 細胞株と培養すると、毒力に応じて生菌特異的に細胞死が誘導されることを報告している。本研究では、抗酸菌の宿主細胞傷害活性について解析を行った。【材料・方法】結核菌強毒株 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv と *M. tuberculosis* HN878 の 2 株をヒト肺由来線維芽細胞株 MRC-5, MRC-9, TIG-1 に感染させた。菌の取り込みは、透過型電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞死の解析には、NLRP3 阻害剤 (MCC950), Caspase-1 阻害剤 (VX-765), Caspase-3 阻害剤 (PAC-1), Caspase-9 阻害剤 (z-LEDH) を用いた。サイトカイン量は ELISA 法で測定した。菌感染 MRC-5 と宿主細胞内の結核菌の網羅的な遺伝子発現解析は dual-RNA-Seq 法で行った。【結果・考察】H37Rv 株と HN878 株を感染させたところいずれの細胞株も両菌株により、生菌数依存的、時間依存的に細胞死が誘導された。線維芽細胞はマクロファージと同様に菌を取り込んでいた。細胞死は、感染 2 日目から観察され、MCC950, VX-765 で阻害されたが、PAC-1, z-LEDH では阻害されなかった。生菌感染特異的に IL-1 β , IL-6, IL-8 の産生が認められた。これらのことから結核菌は線維芽細胞株にパイロトーシスを誘導することが示された。網羅的な遺伝子解析では、宿主内の菌では酸化ストレス応答や休眠関連の遺伝子、ゲノムの Region of difference 1 (RD1) にコードされている VII 型分泌装置により分泌される因子 (Esx-A, Esx-B, Esx-C) 等が上昇していた。RD1 領域はワクチン株の BCG には存在しないことから、強毒株の宿主内の生存と細胞傷害活性に菌から分泌される因子が関与していることが示唆された。

P1-090

A novel method of Francisella infection using HeLa cells expressing fc gamma receptor

仲村 岳真¹, ○清水 隆², 新崎 恒平³, 宇田 晶彦⁴, 渡邊 健太⁵, 度会 雅久⁵ (¹東京大・工・応用化学, ²山口大・獣・One Welfare 研究センター, ³東葉大・生命科学・分子細胞生物, ⁴感染研・獣医科学, ⁵山口大・獣・公衆衛生)

Takemasa Nakamura¹, ○Takashi Shimizu², Kohei Arasaki³, Akihiko Uda⁴, Kenta Watanabe⁵, Masahisa Watarai⁵ (¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Engr., Univ. Tokyo, ²Ctr. One Welf., Jnt. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ., ³Dept. Mol. Cell Biol., Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm and Life Sci., ⁴Dept. Vet. Sci., NIID, ⁵Lab. Vet. Pub. Hlth., Jnt. Fac. Vet. Med., Yamaguchi Univ.)

Francisella tularensis, the causative agent of tularemia, is a facultative intracellular bacterium. Although the life cycle of this bacterium inside phagocytic cells (e.g., macrophages) has been well analyzed, the difficulty of gene manipulation in phagocytic cells makes it difficult to analyze host factors important for the infection. On the other hand, the infection efficiency of *Francisella* into epithelial cells that are easy to genetically manipulate is extremely low. To facilitate the analysis of host factors in *Francisella* infection using epithelial cells, we constructed an efficient infection model of *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) using HeLa cells expressing mouse Fc γ R2 (HeLa-Fc γ R2), and the system was applied to evaluate the role of host GLS1 on *Francisella* infection. The uptake of *F. novicida* in HeLa-Fc γ R2 cells increased 100-fold in an antiserum-dependent manner. Using HeLa-Fc γ R2 cells, we developed GLS1, a gene encoding glutaminase, knockdown cells. GLS1-knockdown cells exhibited increased cytotoxicity during infection with *F. novicida*. Furthermore, the cell death was inhibited by the addition of ammonia, the metabolite produced through glutaminase. These results suggest that GLS1 plays an important role in the control of cytotoxicity caused by *F. novicida* through ammonia production, and indicate the usefulness of this novel infection system.

P1-091/FL2-01

サルモネラは、マグネシウム飢餓時に低分子膜タンパク質 MgtU を介して細胞死を誘導する

○岩館 佑未, James Slauch (イリノイ大・分子細胞生物・微生物)

Salmonella induces cell death through a small membrane peptide MgtU under low Mg²⁺ stress

○Yumi Iwadata, James Slauch (Dept. Microbiol., MCB, U. of I.)

サルモネラは主要な食中毒原因菌のひとつであり、マクロファージ内で増殖する能力を持つため、重篤な全身性感染症を引き起こす。サルモネラはマクロファージのファゴソームに侵入するとパーシスターの形成を誘導するが、その誘導機構等についてはよくわかっていない。これまでに我々は、ファゴソーム内でサルモネラが直面するマグネシウム飢餓に着目し研究を進めたところ、マグネシウム飢餓における生存には誘導性マグネシウム輸送体またはポリアミン合成のいずれかが必須であることを明らかにした。これらの両方を欠損した $\delta synth \delta mgtA \delta mgtB$ 株は、マグネシウムが枯渇した培地への移行時に急激な生存率の低下を示す。本研究では、この細胞死の分子機構の解明を目的とし、抑制変異株を単離した。その結果、低分子膜タンパク質 MgtU、マグネシウム飢餓に応答する PhoPQ 二成分制御系、または RNase III を不活性化する変異が、 $\delta synth \delta mgtA \delta mgtB$ 変異株の生存率の低下を抑制することを明らかとなった。これらの結果と知見より、 $\delta synth \delta mgtA \delta mgtB$ 変異株では、マグネシウム飢餓時に MgtU が過剰産生され細胞死が起こることが示唆された。また、半許容のマグネシウム濃度下では、MgtU 依存的な増殖の遅延と抗生物質耐性の上昇が認められた。これは、マグネシウムが適度に枯渇した環境では、MgtU は集団レベルでの適応力を高める可能性を示唆した。現在、MgtU が細胞死を引き起こす分子機構と、野生株における MgtU の振る舞いと役割、集団レベルでの適応力における MgtU の役割を解明することに焦点を当て、研究を行なっている。

P1-092

Rab5C regulates bacterial internalization into the non-phagocytic cells through CRKL-RAC1 pathway

○野澤 孝志, 中川 一路 (京大・院医・微生物)

○Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Various pathogenic bacteria, such as Group A streptococcus, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*, invade into the host non-phagocytic cells. Bacterial internalization involves receptor- or effector-triggered actin rearrangement through RAC1 activation, but their molecular mechanism is not fully understood. In this study, we show that Rab5C, one of endocytic Rab GTPase, is a novel regulator of bacterial internalization into the non-phagocytic cells via CRKL-RAC1 signaling. Knockdown screening and knockout (KO) experiments revealed that Rab5C but not Rab5A/Rab5B is critical for bacterial internalization. RAC1 activation upon bacterial infection was impeded in Rab5C KO cells. Proteome analysis identified CRKL as a specific binding protein of Rab5C. CRKL is an adaptor protein that links integrin signaling with RAC1 activation. CRKL is recruited to the site of bacterial invading, and knockout of CRKL reduced bacterial invasion efficiencies. Taken together, it was suggested that Rab5C is involved in CRKL-RAC1 signaling and thereby facilitates bacterial internalization into the host cells.

P1-093

Host polyamines fuel blooms of enteric bacterial pathogens

○三木 剛志¹, 南野 徹², 木下 実紀², 伊藤 雅洋¹, 羽田 健¹, 岡田 信彦¹, 金 倫基¹ (¹北里大・薬・微生物, ²大阪大・生命機能)

○Tsuyoshi Miki¹, Tooru Minamino², Miki Kinoshita², Masahiro Ito¹, Takeshi Haneda¹, Nobuhiko Okada¹, Yun-Gi Kim¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Kitasato Univ., ²Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

Polyamines are aliphatic polycations that exist in all living organisms, including animals and microbes. Ionic characteristics of polyamines allow for interaction with nucleic acids, acidic phospholipids, and certain proteins. The interaction of polyamines with their substrates influences various biological reactions, including syntheses of nucleic acids and proteins. We herein show that enteropathogenic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (STm) exploits host polyamines for the functional expression of virulence factors and colonization. STm infection stimulated host polyamine production by increasing arginase expression. The decline in polyamine levels caused by difluoromethylornithine, which inhibits host polyamine production, attenuated STm colonization, whereas polyamine supplementation augmented STm colonization and pathogenesis. Our findings show that host polyamines are a key factor promoting STm infection, and therefore a promising therapeutic target for bacterial infection.

P1-094/FL2-24

Candida glabrata genes regulating phagosome maturation in macrophages

○趙 福江, 高橋 (中口) 梓, 佐藤 (岡本) 美智代, 笹本 要, 知花 博治 (千葉大・真菌医学研究センター)

○Fujiang Zhao, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Sato-Okamoto, Kaname Sasamoto, Hiroji Chibana (Divi. Molecul. Bio., Med. Mycol. Resear. Cen., Chiba Univ.)

Macrophages are a vital component of the immune system, belonging to the innate immune response. Phagosome is formed when the macrophages engulf the invading pathogens (such as bacteria, fungi, or viruses), which is a key antimicrobial mechanism. However, some successful intracellular pathogens take advantage of macrophages as a biological niche such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida glabrata*. Unlike many other pathogens, *C. glabrata* proliferates intracellularly after macrophage engulfment without causing overt cell damage, apoptosis, or cytokine release, while actively inhibiting reactive oxygen species (ROS) production. Notably, *C. glabrata* disrupts phagosome biogenesis, allowing its survival within macrophages. While significant progress has been made in understanding the interactions between hosts and pathogens such as *M. tuberculosis* and *S. aureus*, particularly regarding the inhibition of phagosome biogenesis, the molecular mechanisms by which *C. glabrata* blocks phagosome maturation remain elusive. Thus, in this study, we utilized a gene-deletion mutant collection established in our laboratory to identify several *C. glabrata* genes involved in resisting macrophage phagocytosis. We analyzed the localization and binding targets of these genes to better understand how *C. glabrata* evades macrophage-mediated antimicrobial processes.

P1-095

回帰熱病原体 *Borrelia fainii* の補体抵抗に関する病原遺伝子の探索

○佐藤 梢¹, 糸川 健太郎², 邱 永晋³, Ian Szejbach¹, 澤 洋文⁴, Bernard Mudenda Hangombe⁵, 明田 幸宏¹, 川端 寛樹¹ (¹感染研・細菌1, ²感染研・昆虫医, ³北大院・獣医・寄生虫, ⁴北大・ワクチン開発拠点, ⁵ザンビア大・獣医・基礎獣医)

Complement resistance genes in *Borrelia fainii* from human relapsing fever

○Kozue Sato¹, Kentaro Itokawa², Yongjin Qiu³, Ian Szejbach¹, Hirofumi Sawa⁴, Bernard Mudenda Hangombe⁵, Yukihiro Akeda¹, Hiroki Kawabata¹ (¹Dept. Bacteriol. I., NIID, ²Dept. Med. Entomol., NIID, ³Lab. Parasitol. Sch. Vete. Med., Hokkaido Univ., ⁴VReD, Hokkaido Univ., ⁵Dep. Paraclinical Studies, Sch. Vet. Med., Zambia Univ.)

【背景・目的】*Borrelia fainii* を含む回帰熱病原体は、感染時に高度の菌血症を示すことから、ヒト血清中の補体系に抵抗性示すと考えられている。そこで本研究では、*B. fainii* のヒト血清耐性機構に与る病原因子の探索を目的として以下の実験を行った。

【方法・結果】患者由来 *B. fainii* Qtaro 株はヒト血清中で生存率 100% の補体抵抗性を示した。他方、回帰熱群ボレリアの補体抵抗性因子として保存されている H 因子結合抗原遺伝子 (fhbA) にナンセンス変異を生じていた。そこで、既知のボレリア補体抵抗性因子を参照アミノ酸配列として、Qtaro 株の全塩基配列から PSI-BLAST 及び DELTA-BLAST を実施した。得られた候補タンパク質から、シグナル配列もしくは膜貫通ドメインを有する 26 タンパク質を選抜し、血清感受性ボレリア株に各々のタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換株を作成した。次に、形質転換株の血清感受性を指標として、既知の fhbA とは異なる補体抵抗性の *B. fainii* 由来遺伝子を決定した。この補体抵抗性を示した形質転換株は菌体膜表面上に膜侵襲複合体の形成するために必須とされる補体成分 C9 の結合を見出されず、その上流で補体活性化終末経路の起点となる C5 の結合も見出されなかった。

【考察】本研究で見出された *B. fainii* 由来の補体抵抗性遺伝子は膜タンパク質として構成され、補体活性化経路を阻害することが考えられた。また、そのアミノ酸配列は既知の補体抵抗性因子と相同性が低く、機能未知であった。以上のことから、新規の補体抵抗性因子である可能性が示唆された。

P1-096/FL2-25

抗菌ペプチド LL-37 に対する *Vibrio vulnificus* の抵抗性遺伝子の同定

○川手 真仁, 入船 太郎, 山崎 浩平, 柏本 孝茂 (北里大・獣医・獣医公衆衛生)

Identification of Resistance Genes against the Antibacterial Peptide LL-37 in *Vibrio vulnificus*

○Shinji Kawate, Taro Irifune, Kohei Yamazaki, Takashige Kashimoto (Lab. Vet. Public Health. Sch. Vet. Med., Kitasato Univ.)

【背景】*Vibrio vulnificus* は、経口または創傷感染により、極短時間内に人へ軟部組織壊死および敗血症を引き起こす。この事実、*V. vulnificus* が自然免疫機構を凌駕することを示している。中でも好中球は、細菌感染に対する主要な防御機構を担っている。我々は、*V. vulnificus* の持つ好中球抵抗性機構に着目し、その全容解明を目指している。本研究では、活性化好中球が分泌する抗菌ペプチドである LL-37 に対する抵抗性機構に着目した。

【方法および結果】*V. vulnificus* CMCP6 株を用いて *In vivo* Tn-Seq 法を実施し、トランスポゾンの挿入により好中球による殺菌を受けやすくなった 40 クローンを取得した。これらの中から、LL-37 に対する抵抗性の低下した株を選抜するため、既知の好中球抵抗性機構である運動性と莢膜発現に変異を持たない 11 株を選抜した。LL-37 はカチオン性ペプチドであり、LPS と静電相互作用により殺菌作用を発揮することが知られている。そこで、LL-37 と類似する殺菌機構を持つカチオン性抗菌薬の Polymyxin B による抵抗性試験を行い、抵抗性の低下した 8 株を選抜した。これら 8 株に対し LL-37 抵抗性試験を実施し、最終的に野生株と比較して抵抗性が 50% 程度低下した 3 株を選抜した。現在、変異遺伝子を同定中である。

【考察と展望】*V. vulnificus* は外膜においてカチオン性物質の静電相互作用を抑制することで LL-37 に対する抵抗性を持つ可能性が示唆された。今後、同定した LL-37 に対する抵抗性遺伝子をノックアウトおよび相補し、菌体膜に起こる変化を解析することで、*V. vulnificus* の LL-37 に対する抵抗性機構の解明に繋げていきたい。

P1-097/FL2-26

ThyX Overexpression Promotes the In Vivo Growth of BCG

○土佐 郁恵¹, 山口 智之^{1,2}, 松崎 吾朗³, 梅村 正幸³, 高江洲 義一³, 中山 真彰¹, 阿戸 学⁴, 大原 直也¹ (¹岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ²酪農学園大・獣医, ³琉球大・熱帯生物圏研究セ・分子感染防御学, ⁴感染研・ハensen病研究セ・感染制御, ⁵岡山大院・医歯薬・腸健康科学研セ)

○Ikue Tosa¹, Tomoyuki Yamaguchi^{1,2}, Goro Matsuzaki³, Masayuki Umemura³, Giichi Takaesu³, Masaaki Nakayama¹, Manabu Ato⁴, Naoya Ohara¹ (¹Dept. Oral Microbiol., Fac. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., ³Trop. Biosphere Res. Ctr., Univ. Ryukyus, ⁴Dept. Mycobacteriol., Leprosy Res. Ctr., NIID, ⁵Res. Ctr. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

Introduction: *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is known to be a slow-growing bacteria and possess both ThyA and ThyX as thymidylate synthases. We previously reported that ThyX overexpression promotes the *in vitro* growth of BCG, a vaccine strain of *M. tuberculosis*, whereas this phenotype is not observed with ThyA overexpression. In this study, we investigated the effect of ThyX overexpression in BCG *in vivo* through infection experiments.

Materials and Methods: pThyX was constructed by ligation a thyX expression cassette to the *Mycobacterium* plasmid pNN. pThyX BCG and pNN BCG control were generated by transforming the respective plasmid into the BCG Tokyo strain. pThyX BCG and pNN BCG control were then inoculated into 8-week-old female C57BL/6JmsSlc mice via the airway (5×10^6 CFU). Two weeks post-inoculation, the number of bacteria in the lungs was measured.

Result and Discussion: The number of pThyX BCG in the lungs was significantly higher than that of the pNN BCG control. Additionally, mononuclear cell infiltration was observed in the lungs of mice infected with pThyX BCG. These data suggest that ThyX overexpression promotes the growth of BCG not only *in vitro* but also *in vivo*, leading to inflammation in the lungs.

P1-098

Functional analysis of toxin-antitoxin systems in *Bordetella pertussis*

○後藤 雅貴, 大塚 菜緒, 見理 剛 (感染研・細菌2)

○Masataka Goto, Nao Otsuka, Tsuyoshi Kenri (Dept. Bacteriol. II, NIID)

Bacterial toxin-antitoxin (TA) systems consist of a toxin that inhibits bacterial cellular functions and an antitoxin that neutralizes the toxin activity. TA systems play an important role in bacterial survival under various environmental stresses, including antimicrobial agents. Bioinformatics analysis revealed three sets of gene pairs (*bp1522-bp1523*, *bp1663-1662*, and *bp2622-bp2623*) that likely function as TA systems in the *B. pertussis* genome. In this study, we investigated whether these gene pairs form operon structures commonly found in TA system genes and the conditions for inducing their expression. PCR was carried out with primers that were complementary to the toxin or antitoxin genes individually, using the *B. pertussis* Tohama I strain genome as a template. DNA amplification was confirmed for all gene pairs. The Tohama I strain was then cultured under glutamate starvation or acid stress conditions, and the transcription levels of *bp1522*, *bp1663*, and *bp2622* were measured, which are predicted to function as toxin genes in TA systems. The transcriptional levels *bp2622* increased 2-fold under glutamate starvation conditions ($p < 0.05$, two-tailed unpaired *t*-test). These results suggest that *bp2622-bp2623* forms an operon structure that is characteristic of TA system genes and that transcription is enhanced by nutrient starvation.

P1-099

Chlamydia trachomatis が感染細胞で利用している新たな標的分子の探索: Gab2 は増殖環を規定する

黒岩 青空, 大久保 寅彦, ○山口 博之 (北大・院・保健科学)

Role of Gab2 on the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*

Sora Kuroiwa, Torahiko Okubo, ○Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

性感染症の主な原因菌である *Chlamydia trachomatis* (Ct) は、宿主細胞にエネルギー源を依存する偏性細胞内寄生性細菌であり、宿主細胞の情報伝達経路やその標的分子を操作することで細胞内環境を最適化する。しかし、Ct は基本小体(EB)と網様体(RB)の2つの形態が分化・再分化を繰り返す二相性の増殖環を有することから、遺伝子改変が容易ではなく Ct による細胞内修飾機構の全容は明らかになっていない。その一方で、これまで私達は Ct が宿主細胞内で増殖する際に、通常酸素環境(21%O₂)では p38MAPK 経路を、低酸素環境(2%O₂)では PI3K-AKT 経路を利用していることを明らかにした(Thapa et al., *Microbes Infect*, 2020., Thapa et al., *Front Cell Infect Microbiol*, 2022.)。そして、それら経路の阻害剤パネルを用いた Ct 増殖に対する抑制効果パターンを主成分分析を用いて可視化することにより、チロシンキナーゼのアダプター分子が Ct の標的分子になり得る可能性を新たに発見した。そこで本研究では、MAPK および PI3K-AKT 経路のすぐ上流に位置するアダプター分子 Gab2 に着目し、Ct 感染細胞内での発現変化や細胞内増殖への影響について検証した。その結果、Gab2 タンパク質の細胞内発現量は、酸素分圧に関係なく Ct 感染に伴い顕著に減少した。また、Gab2 をノックダウンすると通常酸素環境において、Ct の EB 数は増加した一方で、Ct の 16S rRNA 遺伝子量は減少した。このことから、感染細胞内における Gab2 は、RB の形態を維持するもしくは EB への再分化を妨げる役割を担っており、Ct が Gab2 の発現を抑制することで、その抑制が RB から EB へと再分化するためのトリガーとして機能している可能性が示唆された。

P1-100/FL2-27

Genome-scale Metabolic Network Reconstruction Reveals Pathogenic *Leptospira* Metabolism in Hosts

○尾鶴 亮^{1,2}, 吉村 芳修¹, 園田 卓己¹, Jason Papin², 小幡 史子³, Glynis Kolling², 廣松 賢治¹ (¹福岡大・医・微生物免疫, ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³鳥取大・医・細菌)

○Ryo Ozuru^{1,2}, Michinobu Yoshimura¹, Takumi Sonoda¹, Jason Papin², Fumiko Obata³, Glynis Kolling², Kenji Hiromatsu¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., ²Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, ³Div. Bacteriol., Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Tottori Univ.)

Leptospira, the causative agent of the zoonosis "leptospirosis", proliferates most actively at approximately 30°C in culture, a temperature lower than the host's internal body temperature (37°C). Given its ability to colonize both environmental and host conditions, the metabolic activities of *Leptospira* during proliferation are likely to differ between these two settings. This study aimed to elucidate the temperature-dependent differences in metabolic systems of *Leptospira* using genome-scale metabolic network reconstruction (GENRE) analysis.

We constructed a GENRE model of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain JB197 using the tool "Reconstructor" and integrated public transcriptome data. We used these data to profile the gene expression of strain JB197 incubated at two temperatures (37°C and 29°C) and incorporated the gene profile into the model using the "RIPTiDe" method. GENRE analysis revealed increased fluxes in multiple pathways leading to the synthesis of fructose-6-phosphate (F6P) at 37°C compared to 29°C. This temperature-dependent metabolic shift enhances the production of F6P, a precursor for aromatic amino acids and nucleotides, and may provide insights for developing novel therapeutic approaches targeting *Leptospira* within the host.

P1-101

Analysis of small RNA-mediated nitric oxide resistance mechanism by RNA-binding proteins of EHEC

○清水 健¹, 鈴木 真¹, 濱端 崇² (1千葉大・医・病原細菌, 2国立国際医療研究センター研・感染症制御・細菌感染)

○Takeshi Shimizu¹, Shin Suzuki¹, Takeshi Hamabata² (1Dept. Mol. Infect., Sch. Med, Chiba Univ., 2Dept. Infect. Dise., NCGM)

We have reported that Rop, which encoded by an pOSAK1 plasmid, promotes interaction between the 5'UTR of *rpoS* mRNA and small RNAs such as DsrA in the presence of NO stress, thereby suppressing RpoS production and increasing NO resistance. Hfq is involved in the regulation of RpoS production. Therefore, we investigated the role of Hfq in the Rop-induced increase in NO resistance. Wild-type EHEC show increased NO resistance in the presence of Rop. On the other hand, the Δhfq EHEC showed no increase in NO resistance in the presence of Rop but increased NO resistance in the absence of Rop. This suggested that Hfq is essential for increase of Rop-mediated NO resistance, but when neither Rop nor Hfq is involved, NO resistance is increased by other factors. To clarify what factors are involved in this, we generated strains lacking the 5' UTR of the *rpoS*, *DsrA*, and *proQ* using Δhfq EHEC. As a result, the increase in NO resistance of each of the double mutant strains in the absence of Rop disappeared. These results indicate that in the presence and absent of Hfq, the increase in NO resistance is caused by the Rop and ProQ promoting the interaction between the 5' UTR of *rpoS* mRNA and *DsrA*, respectively. Consequently, the interaction of *DsrA* with the 5' UTR of *rpoS* mRNA causes the suppression of RpoS production.

P1-102

硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア菌の宿主免疫回避機構と殺菌メカニズムの探索

○竹内 友陽¹, 佐藤 梢², 川端 寛樹², 後藤 恭宏³, 高野 愛¹ (1山口大・共同獣医・疫学, 2国立感染症研究所・細菌第一部, 3国立遺伝学研究所・先端ゲノミクス推進センター)

Host immune evasion and bactericidal killing mechanism in hard tick-born relapsing fever borreliae

○Tomohi Takeuchi¹, Kozue Sato², Hiroki Kawabata², Yasuhiro Gotoh³, Ai Takano¹ (1Dept. Veterinary Medicine. Epidemiology. Yamaguchi Univ., 2Dept. Bacteriology-I. National Institute of Infectious Diseases, 3Advanced Genomics Center. National Institute of Genetics)

回帰熱は、ボレリア菌が引き起こす再発性の発熱を特徴とした急性のマダニ媒介性感染症である。Borrelia miyamotoi は 1995 年に北海道で最初に分離され、2011 年に新興回帰熱の起原因菌としてロシアで報告された後、日本を含むアジア、ヨーロッパ、アメリカ等で患者が報告されている。回帰熱は菌血症を起こすため、血液中で生存するためには自然免疫と獲得免疫から回避する必要がある。海外で報告される B. duttonii では表層抗原遺伝子 vlp/vsp が組換えを起こすことで菌表層の抗原性が変化し、抗体からの攻撃を回避していることが報告されている。また既報により B. miyamotoi が補体殺傷を回避するために複数の因子を持つことが明らかになっているが、生体内での作用は不明である。我々は、B. miyamotoi でも vlp/vsp が発現しており、組換えが生じていることを実験マウスで明らかにした。他方、この組換えはマウスで抗体産生が始まる 7 日前後よりも早い 5 日の段階で起こっており、抗体産生が見られない CB17SCID マウスでも 10 日以降に組換えが起こっていた。血中からの菌体の排除は WT マウスでは 10 日前後で見られ、CB17SCID マウスでは観察期間中、菌の排除が起こらなかった。また C57BL/6J マウスでは、菌接種後 10 日目の血清が *in vitro* で菌を殺傷することが明らかとなったが、この現象は補体を不活化した血清では起こらなかった。以上より、B. miyamotoi の vlp/vsp の遺伝子組換えが *In vivo* で起こることを世界で初めて証明した。また菌の排除には補体系古典経路が関与することが示唆され、今後免疫不全マウスの系統を検討し、組換えと菌排除のより詳細なメカニズムの解明を目指す。

P1-103/FL2-28

Pangenome-scale Metabolic Models Uncovered Pathogenicity-Specific Pathways in *Leptospira*

○園田 卓己¹, 尾鶴 亮^{1,2}, 吉村 芳修¹, Jason Papin², 小幡 史子³, Glynis Kolling², 廣松 賢治¹ (1福岡大・医・微生物免疫, 2Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, 3鳥取大・医・細菌)

○Takumi Sonoda¹, Ryo Ozuru^{1,2}, Michinobu Yoshimura¹, Jason Papin², Fumiko Obata³, Glynis Kolling², Kenji Hiromatsu¹ (1Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., 2Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, 3Div. Bacteriol., Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Tottori Univ.)

Leptospira are classified into pathogenic and non-pathogenic types. Pathogenic strains infect animals, reside in the kidney and spread via urine, while non-pathogens survive in the environment. Currently, 64 leptospiral species are known and divided into four clades such as P1, P2, S1, and S2. P1 strains are historically considered pathogenic, but recent findings have revealed non-pathogenic strains within P1, thus, it is now categorized as P1+ (pathogenic) and P1- (non-pathogenic). The distinct life cycles of pathogenic *Leptospira* suggest unique metabolic features, which we investigated by building metabolic models for 58 leptospiral genomes using "Reconstructor." Our analysis identified a unique metabolic flow to P1+, particularly reactions involving vitamin B12 biosynthesis. Previous studies linked vitamin B12 metabolism to P1 but did not differentiate between P1+ and P1-. Vitamin B12, essential for nucleic acid synthesis and odd-chain fatty acid metabolism, cannot be synthesized by humans. P1+ strains may benefit from this pathway by avoiding competition for host-derived resources. Despite its high energy cost, synthesizing vitamin B12 may help P1+ to adapt to host environments. However, no direct evidence links the vitamin B12 pathway to pathogenicity. Our findings provide a foundation for future research on its role in pathogenicity and potential as a therapeutic target.

P1-104/FL2-02

肺炎球菌は複数のプラスミノーゲン結合タンパク質を発現しプラスミンへの変換を促進する

○安井 惟人^{1,2}, 平山 悟¹, 土門 久哲^{1,3}, 寺尾 豊^{1,3} (1新潟大・院医歯・微生物, 2新潟大・院医歯・歯周, 3新潟大・院医歯・高口研セ)

S. pneumoniae expresses multiple plasminogen-binding proteins to convert plasminogen into plasmin

○Yoshihito Yasui^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Hisanori Doman^{1,3}, Yutaka Terao^{1,3} (1Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 2Div. Periodontol., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., 3Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【目的】*Streptococcus pneumoniae* の病原因子は主に *in vitro* で同定されてきた。本研究では、感染時に生体内で発現する同菌のタンパク質を同定するため、感染モデルマウスの肺胞洗浄液を採取して *in vivo* 定量 MS/MS 解析に供し、機能解析を実施した。

【方法と結果】*S. pneumoniae* 感染マウスの気管支肺胞洗浄液を定量 MS/MS 解析し、同菌タンパク質 15 種を同定した。そのうち 6 種はヒトプラスミノーゲン (Plg) 結合能を有すると報告されている。そこで、感染関連の機能が未解明である他の 9 種について、Plg との結合性を解析等した。*Brevibacillus* 及び大腸菌発現系により各タンパク質の組換え体を作製し、Far-Western blotting と Biacore 解析を通じて、SufC, AtpD, Vex3, Fba の 4 種が Plg に結合することを明らかにした。Plg は組織型 Plg 活性化因子 (tPA) によってプラスミンに変換されるが、この変換は SufC, AtpD, Vex3, Fba の添加量依存的に促進された。また、*S. pneumoniae* の自己溶菌酵素の遺伝子欠失株を用いて菌体表層画分を Western blotting により解析すると、野生株に比較して欠失株では SufC の検出量が少なかった。

【考察】SufC, AtpD, Vex3, Fba の Plg の機能解析の結果、感染マウスの *in vivo* サンプルから同定した 15 種のタンパク質のうち、10 種が Plg 結合能を有することが示された。これらタンパク質の多くは菌体内に存在するが、自己溶菌に伴い菌体外へ放出され、一部は SufC のように菌体表層にも局在することが示唆された。*S. pneumoniae* は菌体表層に複数の Plg 結合タンパク質を局在させ、宿主の Plg を結合させるとともにプラスミンへの変換を促進し、プラスミンを組織侵入や免疫回避に活用する可能性が考えられた。

P1-105

肺炎球菌プラスミノゲン結合タンパク群の遺伝子転写解析

○平山 悟¹, 土門久哲^{1,2}, 寺尾 豊^{1,2} (¹新潟大・院医歯・微生物, ²新潟大・院医歯・高口研セ)

Transcriptional analysis of pneumococcal plasminogen-binding proteins

○Satoru Hirayama¹, Hisanori Doman^{1,2}, Yutaka Terao^{1,2} (¹Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ²Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【背景】*Streptococcus pneumoniae* 感染マウスから肺胞洗浄液を採取し, *in vivo* で発現する同菌タンパクを MS/MS 同定した. その結果, 既報 3 種と新規 4 種(TpiA, ClpC, UvrC, SufC)のプラスミノゲン (Plg)結合タンパクが *in vivo* で発現していることを明らかにした. 同菌の Plg 結合タンパクは, 上述の感染時 *in vivo* サンプルから検出した 7 種とその他既知を合計し 13 種となった. 本研究では, 全 13 種の Plg 結合タンパク遺伝子のゲノム上での相関関係および発現特性等を解析した.

【方法】*S. pneumoniae* D39 株を THY 培地, および Plg やウシ胎児血清(FBS)添加 THY 培地で培養し, 菌の増殖を濁度測定により観察した. また, 経時的に菌体から RNA を抽出し, Real-time PCR により 13 種の Plg 結合タンパク遺伝子の各転写量を解析した.

【結果】THY 培地では, 13 種の Plg 結合タンパク遺伝子の各転写量は指数増殖期に増加後, 定常期に減少し, その後は一定量を保った. 転写量には遺伝子間で差があるが, いずれの遺伝子も共通のパターンを示した. Plg (1 µg/mL)添加群では, THY 培地と同様に指数増殖期・定常期に各転写量が増減したが, その後は緩やかに増加する傾向が観察された. FBS (10%)添加群では菌の増殖が促進され死滅が早まったため, RNA を抽出できた時間が限られたが, 各転写量の傾向は THY 培地と同様であった.

【考察】*S. pneumoniae* は, ゲノムが約 2 Mbp と小さいにも関わらず, 13 種もの Plg 結合タンパク遺伝子を保有している. その中には生育に必須な分子もあるが, 全てが恒常的に発現していると示された. 感染時の *S. pneumoniae* にとって, Plg を結合させること, および変換プラスミンを活用する重要性が示唆された.

P1-106

Mechanisms leading to epithelial cell barrier destruction by human *Leptospira* isolated in Okinawa

○柿田 徹也^{1,2}, トーマ クラウディア¹, Isabel Sebastian¹, Hunter Barbee¹, 山城 哲¹ (¹琉大・医・細菌学, ²沖縄衛研・感染症研究センター)

○Tetsuya Kakita^{1,2}, Claudia Toma¹, Isabel Sebastian¹, Hunter Barbee¹, Tetsu Yamashiro¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. of the Ryukyus., ²Res. Ctr. Infect. Dis., Okinawa Pref. Inst. Health and Env.)

Leptospira interrogans serovar Manilae has been shown to disrupt the adherens junctions (AJs) via the proteasomal degradation pathway leading to epithelial cell barrier destruction. This study aimed to clarify the infection mechanisms of renal proximal tubule epithelial cells (RPTECs) by human *L. interrogans* isolates from Okinawa (Oki strains). The transepithelial electrical resistance of 11 Oki strains evaluated in infected-RPTECs showed that all strains induced the epithelial cell barrier destruction. Further analysis of 2 strains (Oki53 and Oki65) by immunofluorescence and Western Blottings showed that they induced the mislocalization of the AJ proteins (E-cadherin and α -catenin), and disruption of the cytoskeleton (F-actin). Afadin, which is crucial for the localization of E-cadherin, α -catenin in AJs, and important to link F-actin to AJs was decreased in Oki65-infected RPTECs but not in Oki53-infected RPTECs. Proteasome inhibitors (MG132 and bortezomib) prevented the epithelial barrier disruption induced by Oki53, but this effect was partially achieved in Oki65-infected RPTECs. Furthermore, proteasomal inhibitors could not prevent the degradation of afadin induced by Oki-65. These findings suggested that Oki strains may have multiple strategies to disrupt the epithelial cell barrier: a proteasomal dependent pathway and a proteasomal independent pathway targeting afadin.

P1-107/FL2-03

アフリカツメガエルを用いたヒト病原性細菌感染モデルの確立

○栗生 綾乃¹, 石川 一也¹, 土屋 晃介², 古田 和幸¹, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬(薬)・分子生物学, ²金沢大・がん進展制御研・免疫炎症制御)

Establishment of an infection model of human pathogenic bacteria using *Xenopus* frog

○Ayano Kuriu¹, Kazuya Ishikawa¹, Kohsuke Tsuchiya², Kazuyuki Furuta¹, Chikara Kaito¹ (¹Lab. Mol. Biol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ²Div. Immunol. Mol Biol., Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ.)

細菌の病原性発現機構とそれに対抗する宿主動物の免疫システムを理解するためには, 感染モデル動物を使用した感染実験が必要不可欠である. 感染実験に頻繁に利用されるマウスなどの哺乳動物は, 倫理面とコスト面の問題から, 多数の個体数を扱うことが困難である. 本研究では, 多数の個体数を扱うことが可能で, 免疫システムがヒトと比較的近いアフリカツメガエルについて, ヒト病原性細菌の感染モデル動物として利用できるか検討を行った. 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌, リステリア・モノサイトゲネスの腹腔内注射により, 菌量依存的にアフリカツメガエルの生存率が低下した. 黄色ブドウ球菌および緑膿菌によるアフリカツメガエルの生存率の低下は, それぞれの細菌株に有効な抗菌薬を投与することで抑制された. さらに, 黄色ブドウ球菌の病原性に関わる *agr* 領域と *cvfA* 遺伝子, ならびにリステリア・モノサイトゲネスの病原性に関わる *LIPI-1* 領域の各欠損株は, アフリカツメガエルに対する病原性が低下していた. アフリカツメガエルにおける黄色ブドウ球菌の体内分布を検討したところ, 腹腔内注射後 30 分の時点で, 血液, 肝臓, 筋肉において黄色ブドウ球菌が検出され, 死亡時刻までそれぞれの臓器における細菌数が維持されていた. 以上の結果から, アフリカツメガエルはヒト病原性細菌の病原性遺伝子の評価や抗菌薬の有効性評価に使用可能な感染モデル動物であると考えられる. 本感染モデルは腹腔から全身へ細菌が拡散する敗血症を模擬していると考えられ, 敗血症における細菌と宿主の相互作用の研究において有用である.

P1-108

Effect of organoselenium compounds on the pathology of UC model mice

○久綱 僚, 富田 純子, 森 亮太, 河村 好章 (愛知学院大・薬・微生物)

○Ryo Kutsuna, Junko Tomida, Ryota Mori, Yoshiaki Kawamura (Dept. Microbiol., Sch. Pharm., Aichi Gakuin Univ.)

セレンは, 免疫機能の維持, 細胞の抗酸化作用, 抗炎症作用において重要な役割を果たす必須微量元素として知られている. そして, セレノシステインやセレノメチオニンなどの有機セレン化合物およびそれらを含有するセレノプロテインは, 潰瘍性大腸炎 (UC) を含む様々な疾患における研究対象となっている. 我々は以前, UC モデルマウス糞便中に増加する特定細菌を見出した. 分類学的精査解析により当該菌を *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* sp. nov. PAGU 1678^T として提案し, PAGU 1678 株のモデルマウスへの処理によって, マウス病態増悪への関与を証明した. 当該菌の病態増悪メカニズムを検討するため, モデルマウス病態軽減作用を有する近縁種と併せて全ゲノム解析を実施した. 我々はそこから見出された PAGU 1678 株に特徴的な有機セレン化合物の代謝能に着目した. 腸内細菌によるセレン化合物の代謝や, セレン濃度に応じた腸内細菌叢の菌種構成の変化に関するこれまでの報告をもとに, 有機セレン化合物を PAGU 1678 株による重症化マウスに補充し, 病態への影響について評価した. 適切な有機セレン化合物濃度は, マウス重症化の緩和に資することが明らかとなった. 一方, マウスにおいて動物内に存在しないセレノプロテイン発現も認められたことから, dysbiosis が生じた腸管内にて優位に存在する PAGU 1678 株が, 生体が利用し難いセレン代謝物を産生し, 免疫異常の是正や抗炎症作用を発揮できていないことを予想した. 腸内細菌構成と, 各細菌が産生するセレン代謝物の相関, その生体利用能を明らかにすることで, PAGU 1678 株の UC 重症化メカニズムの解明に繋げることができると考えている.

P1-109

歯周病患者で増殖している口腔内細菌群が潰瘍性大腸炎の重症度
に与える影響の検討

○池田 恵莉¹, 山口 雅也², 川端 重忠^{1,3} (¹阪大・院歯・微生物, ²医薬基盤・健康・栄養研, ³阪大・CiDER)

Oral bacteria associated with periodontitis attenuates inflammation of ulcerative colitis

○Eri Ikeda¹, Masaya Yamaguchi², Shigetada Kawabata^{1,3} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²NIBIOHN, ³CiDER. Osaka Univ.)

歯周病は歯の喪失の主原因となる慢性炎症性疾患である。歯周病原細菌が引き起こす過剰な免疫応答によって、自身の組織を破壊することが知られている。近年の研究から、口腔内細菌叢のディスバイオーシスが疾患に関与することが知られるようになり、歯周病原細菌以外の口腔内細菌にも着目が集まっている。歯周病は全身疾患との関与が知られており、その一つに炎症性疾患がある。炎症性疾患の一種である潰瘍性大腸炎は下痢や腹痛を繰り返す炎症性疾患である。マウスモデルでは、口腔内に歯周病原細菌を滞留させることで腸炎が悪化するという報告がある。ただ、その細菌の伝播メカニズムははっきりしていない。そこで、本研究では、口腔内細菌群が消化管経由で腸に到達した際の影響を検討することにした。デキストラン硫酸ナトリウム塩 (dextran sulfate sodium: DSS) 誘導性腸炎モデルを用いて実験を行う。著者らの先行研究から、歯周病で有意に増加する口腔内細菌群が同定されており、それらの菌を培養し混合物を DSS 腸炎マウスの消化管に投与した。腸炎の臨床的所見である体重減少、軟便、腸管からの出血を経時的に観察したところ、口腔内細菌を投与したマウスでは優位に腸炎が軽症化した。次に、マウスの腸内細菌叢を 16S rRNA によるメタゲノム解析で比較したところ、細菌叢には変化が認められなかった。以上のことから、消化管経由で腸に到達した口腔細菌は、腸炎を悪化させず、むしろ改善させる可能性が示唆された。

P1-110/FL2-04

***Prevotella intermedia* suppresses the release of IL-1β**

○笠井 満知子¹, 高濱 みゆき¹, 李 智媛¹, 庄子 幹郎², 内藤 真理子², 鈴木 敏彦³, 長谷部 晃¹ (¹北大・院・歯・微生物学, ²長崎大・歯・口腔病原微生物学, ³東京科学大・医歯・細菌感染)

○Machiko Kasai¹, Miyuki Takahama¹, Ji-Won Lee¹, Mikio Shoji², Mariko Naito², Toshihiko Suzuki³, Akira Hasebe¹ (¹Microbiology, Dept. Oral Pathobiological Science, Fac. and Grad. Sch. Dental Medicine, Hokkaido Univ., ²Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomedical Sci., ³Dept. Bact. Pathogenesis, Science Tokyo)

Pro-inflammatory cytokine IL-1β plays an important role in the progression of periodontitis. Therefore, the inflammasome, a mechanism that regulates the maturation and release of IL-1β, is thought to be a key factor in the pathogenesis of periodontitis. The increase in IL-1β is accompanied by the proliferation of periodontal pathogens, in periodontitis sites, and it has been suggested that periodontal pathogens trigger the activation of the inflammasome, which leads to the release of IL-1β. *Prevotella intermedia* is one of the pathogens involved in human periodontitis. However, little is known about the relationship between *P. intermedia* and the inflammasome. In this study, we investigated the effect of *P. intermedia* on the inflammasome using immortalized mouse macrophages in vitro. First, cells were stimulated with *P. intermedia* after priming with *E. coli*-derived LPS. It was found that there was no effect of *P. intermedia* on the amount of IL-1β and LDH induced in the cell culture supernatants. Next, cells were pre-treated with *P. intermedia*, primed with LPS and then stimulated with NLRP3 agonist. The amount of IL-1β in the culture supernatant was reduced in *P. intermedia* treated cells compared to non-treated cells. Thus, *P. intermedia* was found not to cause IL-1β production but rather to suppress it. This may suggest that *P. intermedia* has anti-inflammasome activity.

P1-111

ミツバチのヨーロッパ腐蛆病の原因菌が産生するチラミンの定量的検出系

○岡本 真理子¹, 高松 大輔^{1,2}, 上垣 隆一¹ (¹動衛研・農研機構, ²岐阜大院)

Quantitative detection method for tyramine produced by the European foulbrood pathogen of honeybees

○Mariko Okamoto¹, Daisuke Takamatsu^{1,2}, Ryuichi Uegaki¹ (¹NIAH, NARO, ²UGSVS, Gifu Univ.)

【背景】ヨーロッパ腐蛆病菌は、蜜蜂幼虫の細菌性感染症であるヨーロッパ腐蛆病の原因菌である。発症蜂群は巣箱ごと焼却処分する必要があることから、養蜂家にとって経済損失の大きい疾病である。国内の蜂群に広く蔓延している可能性があり、効果的な発症防除対策が求められるが、国内で分離頻度が高い強毒株の病原因子やそれによる発症機序については未だ明らかになっていない。ゲノム解析により細胞傷害活性を持つ腐敗アミンであるチラミンの合成遺伝子が本菌の病原因子候補の一つとして挙げられているが、生菌を用いたチラミン産生の証明は行われていない。そこで、本研究では LC-MS/MS を用いたチラミンの定量分析法を確立し、ヨーロッパ腐蛆病菌のチラミン産生能を調査した。【材料と方法】強毒株を液体培地で培養した培養上清 5μl、及びヨーロッパ腐蛆病菌感染・非感染の蜜蜂幼虫を滅菌水中で乳剤化した上清 15μl を検体として供試した。LC-MS/MS によるチラミンの検出では、重水素標識化チラミンを内部標準物質として用いることで、安定したチラミンの定量を実現した。【結果と考察】本法の定量限界は 3 ng/mL、回収率は 97%以上であった。強毒株培養上清中のチラミン濃度は、無菌の対照培地における平均チラミン濃度の約 5.8 倍である 128μg/mL に上昇したことから、強毒株はチラミン産生能を有することが明らかとなった。さらに、感染幼虫内では菌数に応じてチラミン濃度が増加しており、強毒株は幼虫内においてもチラミンを産生することが示された。今後、遺伝子組換えによりチラミン合成遺伝子を変異させたヨーロッパ腐蛆病菌株を作出し、感染試験を通してチラミンが持つ幼虫への影響を検証していく。

P1-112

***Prevotella intermedia* が口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響**

○高濱 みゆき^{1,2}, 笠井 満知子^{2,3}, 李 智媛², 庄子 幹郎⁴, 内藤 真理子⁴, 長谷部 晃¹ (¹北大・院歯・口腔顎顔面外科, ²北大・院歯・微生物, ³北大・院歯・矯正, ⁴長大・歯・口腔病原微生物)

The effect of *Prevotella intermedia* on oral squamous cell carcinoma cells

○Miyuki Takahama^{1,2}, Machiko Kasai^{2,3}, Ji-Won Lee², Mikio Shoji⁴, Mariko Naito⁴, Akira Hasebe² (¹Oral Maxillofacial Surgery, Grad. Sch. Den. Med., Hokkaido Univ., ²Microbiol., Grad. Sch. Den. Med., Hokkaido Univ., ³Orthodontics., Grad. Sch. Den. Med., Hokkaido Univ., ⁴Dept. Microbiol. Oral Infect., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

口腔内のグラム陰性偏性嫌気性桿菌である *Prevotella intermedia* は慢性歯周炎患者の歯周ポケットから分離される。歯周炎は代表的な慢性炎症性疾患であり、慢性炎症はがんの発生や増悪に関与することが報告されている。*P. intermedia* の存在量が口腔扁平上皮癌(OSCC)部位で有意に増加していることや大腸がんなど他のがんにも関与していることが報告されているが、*P. intermedia* による OSCC の発生や増悪のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では *P. intermedia* の口腔扁平上皮癌細胞への影響について明らかにすることを目的とし、まず、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-3 を *P. intermedia* により刺激し、CCK-8 アッセイにより細胞増殖に及ぼす影響を検討した。予備実験において、意外なことに *P. intermedia* 感染群は非感染群と比較して細胞増殖が抑制されるというデータが得られた。このデータはこれまでの報告と矛盾する可能性があるが、我々は *P. intermedia* がマクロファージにおけるインフラマソームの活性化を抑制し、IL-1β 産生を抑制することを示唆するデータも得ていることから、*P. intermedia* が HSC-3 の増殖を抑制する可能性があると考えられた。そこで、*P. intermedia* が口腔がん細胞を増殖または抑制させるのか、抑制させるのであればそれに関わる物質は何であるのかなどを *P. intermedia* の野生株ならびに 9 型分泌系(T9SS)欠損株である porK および porT を用いて明らかにすることとした。実際に *P. intermedia* 感染が OSCC において細胞増殖を抑制することが確認されたため、HSC-3 におけるスクラッチアッセイ、Cell Cycle Assay や上皮間葉転換に及ぼす影響なども併せて報告する。

P1-113/FL2-05

Aggregatibacter actinomycetemcomitans-derived EVs promote pancreatic cancer malignancy

○山口 雄大¹, 塩田 正之², 中尾 龍馬¹, 安部 公博¹, 明田 幸宏¹ (¹国立感染症研究所・細菌第一部・第六室, ²大阪公立大・医・分子制御生物学)

○Takehiro Yamaguchi¹, Masayuki Shiota², Ryoma Nakao¹, Kimihiro Abe¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Mol. Bio. Med., Grad. Sch. Med., Osaka Metropolitan Univ.)

Infection of periodontopathic bacteria, especially *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), correlates with pancreatic cancer (PAC) development. However, the detailed mechanisms by which these bacteria induce PAC development remain unclear. This study focused on the periodontopathic bacteria-derived extracellular vesicles (EVs), which may mediate the mechanism, and investigated the role of the EVs in the malignant transformation of PAC cells. When comparing different EVs from Pg, Fn and Aa, Aa-derived EVs (Aa-EVs) were found to induce cellular migration and invasion via cytolethal distending toxin (CDT)-mediated DNA damage. Aa-EVs-derived CDT also enhanced the activation of ERK1/2 and Akt, downstream of the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway, but not that of SMAD2/3, downstream of the transforming growth factor beta signaling pathway. Inhibitions of ERK1/2 and Akt attenuated the enhancement of cellular migration by Aa-EVs. Altogether, Aa-EVs induce malignant transformation of PAC cells via activation of the EGFR signaling pathway. Our results may provide a rationale for the applicability of EGFR-targeting molecular therapy against PAC associated with Aa infection.

P1-114

Klebsiella pneumoniae が放出する菌体外微粒子の遠隔臓器への移行生と生物活性

椿 翔吾¹, 今井 仁², 田中 里佳³, 酒井 大輔⁴, 松崎 潤太郎⁵, 津々木 博康⁶, 澤 智裕⁶, ○津川 仁¹ (¹東海大医・生体防御・生物界間シグナル解析, ²東海大医・健康管理, ³東海大医・生体防御・免疫, ⁴東海大医・整形外科, ⁵慶應大薬・薬物治療, ⁶熊本大・院・微生物)

Biological impacts of Klebsiella pneumoniae-derived extracellular vesicles

Shogo Tsubaki¹, Jin Imai², Rika Tanaka³, Daisuke Sakai⁴, Juntaro Matsuzaki⁵, Hiroyasu Tsutsuki⁶, Tomohiro Sawa⁶, ○Hitoshi Tsugawa¹ (¹Transkingdom Signaling Research Unit, Tokai Univ., ²Dept. Clin. Health Sci., Tokai Univ., ³Dept. Immunol., Tokai Univ., ⁴Dept. Orthop. Surg., Tokai Univ., ⁵Div. Pharmacother., Keio Univ., ⁶Microbiol., Kumamoto Univ.)

細菌は菌体外微粒子 (Bacterial extracellular vesicles: bEVs) と呼ばれる二重膜構造の菌体外微粒子を放出する。放出される bEVs 内には、蛋白質、DNA、RNA といったあらゆる細菌成分が内包されており宿主細胞内への運搬体として機能する。Klebsiella pneumoniae は消化管内の共生菌であるが、高齢者を中心に肺や肝臓など遠隔臓器で感染巣を形成し疾患の発症起点となる。本研究では、K. pneumoniae が放出する bEVs (KpEVs) に注目し、その遠隔臓器への移行性と疾患発症起点となり得る生物活性について評価した。KpEVs を尾静脈投与及び経口投与したマウスを用いて、KpEVs の集積臓器を *in vivo* イメージングで解析すると、KpEVs の肝臓・肺・背骨への特異的な集積性を認めた。そこで、KpEVs の背骨への集積が疾患発症起点となりうるかを評価するために、マウス骨髄細胞から破骨細胞及び骨芽細胞をそれぞれ分化誘導し初代培養細胞として確立し、KpEVs を暴露させた。KpEVs 刺激により破骨細胞はカルシウム吸収能が有意に低下し細胞死が誘導された。一方、KpEVs 刺激した骨芽細胞では、細胞増殖能と細胞生存性が亢進し、さらに骨芽細胞マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) の染色性も増強した。加えて、KpEVs 刺激した骨芽細胞ではアリザリンレッド染色性の有意な亢進が認められ、KpEVs 刺激により骨芽細胞内でのカルシウム沈着の増強が示された。これらの結果は、KpEVs は破骨細胞を選択的に排除し骨芽細胞の機能は増強させることを明らかにした。つまり KpEVs は破骨細胞と骨芽細胞に対して相反する生物活性を発揮し、骨代謝バランスを崩壊させると推察される。

P1-115

Galleria mellonella 感染モデルを用いた大腸菌 ST131 の病原性の比較

○鮎川 智紀, 土井 洋平, 鈴木 匡弘 (藤田医科大・医・微生物)

Virulence of Escherichia coli ST131 based on Galleria mellonella assay

○Tomoki Ayukawa, Yohei Doi, Masahiro Suzuki (Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ.)

【はじめに】大腸菌 ST131 は尿路感染症や血流感染症の起炎菌である。また、ESBL 産生大腸菌の代表的なクローンであり、多剤耐性大腸菌の蔓延を助長するとして世界的に問題となっている。大腸菌 ST131 は *fimH* 対立遺伝子に基づいて A, B, C の 3 つの clade に分類される。中でも clade C の分離頻度が最も高く、clade A や clade B よりも多剤耐性傾向を示すことが知られている。大腸菌 ST131 clade C が世界的に蔓延している要因として、多剤耐性獲得による負荷が十分低くなる要因の存在が予想される。そこで、「clade C の多剤耐性獲得能に対して代償的に病原性は弱くなる」という仮説を立て、*Galleria mellonella* 幼虫を用いて、clade による病原性評価を行った。【対象と方法】藤田医科大学病院およびその他の医療機関より収集された 45 株の大腸菌 ST131 (clade A : 13 株, clade B : 3 株, clade C : 29 株) を対象とした。1 株あたり 10 匹の *G. mellonella* を使用し、約 2.0×10^8 CFU/mL の菌液を 10 μ L 接種し、接種後 4 日間、24 時間ごとに *G. mellonella* の生存数を判定した。【結果と考察】clade C とその他の clade に分けてカプランマイヤー曲線を描き、ログランク検定によって比較したところ、clade C の *G. mellonella* に対する病原性は有意に弱いことが認められた。このことは、clade C の多剤耐性獲得能と病原性との関連を示唆するものである。今後、*G. mellonella* アッセイに基づく病原性ラベルと各菌株のゲノム情報を用いた機械学習によるさらなる解析を進めることで、大腸菌 ST131 の病原性に関与すると考えられる遺伝的な要因の探索を目指す。

P1-116

Salmonella enterica serovar Typhimurium 野外分離株による分泌タンパク質の産生の違いと病原性の関連性

○橘 紅李, 中山 ももこ, 西川 明芳, 江口 正浩 (農研機構・動衛研・動物感染症研究領域)

Relation of secretory proteins and virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium wild strains

○Akari Tachibana, Momoko Nakayama, Sayaka Nishikawa, Masahiro Eguchi (Div. Infect. Animal Dis. Res., NARO, NIAH)

【背景・目的】サルモネラ属菌は、2,600 種類以上の血清型に細分されるグラム陰性桿菌である。ヒトや家畜にサルモネラ属菌が感染すると、急性敗血症や慢性的な下痢症を含むサルモネラ症が起こる。サルモネラ属菌は、家畜やヒトに感染し、病原性 (サルモネラ症) を示す。サルモネラ属菌が宿主に感染すると、宿主内で生存、増殖をするために必要な様々な分泌タンパク質を産生することがわかっている。本研究では、野外分離株を用いて、サルモネラ属菌が菌体外に分泌するタンパク質の比較と病原性の違いについて検証した。

【方法】家畜から分離された *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) が培養上清中に分泌するタンパク質を SDS-PAGE にて比較検証した。次に、BALB/c マウス (6 週齢) に上記の株を経口感染させ、株間における病原性の違いを検証した。さらに感染後の各組織から菌を分離し、菌が産生するタンパク質の発現状態を比較検証した。

【結果および考察】*S. Typhimurium* のマウスに対する病原性および菌が産生する分泌タンパク質を検証したところ株間により病原性および産生する分泌タンパク質が異なることを明らかにした。さらに、感染後の各組織から菌を分離し、菌が産生する分泌タンパク質の発現状態を検証したところ、病原性の違いにより分泌するタンパク質が異なることを明らかにした。現在、*S. Typhimurium* を BALB/c マウスに経口感染させ半致死量を算出し病原性の違いについて詳細に解析中である。また、産生する分泌タンパク質について病原性とどのような相関があるのかを検証中である。

P1-117/FL2-06

Genomic characteristics of *P. alcalifaciens* isolates causing a large foodborne outbreak in Japan

○Jayedul Hassan^{1,2,3}, 松田 重輝¹, 石井 英治¹, 飯田 哲也¹ (¹阪大・微研・細菌感染, ²JSPS, ³Dept. Microbiol. Hyg., Bang. Agric. Univ.)

○Jayedul Hassan^{1,2,3}, Shigeaki Matsuda¹, Eiji Ishii¹, Tetsuya Iida¹ (¹Dept. Bact. Infect., RIMD, Osaka Univ., ²JSPS, ³Dept. Microbiol. Hyg., Bang. Agric. Univ.)

Providencia alcalifaciens, a member of the family *Morganellaceae*, was associated with a large foodborne outbreak in Fukui, Japan, in 1996. Our previous study had shown that the outbreak strains uniquely carried a large plasmid, which is associated with the invasiveness and diarrheagenicity of this bacterium. However, the mechanisms underlying this pathogenicity remain unknown. In this study, we investigated the genomic features of three representative outbreak isolates through whole-genome sequencing. The outbreak strains carried one chromosome (~3.8 Mb) and a large plasmid (~168 kb). In addition, two strains carried a small plasmid of ~50 kb. All three strains carried two type III secretion system (T3SS) gene clusters, one on the chromosome and another on the large plasmid, while no discernible virulence factors were found on the small plasmid. Comparative genomic analysis with other *Providencia* species revealed that the chromosomal T3SS is ubiquitous in *Providencia*, but the plasmid-encoded T3SS is distributed only in a subset of *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* associated with clinical cases in humans and animals. We also provide experimental evidence for the critical role of the plasmid-encoded T3SS in the invasiveness and diarrheagenicity of the *P. alcalifaciens* outbreak strain, and the evolution and potential spread of the large plasmid in *Providencia* will be discussed.

P1-118

Campylobacter jejuni activates host amino acid transporters to enhance intracellular survival

○下畑 隆明^{1,2}, 福島 志帆², 木戸 純子², 牧本 真奈^{1,2}, 上番増 喬², 馬渡 一諭², 高橋 章² (¹福井県大・海洋生物資源, ²徳島大・院医歯薬学研究所・予防環境栄養)

○Takaaki Shimohata^{1,2}, Shiho Fukushima², Junko Kido², Mana Makimoto^{1,2}, Takashi Uebanoso², Kazuaki Mawatari², Akira Takahashi² (¹Marine-Bio, Fukui Prefectural Univ., ²Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch.)

Background: *Campylobacter jejuni* has a unique energy metabolism which uses amino acids for energy metabolism, because of limited ability to metabolize sugars with the absence of phospho-fructokinase. Thus, it suggests that intracellular amino acids are useful nutrients for intracellular *C. jejuni*, and are closely associated with bacterial survival in host cells. In this study, we estimated the host amino acid content in *C. jejuni*-infected cells and the activity of amino acid transporter in the survival of intracellular bacteria in the host epithelial cells. **Methods:** HeLa cells and Caco-2 cells were infected with *C. jejuni* (NCTC11168) and host amino acid were analyzed by capillary electrophoresis mass spectrometry in infected cells. Gentamicin protection assay was used for estimating the survival rate of *C. jejuni* in the host epithelial cells. **Results and Discussion:** The amino acid levels were increased in *C. jejuni*-infected cells. Moreover, supplementation of amino acids increased amino acid level and bacterial survival in the *C. jejuni*-infected cells. Also, amino acids transporter was activated and was closely associated with the survival of *C. jejuni* in the host epithelial cells. Therefore, our results suggest that *C. jejuni* activate amino acid transporter to facilitate bacterial survival in the host epithelial cells.

P1-119

エネルギー代謝を標的としたカンピロバクター感染症の制御

○細見 晃司^{1,2}, 畑中 律敏¹, 日根野谷 淳¹, 足立 淳², 長竹 貴広³, 山崎 伸二¹, 國澤 純² (¹大阪公立大, ²医薬基盤・健康・栄養研究所, ³明治大)

Control of *Campylobacter jejuni* infection by targeting energy metabolism

○Koji Hosomi^{1,2}, Noritoshi Hatanaka¹, Atsushi Hinenoya¹, Jun Adachi², Takahiro Nagatake³, Shinji Yamasaki¹, Jun Kunisawa² (¹Osaka Metropolitan Univ., ²NIBIOHN, ³Meiji Univ.)

下痢や急性胃腸炎などを引き起こす消化器感染症は国内外における公衆衛生上の重要課題である。カンピロバクターは主要な原因病原体の1つであるとともに、急性胃腸炎に併発してギラン・バレー症候群などの自己免疫性神経疾患を引き起こすことが国際的な課題となっている。本研究ではカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) に特異的な抗体を作製し、エネルギー代謝に関わる menaquinol cytochrome c reductase complex QcrC と病原性の関連を明らかにした。本抗体は急性胃腸炎患者分離株を含む血清型や由来が異なる *C. jejuni* 株に反応し、一方で、*C. coli* や *C. fetus* を含む近縁種や同属種には反応しなかったことから、*C. jejuni* に特異的な抗体であると考えている。免疫沈降やプロテオーム解析から、本抗体の認識抗原は菌の呼吸に関わる QcrC であると同定し、機能解析から *C. jejuni* の酸素呼吸を阻害、増殖を抑制することを明らかにした。さらに、本抗体を研究ツールとして用いた検討から、菌の培養条件の違いによって QcrC の発現量、エネルギー代謝活性、病原性が連動して変化することが明らかになった。すなわち、血液寒天培地に比べてボルトン液体培地で培養すると、*C. jejuni* における QcrC の発現とエネルギー代謝活性が上昇した。さらに、ボルトン液体培地で培養した *C. jejuni* をマウスに経口感染させたところ、炎症マーカーとして便中のミエロペルオキシダーゼ活性が上昇し、大腸における好中球の浸潤や上皮バリアの崩壊など腸炎が誘導された。これらの知見はカンピロバクター感染症に対するマウス腸炎誘導モデルの確立や、QcrC を介したエネルギー代謝を標的とした感染制御の可能性を提示すると考えている。

P1-120/FL2-07

Optimizing Phage Production: Streamlined Propagation and Purification for Enhanced Phage Therapy

○Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thititananpakorn, 相羽 由詞, Tan XinEe, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍珠 (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Kanate Thititananpakorn, Yoshifumi Aiba, Tan XinEe, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Bacteriophages (phages) are viruses that specifically target bacteria, causing cell lysis by injecting their genetic material. While phage therapy declined in the West with the advent of antibiotics, it persisted in the East and is now regaining global attention due to rising antibiotic resistance. However, challenges in standardizing phage production and purification hinder their clinical use, with experimental and technical stresses potentially affecting phage recovery. In this study, we aimed to produce therapeutic-grade phages with minimal impurities by optimizing the propagation and purification of engineered OVA peptide-displaying phages, developed for immunological studies. Using plate propagation, phage titers of 10^{11} to 10^{13} PFU/ml were achieved. Purification involved PEG precipitation, 0.2µm filtration, and 100kDa MWCO membrane filtration to remove host toxins, proteins (e.g., hemolysins, LTA), nucleic acids, and any reagent-sourced LPS monomers, if any. Post-purification ultracentrifugation concentrated the phages, which were then analyzed for contaminants, confirming purity. Toxicity assays, pyrogen profiling, and pro-inflammatory cytokine release tests on cell lines showed no harmful effects. Our approach successfully produces high-purity phages with optimized yields, making them suitable for in vivo applications and advancing phage therapy.

P1-121

FRET 法を用いた破傷風毒素の *in vitro* 検出法の開発

○金 玄, 見理 剛, 妹尾 充敏 (感染研・細菌第二部)

The development of Tetanus Toxin detection methods *in vitro* using a FRET

○Hyun Kim, Tsuyoshi Kenri, Mitsutoshi Senoh (BacteriologyII, National Institute of Infectious Diseases)

ワクチンなどの生物学的製剤の品質管理試験には多くの実験動物が使われている。動物愛護の観点などから 3Rs: Reduction (動物数の削減), Refinement (苦痛の軽減), Replacement (代替法への移行) が国際的に強く求められている。現在、破傷風トキソイドは安全性 (無毒化) を確認するため、モルモットを用いて毒素活性の消失を評価している。本研究では、代替法への移行を果たすことを目的とし、蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) を利用した破傷風毒素 (TeNT) 活性の *in vitro* 測定系の開発を進めている。TeNT は亜鉛依存性エンドペプチダーゼであり、抑制性ニューロンにおいて、基質である VAMP2 (Vesicle Associated Membrane Protein 2) を特異的に切断する。本研究において、human VAMP2 全長もしくは一部の N 末端にドナー蛍光分子としてシアン蛍光蛋白質 (eCFP)、C 末端にアクセプター蛍光分子として黄色蛍光蛋白質 (Venus) を結合した蛍光基質蛋白質を構築した。得られた蛍光基質蛋白質では、FRET 現象が認められたこと、また、TeNT を作用させることで 2 つの断片を生じ、FRET が消失することを確認した。さらに、感度を高めるため、デザインを改良した様々な蛍光基質蛋白質を構築、評価した。現在、品質管理試験での適用を目指し、検討を進めている。

P1-122

Development of Targeted Phage Particles for DNA Vaccine Delivery

○劉 怡, ヴィーラナラヤナン スリワニ, 相羽 由詞, タン シンイー, 宮永一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Yi Liu, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Vaccination is a method to prevent illness by establishing active acquired immunity via stimulation of immune system using antigens derived from infectious agents. Bacteriophages (phages), viruses that specifically infect bacteria, have been recognized for their safety, cost-effectiveness, and versatility in medical applications. The inherent immunogenicity of phage structures and DNA positions them as promising vaccine vectors for antigen delivery. Ovalbumin (OVA), the primary protein in egg white, serves as a model antigen for assessing experimental vaccine delivery systems. Here, we developed a Staphylococcal aureus phage-based DNA vaccine delivery platform and utilized OVA to evaluate its effectiveness. Firstly, integrase encoding gene was deleted to prevent integration into host bacteria ensuring safety. Next, immune cell targeting peptides were displayed on phage capsids. The efficacy of targeting the immune cells were investigated using antigen presenting cells. The targeted phage particles exhibited better internalization in target cells compared to controls indicating immune-cell targeted vaccine delivery is feasible. Currently, we work on loading OVA-encoding mammalian expression cassettes into the targeted phages. This approach aims to develop a targeted, phage-based DNA vaccine delivery system that enhances immune response specificity and effectiveness.

P1-123

Development of a Plug-and-Display vaccine using *Bacillus subtilis* membrane vesicles

○若林 丈人¹, 安部 公博², 中尾 龍馬², 山口 雄大², 佐藤 勉¹, 明田 幸宏² (1法政大・院理工・生命機能, 2感染研・細菌1)

○Takehito Wakabayashi¹, Kimihiro Abe², Ryoma Nakao², Takehiro Yamaguchi², Tsutomu Sato¹, Yukihiro Akeda² (1Grad. Sch. Sci. Eng., Hosei Univ., 2Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

Background: Many bacteria release membrane vesicles (MVs) with diameters of 20-400 nm into the external environment. Bacterial MVs have immunogenicity and adjuvanticity, and therefore they are utilized for vaccine development. This study aims to develop a safe vaccine platform using MVs derived from the non-pathogenic Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

Methods: We developed a "Plug-and-Display type" vaccine by decorating the surface of the *B. subtilis* MVs with recombinant antigen proteins. A scaffold protein, comprising of five tandem repeats of Dog Tag, was bioconjugated to the MVs, and then attached with a fusion protein of Dog Catcher and mScarlet-I (a model antigen) via an isopeptide bond formation between Dog Tag and Dog Catcher. The resulting MV vaccine was three times administered intranasally to mice before serum and saliva were collected. Production of anti-mScarlet-I antibodies was evaluated by ELISA.

Results and Discussion: ELISA revealed that intranasal administration of the MVs vaccine promoted the production of IgG and Siga against mScarlet-I. In contrast, the immunogenicity of the backbone of the MV vaccine was much lower than the antigen moiety. These results may suggest that our MV vaccine is versatile for various antigens. Future studies will focus on developing MVs vaccines against pathogenic bacteria.

P1-124

Characterization of immune responses against nasal *Staphylococcus aureus* membrane vesicles

○瀧澤 智美, 齋藤 真規, 泉福 英信 (日大・松戸歯・感染免疫)

○Tomomi Hashizume-Takizawa, Masanori Saito, Hidenobu Senpuku (Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

Previously, we showed that the nasal immunization of membrane vesicles derived from *Staphylococcus aureus* elicited *S. aureus* MV-specific antibody responses in the system and mucosal surface. Thus, in this study, we characterized the immune responses induced by nasal immunization with *S. aureus* MVs. BALB/c mice were nasally immunized with *S. aureus* MVs three times at three- and two-weeks intervals. Two weeks after the last immunization, the splenocytes were prepared from immunized mice and cultured with MVs. The trend analysis of cytokine production in culture supernatants revealed that IFN- γ , Th1-type cytokine, but not IL-4, Th2-type cytokine was significantly produced from splenocytes re-stimulated with MVs. These results suggest that cellular immunity might be dominantly induced by vaccination employing insoluble and solid MV antigen. The total IgGs were purified from serum from immunized mice. The analysis of neutralizing activity showed that the total IgGs aggregated *S. aureus*. This indicated that the total IgGs included specific antibodies to bacterial cell surface. Lipoteichoic acid (LTA)-specific ELISA showed that LTA-specific IgG antibodies were elicited in mice given nasal *S. aureus* MVs. These results suggest that the membrane vesicles secreted from *S. aureus* might contain LTA, the component of cell wall of *S. aureus*.

P1-125

Nasal vaccine using *E.coli* MVs displaying pneumococcal capsule confers long-term protective immunity

○中尾 龍馬¹, 木村 聡一郎^{2,3}, 安部 公博^{1,4}, 山口 雄大¹, 黒田 英介⁵, 濱口 重人⁵, 館田 一博³, 成澤 直規⁶, 大西 真¹, 明田 幸宏¹ (¹感染研・細菌¹, ²湘医大・薬・感染制御, ³東邦大・医・微生物感染, ⁴感染研・治療薬ワクチン開発, ⁵阪大・病・感染制御, ⁶日大・生物資源・食品資源)

○Ryoma Nakao¹, Soichiro Kimura^{2,3}, Kimihiro Abe^{1,4}, Takehiro Yamaguchi¹, Eisuke Kuroda⁵, Shigeto Hamaguchi⁵, Kazuhiro Tateda³, Naoki Narisawa⁶, Makoto Ohnishi¹, Yukihiro Akeda¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Div. Infect. Prevent. Cont., Fac. Pharm Sci., Shonan Univ Med Sci., ³Dept. Microbiol. Infect. Dis., Fac. Med., Toho Univ., ⁴Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁵Div. Infect. Cont. Prevent., Osaka Univ. Hosp., ⁶Dept. Food Biosci. Biotech. Col. Biores. Sci., Nihon Univ.)

Membrane vesicles (MVs) are bacteria-derived nanoparticles with potent adjuvanticity, which may build both systemic and mucosal immunity. Here we investigated whether the injected or intranasal MV vaccine elicited protective immune responses using a probiotic *E. coli*-derived MV chimera that displayed serotype-14 pneumococcal capsular polysaccharide. Nasal MV vaccine elicited potent IgG responses in blood and lung in mice, which were comparable or significantly superior to those of the injected MV vaccine or two currently licensed pneumococcal vaccines (conjugate-type and polysaccharide-type), respectively. IgA class-switch recombination occurred only in the intranasal MVs group, in which robust secretory IgA (SIgA) responses were induced in the eyes, oral cavity, and upper/lower respiratory tract even at the age of more than 14 months. Opsonophagocytic activities were detected in sera of all immunization groups. However, only the intranasal MV vaccine achieved pneumococcal clearance in the nasal cavity. Nevertheless, the intranasally MV-vaccinated pIgR-/- mice, which were genetically impaired for SIgA production, failed to clear pneumococci, suggesting the importance of nasal SIgA in the clearance. Taken together, the present study illustrates a promising MV vaccine platform to achieve sterilizing immunity via SIgA-dependent protection against respiratory tract pathogens.

P1-126

The effects of *Monascus* Fermented Rice Extract on the pathogenicity of toxigenic *Vibrio cholerae*

○山城 哲¹, 許 駿¹, 金城 麗菜², 金城 朱似乃², 石原 圭一郎², Alfi Rashid³, 橘 信二郎² (¹琉球大・院医・細菌学, ²琉球大・院農, ³icddr, b)

○Tetsu Yamashiro¹, Jun Xu¹, Rena Kinjo², Aino Kinjo², Kei-Ichiro Ishihara², Alfi Rashid³, Shinjiro Tachibana² (¹Dept. Bacteriol. Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, ²Grad. Sch. Agri., Univ. Ryukyus, ³icddr, b)

Monascus species are filamentous fungi widely used in fermented foods, natural colorants, and food preservatives. While certain metabolites of *Monascus* spp. have been reported to confer health benefits in humans, limited studies exist on their effects on pathogenic bacteria and their virulence factors. In this study, we demonstrate the impact of *Monascus* spp. fermented rice extracts (MFRE) on the major virulence factors of a toxigenic *V. cholerae* strain. When CTx production was induced in the *V. cholerae* O1 El Tor strain N16961 cultured in AKI medium with MFRE under AKI-SW conditions, the CTx concentration in the MFRE-treated culture was significantly reduced compared to the control. MFRE was separated into five fractions based on polarity differences. Among them, Fraction 4 (Fr. 4) resulted in a 16-fold reduction in CTx concentration in the culture supernatant compared to the control. The effects of MFRE on CTx bioactivity against animal cell lines were evaluated using the CHO cell elongation index (CEI) and the intracellular cAMP assay. In both assays, MFRE markedly reduced CTx activity in a dose-dependent manner. Additionally, the exceptional motility of N16961 was inhibited in the presence of MFRE. In this presentation, we will further discuss some of the underlying mechanisms responsible for these observations.

P1-127/FL2-08

Phage-Based DNA Vaccine Development Using mEmerald Gene as Proof of Concept

○Vivekanandan Palaninathan, 劉 怡, Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, 相羽 由詞, XinEe Tan, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Vivekanandan Palaninathan, Yi Liu, Myat Thu, Srivani Veerananarayanan, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

DNA vaccines use a small DNA segment to elicit an immune response, offering safety and effectiveness. Unlike traditional methods that use human viral vectors, which often have low cell-targeting specificity, potential side effects, and complex production processes, bacteriophages offer a viable alternative as DNA vaccine vectors. In particular, "non-replicating phages" are safer due to their inability to replicate in bacteria, reducing horizontal gene transfer risks. They enhance the immune response without chemical adjuvants, making them ideal for long-term immunity. Additionally, phages are cost-effective for large-scale production and stable under adverse conditions, positioning them as a potential solution for global health crises and paving the way for a cold-chain-free phage capsid vaccine. Currently, we are developing a proof-of-concept phage DNA vaccine incorporating the mEmerald gene. Using a synthetic approach, we integrated the mEmerald reporter gene into the phage genome and constructed a mammalian expression vector containing 1.5 kb of the fluorescent protein gene. This process resulted in multiple plaques after successful phage reactivation. PCR confirmed the integration of the foreign gene, and flow cytometry showed that 17% of cells treated with mEmerald-phage expressed the reporter gene after 96 hours, providing a proof of concept for the DNA vaccine.

P1-128/FL2-09

***Clostridioides difficile* 由来メンブレンベシクルの産生機構と免疫原性**

○勇 陽太郎¹, 奥田 真由¹, 野村 暢彦^{2,4}, 尾花 望^{3,4} (¹筑波大・理工情報生命・生命地球科学, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・医学医療系・TMRC, ⁴筑波大・MICS)

The production mechanism and immunogenicity of membrane vesicles from *Clostridioides difficile*

○Yotaro Isamu¹, Mayu Okuda¹, Nobuhiko Nomura^{2,4}, Nozomu Obana^{3,4} (¹Sch. Sci. Tech., Life Ear. Sci., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ., Sci. Univ. Tsukuba, ³TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, ⁴MICS, Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を能動的に産生し、細胞外に放出する。MV は多様な菌体由来成分を積載し、宿主免疫調節能を有することが知られている。当研究室の先行研究より、MV の鼻腔接種によって、MV 由来菌特異的な腸管分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されることが明らかになった。本研究では、*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) に着目して、*C. difficile* 由来 MV を用いた宿主免疫調節系の確立を目的とし、MV の免疫が CDI の予防効果を有するかを検証した。いくつかのグラム陽性菌ではホリンエンドリシン (HE) 遺伝子の発現が MV 産生を誘導することが知られている。そこで、*C. difficile* の HE 誘導発現株を構築し、様々な培地条件と HE 発現が MV 産生及び性状に与える影響を検証した。その結果、HE が *C. difficile* においても MV 産生誘導因子であること、培養条件や HE が MV の構成物や粒径を変化させることが明らかになった。次に、MV 鼻腔接種による宿主免疫誘導能を評価するため、各培養条件の *C. difficile* 由来 MV をマウス鼻腔に接種した。その結果、血清、便中、唾液液中において *C. difficile* 特異的な IgG および IgA 産生が確認された。特に HE 誘導条件の MV を用いた場合には、血清中の抗体量が増加した。さらに、MV 鼻腔接種マウスに *C. difficile* を感染させたところ、腸管中の *C. difficile* 芽胞量が MV 接種群で速やかに減少した。本研究によって *C. difficile* の MV 産生機構の一端が明らかになるとともに、MV の鼻腔免疫が CDI の重篤化を予防する可能性が示された。

P1-129

百日咳菌外膜小胞と無細胞ワクチンの混合液を抗原とした経鼻ワクチンによる免疫応答

石川 青空¹, 朝山 慧^{1,3}, 坂本 玲奈^{1,3}, 中尾 龍馬², 鈴木 忠樹¹, 田村 浩二³,
○相内 章¹ (¹感染研・病理, ²感染研・細菌二, ³東理大・生シス)

Immune responses induced by nasal vaccine of aP with OMVs derived from Bordetella Pertussis

Sora Ishikawa¹, Kei Asayama^{1,3}, Rena Sakamoto^{1,3}, Ryoma Nakao², Tadaki Suzuki¹, Koji Tamura³, ○Akira Aina¹ (¹Dept. Pathology, NIID, ²Dept. Bact 2, NIID, ³TUS. BioSys)

【背景と目的】百日咳は、*Bordetella pertussis* の感染で引き起こされる急性呼吸器感染症である。多くの国では、日本が開発した無細胞ワクチン (Acellular pertussis vaccine; aP) が使用されている。aP は百日咳毒素 (PT) と繊維状赤血球凝集素 (FHA) の 2 つの主要な抗原を含んでおり、発症予防効果が認められている一方で、感染防御においては効果が不十分であることが指摘されている。また、現行のワクチンでは Th2 主体の免疫応答が誘導されるのに対し、百日咳菌感染では Th1 ならびに Th17 主体の応答が誘導され、上気道における感染の防御には Siglec-F 陽性の好中球が寄与する可能性が報告されている。多様な膜タンパク質を百日咳菌から放出される外膜小胞 (outer membrane vesicles; OMVs) で補い、自然感染を模倣するように接種経路を鼻腔内への経鼻接種に変更することで、全身性の IgG 抗体に加えて百日咳菌の侵入・感染の場である気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導できると考えられる。そこで本研究では、aP と百日咳菌由来の OMVs の混合液 (aP+OMVs) を抗原とした経鼻ワクチンによる免疫応答の解析を行い、新たな百日咳ワクチンの可能性について検討した。【方法と結果】C57BL/6 マウスを用いて、aP 皮下接種、aP+OMVs の皮下あるいは経鼻接種で誘導される抗体応答ならびに Th17 応答を検討した。aP+OMVs の経鼻接種は上気道粘膜上に線毛 2 型とパータクチンに対する IgA 抗体を誘導し、鼻腔における感染制御に重要な Th17 および Siglec-F+好中球を多く誘導した。さらに百日咳菌ワクチン株と臨床分離株を用いた感染実験では鼻および肺のコロニー形成を有意に抑制し、このことから感染防御効果を示唆した。

P1-130/FL2-10

枯草菌で刺激された樹状細胞による Th17 細胞誘導機構の解析

○古田 和幸¹, 樗木 洋平¹, 石川 一也¹, 三好 伸—^{2,3}, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬・分子生物, ²岡山大・院医歯薬・環境生物薬学, ³岡山大・腸健康科学研究センター)

Analysis of mechanism of Th17 cell induction by dendritic cells stimulated with Bacillus subtilis

○Kazuyuki Furuta¹, Yohei Chishaki¹, Kazuya Ishikawa¹, Shin-Ichi Miyoshi^{2,3}, Chikara Kaito¹ (¹Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

樹状細胞は取り込んだ細菌などに由来するペプチドを T 細胞に提示することで、T 細胞の分化と活性化を誘導し、病原細菌排除の免疫応答や、腸内細菌に対する寛容を誘導する役割を持つ。枯草菌は土壌などに広く存在するグラム陽性細菌であるが、毒素を持たず病原性が低いいため、免疫系を適度に活性化するプロバイオティクスへの応用も期待されている。一方で、枯草菌の樹状細胞に対する直接的な作用は十分には明らかではない。そこで、本研究では、枯草菌の樹状細胞機能に対する作用を解析した。樹状細胞株 DC2.4 細胞を枯草菌で刺激すると、抗原提示関連分子である CD80, CD86, PD-L1 の細胞表面発現の上昇がみられた。枯草菌刺激した DC2.4 細胞をリンパ節の細胞と共培養すると、IL-17 の産生が誘導されたため、ナイーブ T 細胞の Th17 細胞への分化が誘導されていると考えられた。ペプチドクリカン (PGN) 受容体である TLR2、および TLR シグナルのアダプター分子である MyD88 を欠損した DC2.4 細胞を作成し、枯草菌刺激による Th17 への分化誘導を検討した結果、TLR2 および MyD88 欠損細胞では Th17 への分化誘導が減弱した。そこで、枯草菌 PGN、または熱処理した枯草菌で DC2.4 細胞を刺激したところ、Th17 細胞の誘導はほとんどみられなかった。これらの結果は、枯草菌で刺激された樹状細胞は Th17 細胞を誘導し、それには TLR2 を介した刺激が必要であることを示唆している。PGN 単体では Th17 細胞が誘導されなかったことから、PGN 以外の生菌由来の因子が Th17 細胞の誘導に必要であると考えられる。

P1-131/FL2-11

The inhibitory effects of silver ions and moisturizing gel on GTF activities and biofilm formation

○成 雪菲¹, 宮崎 貴文², 上川 善昭³, 泉福 英信¹ (¹日大松戸・歯・微生物免疫, ²(株)ピカッシュ, ³鹿児島・歯)

○Xuefei Cheng¹, Takafumi Miyazaki², Yoshiaki Kamikawa³, Hidenobu Senpuku¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Dent., Sch. St Matsudo, Nihon Univ., ²Pikasshu, ³Sch. Dent., Kagoshima Univ.)

The oral cavity hosts around 700 microbial species, many essential for health, but pathogens like *Streptococcus mutans* disrupt this balance, causing oral diseases and aspiration pneumonia. Biofilm formation by *S. mutans* relies on glucosyltransferases (GTFs), which produce extracellular polysaccharides (EPS). Silver ions are known for their bactericidal effects and biofilm formation inhibition. To evaluate the role of a mixture of silver ions and an oral moisturizing gel (Sukkilin), which is composed of 13 different components, the effects of silver ion-containing and non-silver ion gels on biofilm formation and GTF activities were investigated. The impact of these gels on biofilm biomass and GTF activities was assessed using qualitative assays, such as spectrophotometric analysis and real-time PCR. The structural changes in biofilms were visualized using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Additionally, bacterial aggregation was assessed by OD600. The results showed that silver ion-containing gel had stronger inhibitory effects than non-silver ion one, likely due to silver ions' bactericidal effects. Moreover, regardless of if the gel contains silver ions, it suggests a downregulation effect on *gtfB* and *gtfC* expression and GTF activity in aggregation assay. This study supports silver ion-based products in antimicrobial therapies and further research into their mechanisms.

P1-132

Polyreactive IgA clones induced by specific commensals protect against pathogenic infections

○丸田 ひかり¹, 長谷 耕二^{1,2,3,4}, 高橋 大輔¹, 服部 きさら¹ (¹慶大・薬・生化学, ²慶大・ヒト生物・微生物叢-量子計算研セ, ³福島大・発酵研・食農学, ⁴東大・医科研・粘膜バリア学)

○Hikari Maruta¹, Koji Hase^{1,2,3,4}, Daisuke Takahashi¹, Kisara Hattori¹ (¹Dept. Biochemi., Sch. Pha., Keio Univ., ²Ctr. Human Biol- Microbiom-Quantum Research., Keio Univ., ³Inst. Ferm Sci., Sch. Food & Agri., Fukushima Univ., ⁴Dept. Mucosal Patches., Inst. Med Sci., Tokyo Univ.)

Secretory IgA (SIgA) plays a crucial role in regulating intestinal microbiota and protecting against pathogens. Intestinal microbiota is essential for the induction of high-affinity IgA induction in Peyer's patch; however, the functionality and specificity of induced IgA remain to be elucidated. We recently found that two commensal species, *Limosilactobacillus reuteri* and *Muribaculum intestinale*, cooperatively contribute to the induction of the IgA responses. Colonization with these species led to increased differentiation of follicular helper T and germinal center B cells in PPs, leading to the elevation of fecal IgA levels. To examine the function of IgA induced by these two species, we generated IgA-producing B-cell hybridomas. Analysis of the hybridoma clones revealed polyreactive IgA binding to not only *L. reuteri* and *M. intestinale*, but also other commensal and pathogenic bacteria including *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. These findings suggest that these two species induce IgA responses with high affinity and polyreactivity, potentially contributing to both microbiota maintenance and protection against diverse pathogens. Our findings demonstrate that specific commensal bacteria can drive the generation of high-affinity, polyreactive IgA in the gut, highlighting their crucial role in shaping protective immunity against both commensal and pathogenic bacteria.

P1-133

Investigation of LCV targeting machinery by Interferon- γ -inducible GTPase, GBP2

○生出 紘夢, 新崎 恒平 (東薬・生命・感染制御)

○Hiromu Oide, Kohei Arasaki (Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm and Life Sci.)

The interferon (IFN)-inducible GTPases play a crucial role in cell autonomous immunity against intracellular pathogens. Particularly, these GTPases directly recognize the host membrane-derived vacuole containing pathogens and subsequently destroy it. Although it has been revealed that these GTPases target the membrane of *Legionella pneumophila* (*L.p.*)-containing vacuole (LCV), molecular mechanism has been totally unclear. Here, we show that mouse GBP2 (mGBP2) is specifically recruited to the LCV and subsequently ruptures it. Furthermore, we also show that mGBP2 associates with LCV through the binding to phosphatidic acid (PA) in which it is produced by a *Legionella* effector, Lpg2552. Interestingly, vacuoles containing *L.p.* lacking Lpg2552 are negative for mGBP2 and this strain escapes from mGBP2-mediated restriction of intracellular growth of *L.p.*. We identified lysin585 (K585) of mGBP2 is required for the binding to PA and K585-mutated mGBP2 fails to recognize LCV. Importantly, IFN-induced endogenous GBP1 but not GBP2 restricts *L.p.* growth in human cells and key lysin residue (K585 of mGBP2) is conserved in human GBP1.

P1-134

Role of IL-35 in aspiration pneumonia involving *Porphyromonas gingivalis*

川村 翔太郎¹, 後藤 久嗣¹, 菊池 毅¹, 岡部 徹平¹, 長谷川 義明², 杉田 好彦³, 藤塚 公崇¹, 林 潤一郎¹, ○梅村 正幸⁴, 三谷 章雄¹ (¹愛知学院大・歯・歯周病, ²愛知学院大・歯・微生物, ³愛知学院大・歯・口腔病理・歯科法医, ⁴琉球大・熱生研・感染防御)

Shotaro Kawamura¹, Hisashi Goto¹, Takeshi Kikuchi¹, Teppei Okabe¹, Yoshiaki Hasegawa², Yoshihiko Sugita³, Hirotaka Fujitsuka¹, Jun-ichiro Hayashi¹, ○Masayuki Umemura⁴, Akio Mitani¹ (¹Dept. Periodontol., Sch. Dent., Aichi Gakuin Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Dent., Aichi Gakuin Univ., ³Dept. Oral Pathol. Forensic Odontol., Sch. Dent., Aichi Gakuin Univ., ⁴Mol. Microbiol. Gr., Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus)

Periodontopathic bacteria are linked to aspiration pneumonia, but the mechanisms of immune control remain unclear. Interleukin (IL)-35, composed of Epstein-Barr virus-induced gene 3 (*Ebi3*) and IL-12p35, is thought to regulate immune responses during infections. This study examined role of IL-35 in the link between periodontal disease and aspiration pneumonia using *Ebi3*^{-/-} mice. A mixed infection model was established by infecting wild-type (WT) and *Ebi3*^{-/-} mice with *Streptococcus pneumoniae* (S.p) and supernatants of *Porphyromonas gingivalis* (P.g). IL-35-related immune responses and the effects of gingipain, a P.g virulence factor, were assessed using leupeptin, a gingipain inhibitor. Histopathology revealed that *Ebi3*^{-/-} mice had greater lung thickening, inflammation, and fibrosis than WT mice. Leupeptin treatment reduced these changes. *Ebi3*^{-/-} mice showed decreased TGF- β 1 and developmental endothelial locus (DEL)-1 expression and increased IL-17A levels. IL-10 and TGF- β 1 levels were also markedly lower in *Ebi3*^{-/-} mice. In WT mice, IL-35 production increased during mixed infections but decreased with leupeptin treatment. These results indicate that IL-35 suppresses aspiration pneumonia progression and that gingipain exacerbates disease severity.

P1-135/FL2-12

腸内細菌叢によるボツリヌス菌感染防御機構の解明

○小林 伸英¹, 松村 拓大¹, 込山 星河², 鳥海 広暉², 古平 陽太郎², Wanping Aw³, 楊 佳約³, 福田 真嗣³, 長谷 耕二², 藤永 由佳子¹ (¹金沢大・医・細菌学, ²慶應大・薬・生化学, ³慶應大・先端生命研)

Mechanisms of colonization resistance against *Clostridium botulinum* infection by gut microbiota

○Nobuhide Kobayashi¹, Takuhiro Matsumura¹, Seiga Komiyama², Hiroki Toriumi², Yotaro Kodaira², Wanping Aw³, Jiayue Yang³, Shinji Fukuda³, Koji Hase², Yukako Fujinaga¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Kanazawa Univ., ²Div. Biochem., Fac. Pharm., Keio Univ., ³IAB, Keio Univ.)

乳児ボツリヌス症は、生後およそ1歳未満の乳児において、経口摂取されたボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)芽胞が腸管に定着、神経毒素を産生することによって発症し、致死的な神経麻痺症状を呈する。一方で、健康な成人は本菌に対して感染耐性である。抗菌薬を大量投与された成人では本菌が感染する事例があること、無菌マウスや抗菌薬処理マウスは成獣であっても感染感受性であるという過去の研究から、成人の腸内細菌叢は本菌に対する感染耐性に重要であると考えられている。しかしながら、その具体的な細菌種や分子機構は明らかとなっていない。ボツリヌス菌感染感受性の特徴づける腸内細菌叢を明らかにするために、異なる日齢の新生仔 SPF マウスの腸内容物を成獣無菌マウス、および5種類の抗菌薬をそれぞれ投与した成獣 SPF マウスの感染感受性を解析したところ、感染感受性および耐性マウスが複数得られた。これらのマウスの腸内細菌叢を比較解析したところ、感染耐性の細菌叢に共通して存在する細菌群としてクロストリジウム綱を同定した。そこで、健康成人糞便から精製したクロストリジウム綱を無菌マウスに移植したところ、感染耐性が得られた。さらに、ヒト由来クロストリジウム綱移植マウスの糞便から189菌株を分離し、16S rRNA 遺伝子の相同性に基づき別種と推測される13株を得た。この13株の単独定着マウスを解析したところ、1株のみ感染耐性を付与した。メタボローム解析および *in vitro* 共培養実験の結果から、本分離株は栄養的な競合によりボツリヌス菌の増殖を抑制することが示唆された。以上の結果から、共生細菌とのニッチの競合がボツリヌス菌感染耐性に重要であると考えられる。

P1-136

サルモネラの細胞内感染はメラノーマの脱分化を引き起こし、抗原性を低下させる

○堀内 大, 畑澤 さら, 安藤 優希枝, 熊田原 莉子, 又木 萌萌, 中川 優太郎, 中嶋 美桜, 中村 彰宏, 市川 朝永, 村上 孝 (埼玉医大・医・微生物学)

Salmonella infection induces transient melanoma dedifferentiation with attenuated antigenicity

○Yutaka Horiuchi, Sara Hatazawa, Yukie Ando, Riko Kumatabara, Momo Matakai, Yutaro Nakagawa, Mio Nakajima, Akihiro Nakamura, Tomonaga Ichikawa, Takashi Murakami (Dept. Microbiol. Saitama. Med. Univ.)

サルモネラの細胞内感染はメラノーマ細胞に高免疫原性細胞死を誘導し、メラノサイト分化抗原に特異的なT細胞免疫応答を引き起こす。一方、サルモネラに感染したメラノーマ細胞は、すべてが細胞死に陥るのではなく、ごく一部の細胞は大きく形態を変化させつつ生存する。この感染耐過メラノーマ細胞は、細菌感染を契機に誘導されるメラノサイト分化抗原特異的なT細胞免疫で排除可能なのだろうか。この疑問を明らかにすべく、本研究では、*Salmonella typhimurium* の細胞内感染を耐過したB16F10メラノーマ細胞の細胞表現型と免疫学的排除に対する感受性について検討した。サルモネラ感染を耐過したB16F10細胞は、未感染細胞と比べてMHC class IおよびPD-L1を高発現していた。そこで、PD-L1をノックアウト(KO)したB16F10細胞にサルモネラを感染させ、耐過した細胞を標的細胞としてメラノサイト分化抗原に特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)による免疫学的排除を検討した。その結果、メラノサイト分化抗原特異的なCTLはPD-L1 KO感染耐過B16F10細胞を排除することができなかった。メラノサイト分化に関わるタンパク質の発現を解析したところ、メラノサイト分化抗原の欠失と神経堤幹細胞マーカー分子の高発現が認められ、感染耐過細胞は脱分化状態にあることが示唆された。これらの結果から、サルモネラ細胞内感染の耐過を通じて脱分化状態となったメラノーマ細胞はその抗原性が減弱するため、メラノサイト分化抗原特異的なT細胞免疫応答では排除が難しくなると考えられた。

P1-137

オゾンウルトラファインバブル水による *Porphyromonas gingivalis* 殺菌作用およびジンジバイン不活化作用解析

○遠藤 愛¹, 土門 久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 牛田 晃臣³, 寺尾 豊^{1,2} (¹新潟大・院医歯・微生物, ²新潟大・院医歯・高口研セ, ³新潟大・工・機械システム)

Effects of ozone ultrafine bubble water against *Porphyromonas gingivalis* and gingipain activity

○Mana Endo¹, Hisanori Domon^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Akiomi Ushida³, Yutaka Terao^{1,2} (¹Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ²Cent. For Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ³Inst. Sci. Tech., Niigata Univ.)

【目的】ウルトラファインバブルは、直径 1 μm 未満の気泡を指す。この気泡に生じる浮力は極めて小さいため、難溶性の気体であっても水中に含ませることができる。本技術を用いて作製したオゾンウルトラファインバブル水 (OUBFW) は、さまざまな病原細菌に対して殺菌作用を示すとともに、一部の細菌毒素を不活化する。本研究では、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* およびその主要な病原因子であるジンジバイン (RgpA, RgpB, Kgp) に対する OUBFW の作用を解析した。

【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 株の培養液にオゾン濃度 0.81~3.77 ppm の OUBFW を添加し、コロニーカウント法にて細菌生存率を算定した。次に、OUBFW と *P. gingivalis* 培養上清を 9:1 の割合で混合し、特異的基質を用いて Rgp および Kgp 活性を測定した。続いて、組換え RgpA, RgpB および Kgp を OUBFW と混合し、SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。さらに、OUBFW と *P. gingivalis* 培養上清を 9:1 の割合で混合し、RgpA 抗体、RgpB 抗体および Kgp 抗体を用いて、各ジンジバインをウエスタンブロット法で検出した。

【結果】オゾン濃度 0.81 ppm 以上の OUBFW は *P. gingivalis* を 30 秒以内に死滅させた。OUBFW と *P. gingivalis* 培養上清を 9:1 で混合した群は、蒸留水混合群と比較して Rgp 活性および Kgp 活性がともに 5%未満であった。蒸留水と混合した組換え RgpA, RgpB および Kgp は銀染色で検出されたが、OUBFW 混合群ではいずれも検出されなかった。ウエスタンブロット解析では、蒸留水混合群と比較し、OUBFW 混合群で各ジンジバインの検出量が少なかった。

【考察】OUBFW は *P. gingivalis* を殺菌するとともに、ジンジバインを分解・不活化することが明らかとなった。

P1-138

国産鶏肉における第 3 世代セフェム耐性腸内細菌科細菌の汚染調査

○大屋 賢司¹, Christine Ajero², 菅原 庸³, 矢原 耕史³, 北村 徳一³, 林 克彦¹, 工藤 由起子¹, 大西 貴弘¹, 菅井 基行³, 石原 加奈子² (¹国立衛研・衛生微生物, ²東京農工大・共同獣医, ³国立感染研・薬剤耐性研究センター)

Surveillance of the third-generation cephem-resistant *Enterobacteriaceae* in chicken meat in Japan

○Kenji Ohya¹, Christine Ajero², Yo Sugawara³, Koji Yahara³, Norikazu Kitamura³, Katsuhiko Hayashi¹, Yukiko Hara-Kudo¹, Takahiro Ohnishi¹, Motoyuki Sugai³, Kanako Ishihara² (¹Div. Microbiol., Nat. Inst. Health Sci., ²Coop. Dep. Vet. Med., TUAT, ³Antimicrob. Resist. Res. Center, Nat. Inst. Infect. Dis.)

【背景】肉用鶏から検出される第 3 世代セフェム (3GC) 耐性大腸菌は減少していることが知られるが、人への感染源として、鶏肉における継続的なモニタリングは重要である。2023 年の市販国産鶏肉における 3GC 耐性腸内細菌科細菌の調査結果を報告する。【方法】国産鶏肉 100 検体を対象とした。緩衝ペプトン水で培養した増菌液をクロモガー ESBLL 培地に画線塗抹した。生育した藤色、青色及び白色コロニーを各検体 1 コロニーずつ鈎菌し、純培養後 TOF-MS による菌種同定を行った。分離株の MIC 値を、CLSI 法に準拠した微量液体希釈法にて決定した。セフトキシム (CTX) に対する MIC 値が 2 mg/L 以上を示した株についてドラフトゲノム配列を取得し、遺伝子型別、耐性遺伝子保有状況の解析等を実施した。【結果と考察】33% の検体 (33/100) から CTX に耐性を示した大腸菌が分離され、保有している ESBLL 遺伝子型は *bla*_{CTX-M-1} グループが 27.3% (9/33), *bla*_{CTX-M-2} グループが 18.2% (6/33), *bla*_{CTX-M-9} グループが 57.6% (19/33) であった。大腸菌の遺伝子型 (ST) については、国産鶏肉から多く分離される *bla*_{CTX-M-2} 保有 ST2792 に加え、人から分離の報告が多い *bla*_{CTX-M-14} 保有 ST69 complex (Cplx) が 5 株分離された。ST10 Cplx 及び ST469 Cplx は 3GC 以外にフルオキノロンを始め多くの薬剤に耐性であった。大腸菌の他、CTX 耐性の *Serratia* 属 (30% の検体陽性) を始め多くの 3GC 耐性腸内細菌科細菌が分離され、国産鶏肉における汚染状況が示された。

P1-139

D-アラニン黄色ブドウ球菌の薬剤感受性に影響する

○鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,2}, 小松澤 均^{1,2} (¹広島大・医系科学研究科・細菌学, ²広島大・院内感染症プロジェクト研究センター)

D-alanine affects antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*

○Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,2}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,2} (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ.)

【目的】D-アラニンは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を含む多くの細菌にとって必須の細胞壁ペプチドグリカン構成成分であり、ペプチド鎖をつなぐ架橋反応に重要な役割を持つ。また、*S. aureus* におけるタイコ酸の D-アラニンを用いた修飾は、菌体表層荷電を変化させ、カチオン性抗菌剤への抵抗性に関与する。一方で、D-アラニンを合成、または取り込むシステムは限られている。本研究では、D-アラニンの供給に関与する因子、および培地中に含まれるアラニン量が *S. aureus* の薬剤感受性に与える影響について検討した。【方法】*S. aureus* MW2 株のアラニン合成・取り込みに関与する *alr1*, *dat*, *cycA* 遺伝子欠損株を作成し、各種抗菌剤への感受性を検証した。さらに、アラニン量を調節した Chemically Defined Medium (CDM) を用いて各種抗菌剤に対する感受性試験を行い、培地中に含まれるアラニンの量が感受性に及ぼす影響を検証した。【結果】各種遺伝子欠損株において、βラクタム系抗菌剤やその他細胞壁合成阻害剤、カチオン性抗菌剤、溶菌酵素であるリゾスタフィンに対する感受性が上昇し、また菌体表層荷電の変化も認められ、特に *alr1* 欠損株と *cycA* 欠損株で変化が大きかった。アラニン量を制限した CDM では、特にオキサリンの感受性が大きく上昇し、この傾向は臨床分離 MRSA 株でも同様であった。【考察】D-アラニンの供給阻害は、*S. aureus* の薬剤感受性に大きく影響することが判明した。また、タイコ酸の修飾量の減少によって菌体表層荷電が変化し、カチオン性抗菌剤に対する感受性も上昇した。この結果は、D-アラニンの供給阻害剤が、複数のタイプの抗菌剤と相乗効果を示す可能性を示唆している。

P1-140/FL2-13

IMP-1 および OXA-58 カルバペネマーゼを産生するコリスチン耐性アシネトバクターの同定と性状解析

○西田 智¹, 斧 康雄^{1,2}, 吉野 友祐¹ (¹帝京大・医・微生物, ²帝京平成大・健康メディカル)

Identification and characterization of colistin-resistant *Acinetobacter* producing IMP-1 and OXA-58

○Satoshi Nishida¹, Yasuo Ono^{1,2}, Yusuke Yoshino¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ., ²Faculty Health Med. Sci., Teikyo Heisei Univ.)

【背景】カルバペネム耐性アシネトバクターに対する世界的な関心が高まっている。この感染症は標準的な抗生物質では治療が困難であるため、臨床的に深刻な問題となっている。本研究では、臨床分離されたカルバペネム耐性かつコリスチン耐性アシネトバクターの同定を行い、薬剤感受性および薬剤耐性遺伝子について解析した。【方法】薬剤感受性は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のブレイクポイントに従って定義した。菌種と薬剤耐性遺伝子を同定するためにゲノム解析を行った。【結果】本分離株は、広域スペクトルセファロスポリンおよびカルバペネムを含む β-ラクタム系抗菌薬、ポリミキシン、トリメトプリム/スルファメトキサゾールに耐性であった。ゲノム解析の結果、分離株は *bla*_{IMP-1}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-670}, *aac*(6')-Ib, *aac*(6')-Ij, *ant*(3')-II, *aph*(3')-VI, *msrE*, *mphE*, *sulI* を保有する *A. colistiniresistens* であった。コリスチン耐性に関わるリビド A 修飾酵素をコードする *eptA* 様遺伝子も認められた。SNP を用いた系統解析の結果、日本国内で分離された他の菌株とクラスターを形成していた。この IMP-1/OXA-58 産生株は *bla*_{IMP-1}, *aacA*, *sulI* からなるクラス 1 インテグロンを有していた。【結論】本臨床分離株は IMP-1/OXA-58 産生 *A. colistiniresistens* であった。*A. colistiniresistens* はコリスチンを含むポリミキシンに自然耐性を示すが、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 遺伝子のリザーバーとして機能する可能性がある。今後、MBL 産生 *A. colistiniresistens* が世界的に広がる可能性を注視していく必要がある。

P1-141

国内に分布する豚赤痢菌の薬剤耐性状況および機序の解明

○岩田 剛敏¹, 小椋 義俊², 中村 佳司³, 川副 千晶⁴, 加藤 千絵子⁵, 桃木 杏奈¹, 新井 暢夫¹, 玉村 雪乃¹, 渡部 綾子¹, 楠本 正博^{1,6} (1農研機構・動衛研, 2久留米大・医学部, 3九大・医学研究院, 4滋賀県家保, 5北海道釧路家保, 6大阪公立大院・獣医)

Epidemiology and mechanisms of drug resistance in *Brachyspira hyodysenteriae* in Japan

○Takatoshi Iwata¹, Yoshitoshi Ogura², Keiji Nakamura³, Chiaki Kawazoe⁴, Chieko Kato⁵, Anna Momoki¹, Nobuo Arai¹, Yukino Tamamura¹, Ayako Watanabe¹, Masahiro Kusumoto^{1,6} (1Nat. Inst. Anim. Health, NARO, 2Sch. Med., Kurume Univ., 3Fac. Med. Sci., Kyushu Univ., 4Shiga Livest. Hyg. Serv. Cntr., 5Hokkaido Kuroshiro Livest. Hyg. Serv. Cntr., 6Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro Univ.)

【背景】*Brachyspira hyodysenteriae* (以下, Bh) は, 家畜伝染病予防法の届出伝染病に規定される豚赤痢の原因菌である。わが国では豚赤痢を適応症とする抗菌剤としてタイロシン (TS), リンコマイシン (LCM), チアムリン (TML), パルネムリン (VML) の4剤が認可されているが, 近年, それら薬剤に対する Bh の耐性化が懸念されている。本研究では, 国内に分布する Bh の薬剤耐性状況とその機序の解明を目的とした。【方法】1985~2019年の間に21都道府県の豚から分離された Bh 86株を対象として, 上記4剤を用いて薬剤感受性試験を実施し, 全ゲノム塩基配列情報を取得した。全ゲノム情報から Bh の multilocus sequence typing (MLST) 対象7遺伝子の配列を抽出して型別し, 4剤全てへの耐性の関与が報告される23S rRNA 遺伝子配列ならびに, TML および VML 耐性への関与が報告される *tvaA* 遺伝子の配列を抽出して, 薬剤耐性への影響を検討した。【結果・考察】Bh 86株は MLST で28の sequence type (ST) に型別され, そのうち24の型は PubMLST データベースに登録されていない新規の ST であった。TS および LCM 両剤に高度耐性を示す Bh 株は, 1980年代には確認され, 77株全てで23S rRNA 遺伝子に A2058T(G/C) の点変異が認められた。また, Bh 86株のうち, 2000年に降に分離された20株が *tvaA* 遺伝子を保有しており, 17株が4剤耐性株であった。*tvaA* 遺伝子配列は大きく3つのタイプに分かれ, 一部の ST では *tvaA* 遺伝子の非保有株と, 異なるタイプの *tvaA* 遺伝子保有株が混在していた。以上より, 1980年代以前から国内に浸潤していた Bh の TS および LCM 両耐性株が, *tvaA* 遺伝子を獲得することで, 豚赤痢を適応症とする4薬剤全てに耐性化した可能性が示唆された。

P1-142

ベトナムの環境から検出された薬剤耐性菌の遺伝的特徴の解析とその方法について

○屋宜 宣慶¹, 宮里 宙来², 平井 到² (1琉球大・医・保健・生理機能, 2琉球大・保健・微生物)

Genetic characterization of antimicrobial resistance bacteria detected from Viet Nam environment

○Nobuyoshi Yagi¹, Sora Miyazato², Itaru Hirai² (1Lab. Clin. Physiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus, 2Lab. Microbiol., Dept. Health Sci., Univ. Ryukyus)

医療関連機関だけでなく, 環境やコミュニティなどにまで拡散した薬剤耐性 (AMR) 菌の蔓延を軽減するためには, 医療関連機関だけでなく環境・コミュニティを含めた包括的な AMR 菌モニタリング体制を整備する必要がある。包括的モニタリングによって得られた AMR 菌の遺伝情報を詳細に解析することで AMR 菌の伝播経路を推測することができれば, AMR 菌の有効な封じ込め策の策定が可能となるからである。前回の総会では, 少量のナノポアシーケンスデータにより全ゲノム解析が可能で費用対効果に優れた Shallow-sequencing (Shall-seq) を提案した。本研究では, 実際にベトナム環境由来の AMR 菌について解析し, ベトナム環境に広がる AMR 菌の遺伝的特徴について明らかにした。

ベトナムコミュニティの池や川から環境水をシードスワブで採水した。検体を増菌培養後, CTX および CPFX 含有マッコンキア寒天平板培地に発育した菌株791株について解析した。得た菌株について16S rRNA 遺伝子領域全長をナノポアシーケンサーにより解析し菌種同定を行った。本総会では大腸菌285株についての解析結果を報告する。検出された大腸菌は, *fimH* の解析により8タイプに分類された。*fimH* の各タイプから代表的な菌株を選択し, Shall-seq による全ゲノム解析を行い各菌株の遺伝的特徴を明らかにした。その結果, メタロβラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{NDM-5} や気質特異性拡張型βラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CTX-M} などの AMR 遺伝子が検出された。現在, これらの AMR 遺伝子を運搬するプラスミド全体の構造についても解析中である。

P1-143

Multiple drug-resistant factor analysis of IMP-6 MBL producing *E. coli* AUH-310

○森下 愛月¹, 横山 雛子², 坂口 翔一³, 中野 隆史³, 中田 裕二^{1,2} (1藍野大・院・看護学, 2藍野大・医療保健, 3大阪医科薬科大・医・微生物学・感染制御学)

○Azuki Morishita¹, Hinako Yokoyama², Shoichi Sakaguchi³, Takashi Nakano³, Yuji Nakada^{1,2} (1Grad. Sch. Nurs., Aino Univ., 2Fac. Healthcare Sci., Aino Univ., 3Dept. Microbiol. & Infect. Cont., Fac. Med., Osaka Med. & Pharm. Univ.)

Background: Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) are known to exhibit resistance to even non-carbapenem antibacterial drugs, and treatment drugs are selected individually based on the results of drug susceptibility tests. Many of the CRE strains currently detected in Japan produce IMP-type MBL, characterized by their sensitivity to amikacin, an aminoglycoside antibacterial drug. We previously conducted a molecular epidemiological analysis of carbapenem-resistant *E. coli* detected in medical facilities in northern Osaka Prefecture.

Methods: We identified *E. coli* AUH-310, that exhibited resistance to different classes of antibacterial drugs, including meropenem, levofloxacin, tigecycline, and amikacin. Each resistant gene was predicted by de novo analysis using NGS, and the resistance factors were determined by cloning of the target genes. Additionally, the susceptibility of *E. coli* AUH-310 to cefiderocol, a newly approved drug for the treatment of CRE, was tested.

Results: Whole-genome sequence analysis showed that strain AUH-310 was carbapenem-resistant *E. coli* carrying *bla*_{IMP-6} on its plasmid. Furthermore, the strain possessed multiple AAC6' genes, and the cloning of each gene revealed that *aac6'-Ib-cr* was the main factor contributing to amikacin resistance, contributing to advanced resistance to quinolones. Cefiderocol was found effective against this strain.

P1-144

Genomic characterization of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Aeromonas hydrophila*

○Christian Xedzro¹, 木村 友美², 島本 敏¹, Liansheng Yu³, Hui Zuo³, Yo Sagawara³, Motoyuki Sugai³, 島本 整¹ (1Lab. Food Microbiol. Hyg., Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., 2GeneDesign, Inc., 3Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

○Christian Xedzro¹, Tomomi Kimura², Toshi Shimamoto¹, Liansheng Yu³, Hui Zuo³, Yo Sagawara³, Motoyuki Sugai³, Tadashi Shimamoto¹ (1Lab. Food Microbiol. Hyg., Grad. Sch. Integ. Sci. Life., Hiroshima Univ., 2GeneDesign, Inc., 3Antimicrob. Resist. Res. Cent., Nat. Inst. Infect. Dis.)

Colistin is a last-resort antibiotic used to treat severe multidrug-resistant bacterial infections. Here, we aim to characterize two foodborne bacteria carrying the plasmid-mediated mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *Acinetobacter baumannii* 266-34J1 and *Aeromonas hydrophila* CST-042 were isolated from chicken meat and subjected to whole genome sequencing and antibiotic susceptibility testing. Resistome analysis revealed that 266-34J1 harbors *mcr-4.3*, *bla*_{OXA-67}, and *bla*_{ADC-25} genes conferring resistance to penicillin, cephalosporins, cephamycin, or colistin. Sequence typing of 266-34J1 determined the seven house-keeping genes: *cpn60_28*, *gdhB_12*, *gltA_1*, *gpi_153*, *gyrB-15*, *recA_6*, and *rpoD_32* in the Oxford scheme [assigned to the Sequence Type (ST) 747]. The plasmid harboring *mcr-4* carries the ParE/A toxin-antitoxin system, functional in plasmid maintenance and stabilization. CST-042 harbors *ampH*, *cphA1*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6')-Id*, and two copies of *mcr-3*, one of which is likely a new variant sharing ~85% sequence identity with the original *mcr-3* identified in *Escherichia coli*. The strain was resistant to ampicillin, cefoxitin, and colistin. Sequence typing assigned CST-042 to the nearest ST 1142 [*gltA_799*, *groL* (no hit), *gyrB_788*, *metG_790*, *ppsA_299*, and *recA_848*]. The One Health approach should be prioritized to address the spread of resistance genes, including *mcr* alleles.

P1-145

合成生物学的手法を利用した抗菌ファージ製剤の開発

○山下 和可奈^{1,2}, 崔 龍洙³, 常田 聡², 氣駕 恒太郎^{1,2,3} (¹国立感染研・治ワク, ²早大・先進理工・生命医, ³自治医大・医・細菌)

Development of phage-based antibacterial agent using synthetic biology

○Wakana Yamashita^{1,2}, Longzhu Cui³, Satoshi Tsuneda², Kotaro Kiga^{1,2,3} (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Life Sci. and Med., Sch. Advanced Sci. and Eng., Waseda Univ., ³Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

近年、抗生物質耐性菌に対する治療法として、ファージセラピーが注目されている。現在、主に環境中から単離された野生型ファージが使用されているが、人工ファージの構築により治療効果が高められると考えられる。そこで我々はファージの人工合成手法を検討し、その特徴を評価することを目的とした。本研究ではファージミドと *in vitro* アセンブリ法の2つの方法で合成した抗菌ファージ製剤について報告する。まず、ファージミドを利用した抗菌製剤を構築した。ファージミドとは、ファージカプシドにファージゲノムの代わりにプラスミド DNA を搭載したものである。我々は、ファージ溶菌酵素をコードするプラスミドを搭載したファージミドを合成した。このファージミドは溶菌活性を示した。しかしファージミドは増殖しないため、体内動態が把握しやすい一方で殺菌力には限界がある。次に *in vitro* アセンブリ法を用いて、ファージゲノムに外来遺伝子を搭載した抗菌ファージ製剤を合成した。この方法では、抗ファージシステムに対する阻害因子をファージゲノムに組み込んだ。構築した抗菌ファージ製剤は、抗ファージシステムを持つ細菌株に対して高い殺菌効果を示した。この手法は、宿主域の狭さといった課題を解決する可能性がある一方で、ファージの複製という複雑な過程に関わるため、体内での挙動を予測することは困難である。本研究では、ファージミドと *in vitro* アセンブリ法により人工ファージを構築し、それぞれの特性と課題を明らかにした。今後、人工合成ファージの技術をさらに改良することで、より効果的なファージセラピーが期待される。

P1-146/FL2-14

イヌ腸管内での生存に重要なフルオロキノロン耐性大腸菌 ST131 遺伝子の同定

○前田 愛子^{1,2}, 佐藤 豊孝^{1,2,3}, 岡田 佳帆², 鈴木 章夫^{2,3}, 堀内 基広^{1,2,3} (¹北大・院・国際感染, ²北大・院・獣医・獣医衛生, ³北大・One Health リサーチセンター)

Identification of gene for the survival of fluoroquinolone-resistant *E. coli*/ST131 in the canine gut

○Aiko Maeda^{1,2}, Toyotaka Sato^{1,2,3}, Kaho Okada², Akio Suzuki^{2,3}, Motohiro Horiuchi^{1,2,3} (¹Grad. Sch. Infect. Dis., Hokkaido Univ., ²Lab. Vet. Hyg., Fac. Vet. Med., Hokkaido Univ., ³OHRC., Hokkaido Univ.)

【目的】フルオロキノロン耐性大腸菌 ST131 は、ヒト臨床現場における国際的ハイリスククローンであり、健康者やイヌ・ネコの腸管内にも保菌されている点からも地域社会での ST131 の伝播が示唆される。本研究では、transposon-directed insertion-site sequencing (TraDIS) 解析を用いて、イヌの腸管内での生存に重要な ST131 遺伝子を同定し、ST131 の腸管内定着様式の解明に繋げることを目的とした。【方法】イヌ糞便抽出液および生理食塩水（対照）を Mueller Hinton II broth で 80%濃度に調整した各液に、ST131 トランスポゾン変異株ライブラリーを接種後、37°C で一晚培養した。培養後の本ライブラリー由来 DNA を抽出し、TraDIS 解析を行った。TraDIS 解析にてイヌ糞便抽出液と対照を比較し、イヌ糞便抽出液において検出量が有意に減少していた遺伝子を、腸管内での生存に重要な候補遺伝子として抽出した。候補遺伝子に対する遺伝子特異的欠損株を Lambda Red 組換え法を用いて作製し、イヌ糞便抽出液存在下での増殖性を確認した。【結果】TraDIS 解析により、8 種の候補遺伝子を抽出した。これらの遺伝子特異的欠損株を作製し、イヌ糞便抽出液存在下での増殖性を親株と比較したところ、6 種で有意な増殖性の低下が認められ ($p < 0.05$)。そのうち 2 種 ($\Delta oxyR$ および $\Delta lpxL$) では 70%以上の増殖性の低下を認めた。【考察】OxyR および LpxL は ST131 がイヌの糞便や腸管内での生存に重要であり、ST131 の保菌に重要な因子であると考えられる。

P1-147

牛糞便から分離されたテトラサイクリン耐性遺伝子 Tet(T2)保有破傷風菌のゲノム解析

志多田 千恵¹, 幸田 知子², 高橋 元秀¹, ○黒田 誠³ (¹熊本大・生物毒素・抗毒素共同講座, ²大阪大・獣医学・獣医感染症, ³熊本大・医学検査)

The tetracycline-resistant *Clostridium tetani* isolated from livestock bovine feces

Chie Shitada¹, Tomoko Kohda², Motohide Takahashi¹, ○Makoto Kuroda³ (¹Kumamoto Health Science Univ., Toxin and Biologicals Research Laboratory, ²Lab. Epidemiology, Grad. Sch. Veterinary Sciences, Osaka Metropolitan Univ., ³Dept. Medical Technology, Fac. Health Sciences, Kumamoto Health Science Univ.)

破傷風菌 *Clostridium tetani* は偏性嫌気性菌で芽胞形成能を有し、創傷を介して強直性麻痺が特有の破傷風毒素を産生する。我々はこれまでに熊本県内の土壌から Ribosomal Protection Protein Tet(M)保有テトラサイクリン耐性株を単離し報告している (mSphere. 2023 Dec 20;8(6):e0036923.)。本発表では、ウシ糞便から分離したテトラサイクリン耐性破傷風菌 KHSU-092500-153 株 (MIC tet: 3.0 µg/mL) のゲノム情報解析等を紹介する。その完全長ゲノム配列決定により、本株は Tet(T) と 91% アミノ酸相同性を示す新規 Tet(T2) を染色体上に有し外来性に耐性遺伝子を獲得していることを見出した。Tet(T2)発現組換え大腸菌を作製し薬剤感受性を評価したところ、テトラサイクリンに感受性低下を示し、カナマイシンやクロラムフェニコールなど他抗菌薬では感受性変化は見られなかった。本研究により、破傷風菌はその生存環境でテトラサイクリン選択圧にさらされている可能性が濃厚であり、少なくとも 2 回 “Tet(M) と Tet(T2)” の遺伝子獲得により薬剤耐性を獲得したことを明らかにした。破傷風治療にテトラサイクリンは処方されない。この毒素産生細菌が薬剤耐性を獲得した環境・状況を考慮すれば、その他多くの細菌種がテトラサイクリン耐性を獲得していると想定される。今後の薬剤耐性ワンヘルス対策を考える上で貴重な知見を提示できると考える。

P1-148/FL2-15

The difference in plasmids transfer rates between *Salmonella* serovars from broiler chickens

○サンガジョージ¹, Vu Minh Duc¹, Saki Hiramoto², Rika Miyajima², Yui Tamura², Takehisa Chuma¹ (¹鹿児島大院・共同獣医・獣医公衆衛生, ²鹿児島大・共同獣医・獣医公衆衛生)

○George Sanga¹, Vu Minh Duc¹, Saki Hiramoto², Rika Miyajima², Yui Tamura², Takehisa Chuma¹ (¹Dept. Veterinary Public Health, Joint Grad. Sch. Veterinary Medicine, Kagoshima Univ., ²Dept. Veterinary Public Health, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima Univ.)

Plasmid-mediated resistance genes are common amongst member of Enterobacteriaceae family including *Salmonella*. Through conjugation, we investigated the transfer of plasmids and resistance genes between *Salmonella* serovars commonly isolated from broiler chickens in Kagoshima. We found that, the IncP plasmid was universal carried by all *Salmonella* serovars. However, besides IncP, some isolates also carried IncX1. Additionally, we found that, IncX1 plasmid was transferred easily between the conjugants unlike IncP plasmid. Also, conjugating the same *Salmonella* serovars resulted in a higher conjugation rate, and, based on conjugation rates obtained, *S. Manhattan* had the highest affinity for IncX1, followed by *S. Schwarzengrund* and *S. Infantis*. Furthermore, the IncX1 plasmid facilitated the transfer of resistance genes for third-generation cephalosporins, whereas the IncP plasmid facilitates the transfer of a wide range of antibiotic resistance genes, including aminoglycosides, tetracycline, and sulphonamides. Finally, plasmid conjugation enables us to better understand the mechanisms underlying the occurrence and spread of antibiotic resistance in *Salmonella*.

P1-149

培養時間の延長によるバイオフィルムの非典型的な抗菌薬感性感化現象のメカニズム解明

○原 慧一郎^{1,2}, 杉本 真也^{1,2,3}, 金城 雄樹^{1,2} (¹慈恵医大・医・細菌, ²慈恵医大・バイオフィルム研究センター, ³慈恵医大・アミロイド制御研究室)

Atypical susceptibilization of biofilm cells to antibiotics during long-term cultivation

○Keiichiro Hara^{1,2}, Shinya Sugimoto^{1,2,3}, Yuki Kinjo^{1,2} (¹Dept. Bacteriol., Jikei Univ. Sch. Med., ²Jikei Center for Biofilm Sci. Technol., Jikei Univ. Sch. Med., ³Lab. Amyloid Reg., Jikei Univ. Sch. Med.)

従来、バイオフィルムは時間経過と共に成熟し、その内部の菌は抗菌薬に対して抵抗性を増すと考えられてきた。最近我々は、黄色ブドウ球菌 *Xen36* 株で作製したバイオフィルムの培養期間を延長すると、バイオフィルム内細菌がゲンタマイシンに対して感性感化することを見出した。今回、この現象の普遍性とメカニズムについて解析したので報告する。

Xen36 株以外の複数の菌種・菌株を用い、培養期間の異なるバイオフィルムへ最小生育阻止濃度の 100 倍のゲンタマイシンを 24 時間作用させ、回収した菌のコロニー形成能を評価した。その結果、培養期間を延長してもその内部の菌の生存率（コロニー形成数）は変化しないが、ゲンタマイシン添加後のコロニー形成数は著しく低下することが黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、腸球菌、肺炎桿菌において確認された。この培養期間の延長に伴う抗菌薬感性感化は、抗菌薬の濃度や種類、バイオフィルムの培養期間や培地を変更しても確認された。以上より、バイオフィルムの培養期間を延長すると、その内部の菌は抗菌薬に対して感性感化する非典型的な現象を発見し、その普遍性を明らかにした。

現在、黄色ブドウ球菌トランスポゾン変異株ライブラリーを用いて本現象のメカニズムを解析中である。また、黄色ブドウ球菌株の中には、この現象が顕著に起こる株と起こりにくい株が存在することも判明した。今後、これらの株間でバイオフィルム内部の細菌のトランスクリプトームおよびプロテオームの経時変化を比較解析し、本現象の分子機構の解明を目指す。

P1-150

酪農場内で分離した大腸菌群の薬剤耐性化と乳房病原性の関係および農場内動態解析

○島本 敏¹, 鈴木 直樹², Christian Xedzro¹, Jant Cres Caigoy¹, 島本 整¹ (¹広島大・院・統合生命・食品衛生微生物, ²広島大・院・統合生命・陸域フィールド科学)

Analysis of antimicrobial resistance, udder pathogenicity and on-farm dynamics of coliform bacteria

○Toshi Shimamoto¹, Naoki Suzuki², Christian Xedzro¹, Jant Cres Caigoy¹, Tadashi Shimamoto¹ (¹Dept. Microbiol. Food Safety, Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Dept. Terrestrial Field Sci., Grad. Sch. Integrated Sci. Life, Hiroshima Univ.)

【目的】乳房炎は乳牛の疾病の中で最も多く発生し、酪農業に経済的な損失をもたらすとともに公衆衛生上の問題となっている。特に大腸菌群を原因菌とする環境性乳房炎は他の細菌による乳房炎と比較して重症化しやすく、制御が必要である。本研究では、ワンヘルスの概念に基づき、酪農場における乳房炎の原因となる大腸菌群の薬剤耐性化機構と乳房病原性との関係および農場内動態の解析を目的とした。

【方法】広島県内の戻し堆肥フリーバーン牛舎の酪農場から牛床、堆肥などを 2 カ月に一度、1 年間定期的にサンプリングを実施し、大腸菌と *Klebsiella* 属菌を中心に大腸菌群を分離した。そして、分離菌株について multiplex PCR 法を利用した菌種の同定、薬剤耐性遺伝子、乳房病原性関連遺伝子 (*feca*) の検出を行った。

【結果と考察】牛床については、搾乳牛舎より乾乳牛舎の細菌汚染度が高く、感染リスクの高い乾乳期における牛床の衛生管理の重要性が考えられた。6 回のサンプリングで大腸菌群 1,000 株以上を分離し、乳房炎を発症した乳牛の乳汁から大腸菌を 2 株、*K. pneumoniae* を 1 株分離した。薬剤耐性遺伝子は、大腸菌では *bla*_{TEM}, *K. pneumoniae* では *bla*_{SHV} が高頻度に検出され、*bla*_{CTX-M} やテトラサイクリン耐性遺伝子も高頻度に検出された。*K. pneumoniae* では耐性遺伝子と乳房病原性との関連が指摘されている *feca* 遺伝子との関連が明らかとなった。この結果は、抗菌薬の選択圧によって乳房炎のリスクが増加することを示唆している。現在、乳房病原性と関連性を示す候補となる遺伝子について解析を進めている。

【謝辞】本研究は、公益財団法人 全国競馬・畜産振興会 畜産振興事業の助成を受けた。

P1-151

ブタ農場における抗菌薬投与履歴と常在菌の耐性化に対する影響調査

○奥野 未来¹, 遠矢 良平², 出口 祐一郎², 今井 有未¹, 山本 武司¹, 小椋 義俊¹ (¹久留米大・医・感染医学, ²NOSAI宮崎)

Impact of antimicrobial treatment history on *Enterococcus* resistance in pig farms

○Miki Okuno¹, Ryohei Toya², Yuichiro Deguchi², Yumi Imai¹, Takeshi Yamamoto¹, Yoshitoshi Ogura¹ (¹Dept. Infectious Med., Kurume Univ. Sch. Med., ²Agric. Mutual Aid Assoc. in Miyazaki Pref.)

抗菌薬は細菌感染症の治療に不可欠である一方、抗菌薬の濫用は薬剤耐性菌の出現・常在化を招くというジレンマを抱え続けている。このため、耐性菌のモニタリングおよび対策は臨床現場だけでなく、畜産や環境分野にも求められている。腸球菌(genus *Enterococcus*)は、ヒトや動物の腸管内常在菌するグラム陽性球菌で、ときに日和見感染症の起因菌となりうるが、元来、抗菌薬に対する自然耐性が高い上、耐性遺伝子の獲得により多剤耐性化が問題となっている。本研究では、農場での抗菌薬の投与量、各農場のブタの便から分離した腸球菌の全ゲノムシークエンスデータおよび薬剤感受性試験の結果をもとに、抗菌薬投与が常在菌に与える影響を評価した。宮崎県内のブタ農場での 6 ヶ月間の抗菌薬の有効成分量および使用頻度推定値を算出し、抗菌薬の使用量の異なる 13 農場を選定した。このうち 4 農場は、70-120 日齢に、継続して予防投与を実施していたことが確認されている。各農場において 5 つの発育ステージ(授乳中母猪、肉豚 20 日齢、40 日齢、70 日齢、180 日齢)、各 3 個体から直腸便スワブを採取し、1 個体あたり 2 株ずつ腸球菌を分離した。計 334 株の全ゲノム配列を取得し、平均配列相同性から菌種同定を実施した結果、*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* がそれぞれ 172 株、61 株、60 株で、その他の菌種が 41 株であった。いずれの農場においても豚の日齢にしたがって腸球菌の優勢菌種が入れ替わりが確認された。また、ミノサイクリン、エリスロマイシンなどで株ごとに感受性の違いが見られ、農場での抗菌薬の使用量との相関が確認された。現在、詳細な解析を進めており、本会ではその成果も踏まえて報告する。

P1-152

Whole genome sequencing of *Escherichia albertii* strains with high resistance to potassium tellurite

○若林 友騎, 西嶋 駿弥, 山口 貴弘, 勢戸 和子, 河合 高生 (大安研・微生物)

○Yuki Wakabayashi, Shunya Nishijima, Takahiro Yamaguchi, Kazuko Seto, Takao Kawai (Div. Microbiol., Osaka Inst. Pub. Health)

Escherichia albertii is an emerging foodborne pathogen that sometimes causes large food poisoning outbreaks in Japan. Recently, several selective enrichment broths were developed to isolate *E. albertii* from food or wild animal samples (Wakabayashi *et al.*, 2021; Hirose *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2023). Although the basal media of these enrichment broths differ, all use potassium tellurite as a selective agent. However, the genetic mechanisms of tellurite resistance in *E. albertii* have not been reported before.

Here we sequenced the genomes of our 22 *E. albertii* strains and found three of them harbored *ter*-operon responsible for tellurite resistance in *Enterobacterales*. The MIC values of potassium tellurite against these isolates were more than 160 µg/mL compared to 5 to 40 µg/mL of other *ter*-negative strains. The *ter*-operon was encoded on plasmids harboring IncHI2 type replicon whose sizes ranged between 175 to 226 kb. The phylogenetic analysis revealed *ter*-operon in genetically diverse *E. albertii* genomes. These data imply that horizontal transfer of plasmid-encoded *ter*-operon contributes to high resistance to potassium tellurite in *E. albertii*.

P1-153

Analysis of mutations in Cluster II of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance

○中田 登¹, 八代 龍¹, Ruwen Jou², 阿戸 学¹ (¹感染研・ハンセン研セ・感染制御, ²Cent. Diagnost. Vac. Develop., Taiwan CDC)

○Noboru Nakata¹, Ryu Yashiro¹, Ruwen Jou², Manabu Ato¹ (¹Dept. Mycobacteriol, Leprosy Res. Cent., ²Cent. Diagnost. Vac. Develop., Taiwan CDC)

Rifampicin (RIF) is a major drug used to treat leprosy. RIF resistance of *Mycobacterium leprae*, causative agent of leprosy, results from mutation in the *rpoB* encoding β subunit of RNA polymerase. The molecular diagnosis of RIF resistance in leprosy is done by detecting mutations in RRDR region of the *M. leprae* *rpoB* gene. However, it has been suggested that mutations in regions located outside this region may cause RIF resistance. We analyzed whether mutations in the region outside the RRDR, called Cluster II (T488-I497), cause RIF resistance by using cultivable mycobacteria as a surrogate. The results suggested that mutations T488P, P489L, and I497F cause RIF resistance.

P1-154

Development of a multipronged bactericidal system targeting *E. coli* using colicinogenic-phage

○Maniruzzaman, ミンフオン グエン, 相羽 由詞, ティティアナンパコーン カネート, ホティミーユエン, 渡邊 真弥, 氣駕 恒太郎, 宮永 一彦, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Maniruzzaman, Huong Minh Nguyen, Yoshifumi Aiba, Kanate Thitiananpakorn, Duyen Ho Thi My, Shinya Watanabe, Kotaro Kiga, Kazuhiko Miyana, Longzhu Cui (Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Phage-based bactericidal agents designed to combat AMR infections primarily rely on lytic phages, while lysogenic phages remain an underutilized source for therapeutic applications. In this study, we developed a novel lysogenic phage-based multipronged bactericidal system targeting enteropathogenic *E. coli* by incorporating colicinogenic functionality into phage. By combining the antibacterial activities of phages and bacteriocins, this strategy synergistically enhances the killing efficacy while suppressing the emergence of resistant mutants. Lysogenic phage used in this study was isolated from clinical *E. coli* collection of the Dept. of Bacteriology, JMU. Lytic conversion was achieved by deleting the integrase enzyme through a synthetic method, resulting in yielding clear plaques indicative of enhanced bacterial killing compared to original turbid plaques. Biosynthetic gene cluster of colicin E1 was then inserted into synthetic phage to construct a colicinogenic-phage system. This engineered phage exhibits larger plaques with high bactericidal activity, even at low titers. This engineering approach successfully combines phages with bacteriocins to achieve synergistic bactericidal effects, both as single agents and in cocktail. This platform represents a good solution to overcome the limitations of traditional phage therapy and offers a novel tool for addressing AMR infections.

P1-155

緑膿菌におけるメタロ β ラクターマーゼ IMP-1 および VIM-2 の菌体外放出

○福嶋 理香, 豊元 柊弥, 上釜 綾夏, 津々木 博康, 澤 智裕 (熊本大・医・微生物)

Extracellular release of metallo- β -lactamases IMP-1 and VIM-2 from *P. aeruginosa*

○Rika Fukushima, Touya Toyomoto, Ayaka Uegama, Hiroyasu Tsutsuki, Tomohiro Sawa (Dept. Microbiol., Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ.)

【背景】近年メタロ β ラクターマーゼ (MBL) を産生しカルバペネムに耐性を有する菌の増加が問題となっている。MBL の一種であり膜親和性ドメインを有する NDM-1 が外膜小胞により放出され、菌体外で β ラクターマーゼを分解することが報告されたが、膜親和性ドメインを有さない IMP-1 と VIM-2 については菌体外に放出されるか不明である。本研究では、IMP-1 が外膜小胞を介さず直接菌体外に放出される可能性及び菌体外へ放出された IMP-1 が周囲に与える影響について検討した。

【方法】組み換え IMP-1 及び組み換え VIM-2 を作成し、ウサギに免疫することで各抗血清を得た。この抗血清を用いて、臨床分離カルバペネム耐性緑膿菌 23 株の菌体内および培養上清中 (菌体外) の IMP-1 または VIM-2 の検出をウェスタンブロッティング (WB) で行った。さらに野生型大腸菌を IMP-1 含有培養液及び IMP-1 抗血清と混合し、薬剤感受性の変化を確認した。

【結果】IMP-1 発現緑膿菌 18 株、VIM-2 発現 1 株の培養上清中にそれぞれ MBL タンパク質が検出された。これら MBL は超遠心後にも上清に認められたことから、外膜小胞ではなく直接菌体外に放出されていることが示唆された。さらにこの培養上清を野生型大腸菌に添加すると、 β ラクターマーゼ系抗菌薬の感受性が著しく低下した。また抗 IMP-1 抗血清を添加すると感受性は回復した。

【今後の展望】IMP-1 及び VIM-2 は直接菌体外に放出され、周囲の細菌の薬剤感受性を低下させる可能性が明らかとなった。現在、感染病態における IMP-1 及び VIM-2 を測定する ELISA を開発している。

P1-156

カルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性肺炎桿菌の特徴ならびに耐性機構の解明

○中野 竜一¹, 中野 章代¹, 鈴木 由希¹, 鴨志田 剛², 坂田 竜二³, 小川 美保³, 矢野 寿一¹ (¹奈良県立医科大・微生物感染症学, ²明治薬科大・感染制御学, ³株式会社ビー・エム・エル総合研究所・細菌検査部)

Characterization of carbapenemase-nonproducing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

○Ryuichi Nakano¹, Akiyo Nakano¹, Yuki Suzuki¹, Go Kamoshida², Ryuji Sakata³, Miho Ogawa³, Hisakazu Yano¹ (¹Dept. Microbiol. Infect. Dis., Nara Med. Univ., ²Dept. Infect. Cont. Sci., Meiji Pharm. Univ., ³Dept. Bacteriol., BML Inc.)

【目的】薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランにおいて、カルバペネム耐性腸内細菌目 (CRE) は重要視されている耐性菌の一つである。主な耐性因子としてカルバペネマーゼ遺伝子の獲得が挙げられるが、その他に外膜タンパク質のポーリンが機能欠損するものが知られている。臨床検査室での検査は難しく本邦における実態は不明な点が多い。本研究では、本邦で分離されたカルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性肺炎桿菌についてその特徴ならびに耐性機構を明らかにした。

【方法】全国の医療機関 18 施設より分離されたカルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性肺炎桿菌 20 株を対象とした。薬剤感受性は CLSI 法に準じた寒天平板希釈法によって決定した。カルバペネマーゼなど耐性遺伝子の有無は遺伝子解析 (NGS 解析) により明らかにした。ポーリンの機能欠損の有無は遺伝子解析 (NGS 解析, 定量 PCR) ならびに生化学的解析 (SDS-PAGE) により明らかにした。ゲノム型は MLST 解析により決定した。

【結果】対象株 20 株はいずれもカルバペネム、セファマイシン、第 3 世代セファロsporin に対して高い耐性を示した。全株ポーリンを欠損しており、同時にプラスミド性 AmpC もしくは ESBL を産生していた。ポーリンの欠損には OmpK35 や OmpK36 にフレームシフト変異 (欠失, 挿入, IS の挿入) やナンセンス変異を獲得したもの、もしくはプロモーター変異によって発現量が低下したものがあった。ゲノム型は ST11 や ST23 など 16 型の ST に分類された。

【結論】カルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性肺炎桿菌はポーリンを欠損しており、その変異獲得は多様であった。ゲノム型に偏りはなく多様であることが判った。

P1-157

General Phenotype of NADase Induction by CLI Treatment in *Streptococcus pyogenes*

○立野 一郎, 井坂 雅徳, 長谷川 忠男 (名市大・医・細菌)

○Ichiro Tatsuno, Masanori Isaka, Tadao Hasegawa (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Nagoya City Univ.)

The administration of high-dose clindamycin (CLI) along with penicillin is recommended for the treatment of streptococcal toxic-shock syndrome (STSS). However, we previously reported that a "subinhibitory dose" of CLI induced the expression of the NAD-glycohydrolase (NADase) exotoxin in an emm1-type *Streptococcus pyogenes* 1529 strain isolated from an STSS patient. In this study, we examine NADase induction by CLI treatment using an extracellular NADase activity assay instead of the previous two-dimensional gel electrophoresis assay. The examination revealed that CLI administration can induce NADase expression in a dose-dependent manner. We analyzed 23 CLI-susceptible strains (5 emm1 strains, 6 emm3 strains, 3 emm4 strains, 1 emm6 strain, 3 emm12 strains, 1 emm28 strain, and 4 emm89 strains), and 19 of the 23 strains showed similar NADase induction phenotypes to that shown in strain 1529. These results indicate that NADase induction by CLI treatment is not restricted to specific strains and it could be a standard phenotype among CLI-susceptible *S. pyogenes* strains. We also analyzed four CLI-resistant strains. All four strains showed increased extracellular NADase activities at high concentrations of CLI that did not inhibit bacterial growth. These results indicated that the subinhibitory dose of CLI was not the critical factor for NADase induction.

P1-158

リネゾリドおよびバンコマイシン耐性遺伝子保有 pELF 型線状プラスミド

○橋本 佑輔¹, 鈴木 仁人², 春日 郁朗^{3,4}, 富田 治芳^{1,5} (1群馬大・院医・細菌学, 2国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター, 3東京大・先端科学技術研究センター, 4東京大・院工・都市工学, 5群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設)

Linezolid and Vancomycin-resistance genes harboring pELF-type plasmids in Enterococci

○Yusuke Hashimoto¹, Masato Suzuki², Ikuro Kasuga^{3,4}, Haruyoshi Tomita^{1,5} (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Gunma Univ., 2Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 3Research Center for Advanced Science and Technology, The Univ. of Tokyo, 4Dept. Urban Engineering, The Univ. of Tokyo, 5Lab. Bacteriol. Drug Resist., Grad. Sch. Med., Gunma Univ.)

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は治療薬の少なさから WHO が serious threat に分類し、新規治療薬開発が求められている薬剤耐性菌である。VRE の治療薬の一つとして合成オキサゾリジノン系抗菌薬であるリネゾリドがあるが、既に複数の耐性機序が知られている。現在までに臨床分離腸球菌におけるリネゾリド耐性遺伝子の検出頻度は低いものの、リネゾリド耐性遺伝子の一部は家畜の感染症治療薬である抗菌薬フェニコールへも交叉耐性を示すために、家畜由来腸球菌から高頻度で検出されることが知られている。薬剤耐性菌、薬剤耐性遺伝子は医療-動物-環境分野間を循環しており、医療由来株のみのサーベイランスでは AMR 対策として十分とは言えない。このような背景の中、我々は国内外の環境水・下水を用いた VRE 検出サーベイランスを通じて、複数のリネゾリド・バンコマイシン耐性腸球菌 (LVRE) を検出した。これら LVRE はいずれも pELF 型線状プラスミドを保有しており、ベトナム河川由来株の pELF 型プラスミド上には VanA 型バンコマイシン耐性遺伝子群と *poxA2* 遺伝子が局在し、接合伝達株を LVRE 化可能であった。国内下水由来株では、pELF 型プラスミド上には VanA 型バンコマイシン耐性遺伝子が搭載され、*poxA* 遺伝子は別の環状プラスミドに局在していた。リネゾリドとバンコマイシン耐性遺伝子が共局在した pELF 型プラスミドは 2021 年にインド、2024 年に米国の臨床由来株から報告されており、pELF 型プラスミドが腸球菌の薬剤耐性が最も深刻な *E. faecium* に適応した特性を持つことから今後の LVRE の増加が懸念される。本研究では LVRE の比較解析からリネゾリド耐性遺伝子獲得を通じた pELF 型プラスミドの進化について報告する。

P1-159/FL2-16

Identification of nanaomycin A and its analogs as T9SS inhibitors in *Porphyromonas gingivalis*

○佐々木 祐子¹, 松尾 長大¹, 渡邊 善洋², 岩月 正人², 稲橋 佑起², 西田 智³, 内藤 真理子¹, 庄子 幹郎¹ (1長崎大院・医歯薬・口腔病原微生物学, 2北里大・大村研, 3帝京大・医・微生物)

○Yuko Sasaki¹, Takehiro Matsuo¹, Yoshihiro Watanabe², Masato Iwatsuki², Yuki Inahashi², Satoshi Nishida³, Mariko Naito¹, Mikio Shoji¹ (1Dept. Microbiol. Oral Infect. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., 2Omura Inst., Kitasato Univ., 3Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Med., Teikyo Univ.)

Porphyromonas gingivalis, a key pathogen in chronic periodontitis, has a type 9 secretion system (T9SS) that secretes virulence factors like highly hydrolytic proteases called gingipains. No T9SS-specific inhibitors have been reported, so we tackled developing a T9SS inhibitor screening system. We focused on a minimal medium called mC medium that contains milk casein as the sole protein source. Our incubation and colony-forming unit (CFU) studies revealed that *P. gingivalis* wild-type strain ATCC 33277 caused cloudiness of mC medium without cell growth. A gingipain-null mutant (KDP136) and a T9SS-deficient mutant (PorK-null) showed no cloudiness of mC medium. In mC medium, a gingipain inhibitor, iodoacetamide (IAM), and a protonophore, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine (CCCP), clearly inhibited the increase in turbidity. These results suggested that the mC medium can assess *P. gingivalis* gingipain activity and its functional T9SS. Using an assay method with mC medium, we identified nanaomycin A analogs, OM-173αA and OM-173βA, in the Omura Natural Compound Library. OM-173αA inhibited the increase of gingipain activity level in mC medium culture but did not directly affect gingipain activities. Nanaomycin A showed the same results. These indicated that nanaomycin A and its analogs were probable T9SS inhibitors; however, the mode of action on T9SS function remains unknown.

P1-160/FL2-17

222-nm Far UV-C generates ROS in *Staphylococcus aureus* and inhibits its photoreactivation

○福士 理沙子^{1,2}, 成田 浩司^{1,3}, 山根 亨介⁴, 厚井 融⁴, 浅野 クリスナ^{1,5}, 中根 明夫^{2,5} (1弘大大学院・医・感染生体防御, 2弘医福大・保健・看護, 3弘大大学院・医・附属動物実験施設, 4(株)ウシオ電機, 5弘大大学院・医・生体高分子健康科学)

○Risako Fukushima^{1,2}, Kouji Narita^{1,3}, Kyosuke Yamane⁴, Toru Koi⁴, Krisana Asano^{1,5}, Akio Nakane^{2,5} (1Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 2Dept. Nursing, Sch. Health. Sci., Hirosaki Univ. Health Welfare, 3Inst. Animal Exp., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., 4Ushio Inc., 5Dept. Biopolymer Health. Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

The 254-nm UVC is conventionally used for disinfection but cannot be utilized in dwelling spaces due to its harmful effect on human body, whereas 222-nm Far UV-C is less harmful to human body, and can be used for disinfection in dwelling spaces. Formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) in DNA is a main germicidal mechanism of 254-nm UV-C. However, the CPD is repaired, and bacterial proliferation ability is restored through photoreactivation by photolyase activated with visible light. In this study, we investigated photoreactivation of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C. *S. aureus* was irradiated with 222-nm Far UV-C and photoreactivated for 0 and 4 h or dark repaired for the same period and bacterial count, CPD formation and ROS-generating cells were determined at each time point. Recovery of proliferation ability of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C by photoreactivation was inferior to that irradiated with 254-nm UV-C. In contrast, the similar levels of CPD were induced in *S. aureus* irradiated with either UV-C, and CPD in each group of *S. aureus* were repaired at the comparable level by photoreactivation. More ROS-producing *S. aureus* was observed after irradiation with 222-nm Far UV-C compared with 254-nm UV-C. These results indicate that ROS are involved in inhibition of photoreactivation of *S. aureus* irradiated with 222-nm Far UV-C.

P1-161

ディフィシル菌の溶菌酵素 CD10360 の生化学的解析

○関谷 洋志¹, 村上 祭¹, 河野 優¹, 野中 康宏², 神島 成弘³, 玉井 栄治¹
(¹松山大・薬・感染症学, ²香川大・医・薬理学, ³香川大・医・研究基盤センター)

Analysis of lytic enzyme CD010360 of *Clostridioides difficile*

○Hiroshi Sekiya¹, Matsuri Murakami¹, Suguru Kouno¹, Yasuhiro Nonaka², Shigehiro Kamitori³, Eiji Tamai¹ (¹Dept. Infect. Dis., Pharm., Matsuyama Univ., ²Dept. Pharma., Sch. Med., Kagawa Univ., ³Res. Infra. Cent., Sch. Med., Kagawa Univ.)

【目的】ディフィシル菌は偽膜性大腸炎や抗菌薬関連下痢症の原因菌として医療現場で問題となっている。溶菌酵素は細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン(PG)を分解する酵素であり、作用部位の違いでグルコサミニダーゼ, ムラミダーゼ, エンドペプチダーゼ, アミダーゼに分類される。今回、ディフィシル菌由来のアミダーゼ CD10360 の生化学的性質を明らかにすることを目指した。

【材料・方法】ディフィシル菌 630 株の DNA を鋳型に PCR 法でシグナルペプチドを除いた CD10360 と触媒ドメインのみ(CD10360_CD)をクローニングし、pColdII に組み込んだ。構築したプラスミドを導入した大腸菌 BL21-CodonPlus-RIL を M9 培地で培養後、IPTG (f.c. 1mM) を添加し 15°C で約 24 時間培養し発現誘導したタンパク質をアフィニティークラムで精製した。溶菌活性は濁度低下法、ザイモグラフィで測定し、pH, NaCl, 金属イオンの影響や熱安定性を調べた。また、ブルダウン法で菌との結合を調べた。

【結果・考察】CD10360 の溶菌活性はほぼなかったが、CD10360_CD は活性を示した。N 末側の細胞壁結合ドメイン (CWB2) は、触媒ドメインの基質結合溝と PG の相互作用を阻害していると考えられた。CD10360_CD の溶菌活性は pH7.0 付近で強く、NaCl 添加により低下し、Cu²⁺などの添加で活性は半減した。また、CD10360_CD は熱に安定であり、凍結乾燥後、室温で 4 週間保管後でもほぼ活性が保持された。さらに、CD10360_CD は *Clostridium ramosum*, *Bacillus subtilis* などに弱い活性を示したが、ディフィシル菌に強い活性を示しディフィシル菌に特異性が高い溶菌酵素であると考えられた。今後、変異体作製を行い、より詳細な解析を行う予定である。

P1-162

低分子化合物による黄色ブドウ球菌バイオフィルムの制御

○奥田 賢一 (福工大・工・生命環境)

Control of Staphylococcus aureus biofilm formation by small compounds

○Ken-ichi Okuda (Dept. Life, Env. & Appl. Chem., Fac. Eng., Fukuoka Inst. of Tech.)

黄色ブドウ球菌が形成するバイオフィルムは難治性感染症の原因となるため、効果的な制御法の開発が求められている。国内外の研究グループにより黄色ブドウ球菌に有効なバイオフィルム形成阻害剤の探索が行われてきた。我々は、独自のスクリーニング系を用いて黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を阻害する低分子化合物の大規模なスクリーニングを実施した。これまでにノルゲステメートと JBD1 を取得しており、それらについて構造活性相関研究と作用機序研究を行ってきた。ノルゲステメートは、バイオフィルムマトリックスに含まれる多糖の量を低下させ、バイオフィルム形成に関与するタンパク質の産生を抑制することが示された。加えて、ノルゲステメートは黄色ブドウ球菌の細胞壁の肥厚化や隔壁形成の異常を引き起こし、β-ラクタム系抗菌薬に対する感受性を検討に向上させることが明らかになった。JBD1 については、黄色ブドウ球菌の細胞呼吸を活性化し、アミノグリコシド系抗菌薬に対する感受性を向上させることを見出した。トランスクリプトームおよびメタボローム解析の結果、JBD1 存在下においてアミノ酸の合成や輸送に関連する遺伝子の発現低下と細胞内アミノ酸構成パターンの顕著な変化が観察され、JBD1 が代謝リモデリングを誘導することが示された。さらに、JBD1 によって誘導されるバイオフィルム形成阻害、アミノグリコシド感性感化、代謝リモデリングは、いずれも JBD1 による細胞呼吸の活性化によって誘導されることが明らかになった。一連の研究を踏まえ、バイオフィルム感染症に有効な治療薬を開発する上でどのような因子がターゲットになり得るのか、今後の可能性について議論したい。

P1-163/FL2-18

ファージ尾繊維とポーリンの相互作用

○寺崎 陽香, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Interaction between phage long tail fibers and bacterial porins

○Haruka Terasaki, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Science and Engineering, Saitama Univ.)

ファージは厳密な宿主域をもつ。この特徴はファージ尾繊維と宿主受容体の相互作用(吸着)により決定される。大腸菌 K12 株に感染する T4 ファージの吸着機構は徐々に明らかになってきたが、O157 株に感染する PP01 ファージの吸着機構は未解明である。本研究では、PP01 の尾繊維先端に位置する Gp38 と O157 株の外膜タンパク質 C (OmpC) の相互作用の解明を目的とした。これまでに、Gp38 の結晶構造解析、Gp38 と OmpC のクロスリンク実験、さらに変異解析により、Gp38 の 230 番目のチロシン (Y230) と OmpC の 306 番目のアスパラギン (N306) が相互作用する可能性が示唆された。

本大会では、Gp38 の Y230 以外に OmpC との相互作用に必要なアミノ酸の同定を試みた。PP01 の類縁ファージである T2 の Gp38 は PP01 同様に Y230 を持つが、O157 株の OmpC には吸着できない。そこで、PP01 の Gp38 のさまざまな領域を T2 の Gp38 に置き換えたキメラファージを作製し、増殖能を調べた。その結果、PP01 の Gp38 の 158 番目から 170 番目の領域が OmpC との相互作用に必要であることがわかった。この領域のアミノ酸をそれぞれ T2 のアミノ酸に置換して増殖能を調べたところ、159 番目のチロシン (Y159) が相互作用に必要であることが分かった。Y230 と Y159 は Gp38 の異なるループ構造にあるが、ともに尾繊維先端に位置し隣接している。よって、この領域で OmpC と相互作用する可能性が示唆される。T4 では尾繊維先端が、3 量体を形成する OmpC の中心の窪みにある複数のアミノ酸と相互作用する。一方 PP01 では、Gp38 と相互作用する N306 は OmpC の外側に露出するループ構造内に位置する。よって、PP01 は T4 とは異なる様式で吸着することが示唆される。

P1-164/FL2-19

大腸菌 O157 株における抗 T4 ファージ作用

○石川 帆華, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Anti-T4 phage defense in Escherichia coli O157

○Honoka Ishikawa, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

細菌はファージ感染を回避するために多様な防御機構を発達させてきた。例えば、吸着から逃れるために外膜の形状を変化させたり、制限修飾系や CRISPER-Cas 系によりファージ DNA を切断したり、CBASS やトキシン-アンチトキシン系により不穏感染を引き起こしたり、その方法は様々である。T4 ファージ (以下、T4) は、大腸菌 K12 株に感染するが O157 株には感染しない。我々は、T4 が O157 株に感染できない原因を探り、O157 株がもつ新規の抗ファージ機構の発見を目指している。これまでの解析で、T4 は K12 株の外膜タンパク質である OmpC を吸着のレセプターとするが、O157 株の OmpC は吸着に必須なアミノ酸が変異していることがわかった (Suga et al. Appl. Environ. Microbiol. 2021)。また、O157 株の OmpC に吸着できる変異 T4 を用いて O157 株への吸着能を調べたところ、野生株には吸着できないが、細胞壁を構成するリポ多糖を短くすることで吸着能が向上することもわかった。これらの結果は、O157 株が OmpC の変異とリポ多糖の物理的な障害をもつことで、T4 の感染から逃れていることを示唆する。我々は、T4 の尾繊維先端タンパク質を、O157 株に感染する PP01 ファージの先端タンパク質に置き換えた改変ファージを作製した。改変ファージは O157 株に吸着したが、興味深いことに増殖することはできなかった。この結果は、O157 株には吸着阻害以外に T4 の増殖を抑えるしくみが存在することを示唆する。これまでに、O157 株で改変ファージ感染後に DNA 複製が起きないことを確認しており、現在その要因について検討中である。

P1-165/FL2-20

ファージ防御に関わるトキシン-アンチトキシンシステムの活性化
○隠岐 大稀, 大塚 裕一 (埼玉大・院・理工)

Activation of the toxin-antitoxin system in phage defense

○Daiki Oki, Yuichi Otsuka (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

細菌は進化において様々な抗ファージ機構を発達させてきた。その1つにトキシン-アンチトキシンシステム (TA) がある。TA は細菌自身の増殖を阻害するトキシンと、その毒性を抑えるアンチトキシンにより構成される。ファージ感染時にはトキシンの活性化して、細菌自身の増殖を阻害することで、不稔感染を引き起こす。本研究は、ファージ感染後に起こるトキシンの活性化機構の解明を目的とする。

今回対象とした TA は大腸菌 K12 株が持つ RnlA-RnlB で、RnlA トキシンはエンドリボヌクレアーゼ活性を有し、大腸菌やファージの mRNA を分解する。一方、RnlB アンチトキシンは RnlA に結合してその毒性を抑える。RnlB は一般的なアンチトキシンと同じく不安定で、Lon と ClpXP プロテアーゼにより分解される。また、T4 ファージは RnlA に対する阻害因子 Dmd をもつため、K12 株でも増殖可能である。

まず、プロテアーゼ欠損株における *dmd* 変異ファージの増殖能を調べた。Lon と ClpX の単独欠損株では野生株と比べて、プラーク形成能が約 10 倍増加し、二重欠損株では RnlA-RnlB 欠損株と同程度まで回復した。次に、抗ファージ作用を減弱させる *motA* または *asiA* 変異ファージ感染時の RnlB 量を測定した。MotA と AsiA は中期遺伝子群の転写に関わるファージ因子である。それぞれの変異ファージでは、*dmd* 変異ファージに比べて感染後の RnlB 量が部分的に増加した。以上の結果は、RnlA の活性化が RnlB の量に依存することを示している。我々は、ファージ感染後に生じる RnlB 量の減少が RnlA 活性化のトリガーであると考えている。現在、RnlB 量の減少を引き起こす仕組みについて調べている。

P1-166

Development of a phage cocktail against colibactin-producing *Escherichia coli*

○日高 侑也¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Tan XinEe¹, 相羽 由詞¹, 宮永一彦¹, 笹原 鉄平^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 崔 龍洙¹ (自治医大・医・細菌, ²自治医大・医・臨床感染)

○Yuya Hidaka¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Tan XinEe¹, Yoshifumi Aiba¹, Kazuhiko Miyahara¹, Teppei Sasahara^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Gut dysbiosis has been implicated in wide range of diseases, highlighting the urgent need to target disease-causing bacteria with precision. Conventional approaches often lack specificity in eliminating target bacteria, complicating the elucidation of their role in disease pathology and posing significant challenges in the development of pharmaceutical interventions. To address these limitations, we focused on specific elimination of colibactin-producing *Escherichia coli* (*pks⁺ E. coli*), a bacterium associated with colorectal cancer, using a cocktail of lytic phages. In our previous work, wild-type lytic phages including ΦEC75_05 were isolated from sewage at Jichi Medical University Hospital. The ΦEC75_05 demonstrated selectively inhibition of the growth of a *pks⁺ E. coli* clinical strain *in vitro*, both in pure culture and mouse feces suspension. However, it failed to achieve efficacy in the mouse gut environment *in vivo*. In this work, we developed a phage cocktail incorporating ΦEC75_05 evaluated its efficacy against the *pks⁺ E. coli* clinical strain. Current efforts are focused on further evaluating the efficacy of the phage cocktail in the mouse gut to determine its therapeutic potential *in vivo*.

P1-167

抗菌薬耐性と黄色ブドウ球菌ファージ耐性のトレードオフ機構の探索

○水谷 拓聖¹, 金子 知義^{1,2}, アザム アア ハエルマン³, 北岡 一樹^{2,5}, 氣賀恒太郎^{2,3,4}, 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファージセラピー研, ³国立感染研・治ワク, ⁴自治医科大学・医学部・細菌学部門, ⁵医療法人社団・予防会・新宿サテライトクリニック)

Exploring of the Trade-off Between Antibiotic Resistance and *Staphylococcus aureus* Phages Resistance

○Hiromasa Mizutani¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Aa Haeruman Azam³, Kazuki Kitaoka^{2,5}, Kotaro Kiga^{2,3,4}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ., ³Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ⁵Shinjuku Satellite Clinic)

黄色ブドウ球菌は、皮膚や粘膜に定着し、敗血症など致命的な感染症の原因になる。また、薬剤耐性率が高く、しばしば治療に難渋する。そこで、従来の抗菌薬とは異なるメカニズムで殺菌できるファージの利用が期待されている。特に、ファージと抗菌薬を併用することで、ファージ耐性を抑制し、抗菌薬の有効性を高める相乗効果が期待される。しかし、黄色ブドウ球菌におけるこの併用効果については十分に解明されていない。

そこで本研究では、黄色ブドウ球菌株に対して、抗菌薬およびファージを作用させた際の挙動から、抗菌薬耐性と黄色ブドウ球菌ファージ耐性のトレードオフ機構の解明を目指した。まず、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) にファージとメチシリンを作用させ、培養液中の菌数変化を測定し、ファージ耐性菌の出現を調べた。その結果、抗菌薬またはファージを単独で作用させた場合、耐性菌は 10 時間程度で出現した。一方、抗菌薬とファージを併用した場合、耐性菌出現までの時間は約 20 時間に延長された。次に、MRSA に対して、抗菌薬とファージを併用した際の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定を実施した。その結果、ファージを併用することで MIC の低下が見られた。MRSA は、細胞壁合成酵素の変異によって、メチシリン耐性を獲得している。また、黄色ブドウ球菌ファージは、細胞壁を構成するペプチン酸を認識することが多い。これらの知見から、ファージ耐性を獲得した MRSA は、細胞壁のペプチン酸に変異が生じる一方で、メチシリンが再び有効になった可能性がある。

P1-168/FL2-21

尿路病原性 ESB� 産生大腸菌のファージ耐性株の性状解析

○田中 真由子¹, 花輪 智子¹, 近藤 恒平², Aa Haeruman Azam³, 丹治 保典⁴, 須田 智也¹, 氣賀恒太郎³, 松田 剛明^{1,4} (¹杏林大・医・総合医療, ²国立感染研・AMRセンター, ³国立感染研・治ワク, ⁴杏林大・医・救急医学)

Characterization of phage-resistant mutants of ESB�-producing uropathogenic *E. coli*

○Mayuko Tanaka¹, Tomoko Hanawa¹, Kohei Kondo², Aa Haeruman Azam³, Yasunori Tanji⁴, Tomoya Suda¹, Kotaro Kiga³, Takeaki Matsuda^{1,4} (¹Dept. Gen. Med., Sch. Med., Kyorin Univ., ²AMR Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ³Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Dept. Traum. Crit. Care Med., Kyorin Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】尿路感染症の主な原因菌である尿路病原性大腸菌 (UEC) において基質拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌が増加しており、ファージ療法の開発が期待される。ファージ療法の際、ファージ耐性菌の出現は治療の障害となる一方、耐性化の代償として病原性の低下や薬剤への再感受性化が生じる「trade-off」の現象も報告されている。本研究では、ESBL 産生 UPEC のファージ耐性化に伴う trade-off のうち、薬剤感受性およびバイオフィーム形成能について検討した。【材料・方法】尿路感染症患者の血液から分離された ESB� 産生大腸菌 KYE019 (ST131/Q25:H4/fimH30) の培養液に、当研究チームが都市部下水流入水より単離した 15 種のファージを各々添加して繰り返し培養することにより、ファージ耐性菌を作出した。Ceftazidime, Cefazolin, Levofloxacin に対する感受性は disk 法により判定し、バイオフィーム形成はクリスタルバイオレット法により定量した。【結果・考察】5 回連続培養後、各ファージ耐性菌の培養液からコロニーを単離して添加したファージに対する感受性を調べたところ、8 種のファージで耐性株が作出されていた。得られた全てのファージ耐性株の薬剤感受性は、親株と同等であった。一方、親株と比較し、バイオフィーム形成能が 1/3-1/5 に減少した株と 1.4-8.4 倍に増加した株があり、ファージの種類により異なる傾向がみられた。以上の結果より、ファージ耐性化と調査した薬剤に対する感受性との関連性は見出されなかったが、バイオフィーム形成能については trade-off と on の両面を引き起こす可能性が考えられた。今後、機構を明らかにするため、遺伝子変異部位の解析等を行う予定である。

P1-169

細菌防御の突破口となるファージ遺伝子の探索

○佐藤 優多^{1,2}, アザム アア ハエルマン¹, 田村 あずみ¹, 山下 和可奈^{1,2}, 小島 新二郎¹, 千原 康太郎¹, 高橋 宜聖¹, 渡士 幸一¹, 常田 聡^{1,2}, 氣駕 恒太郎^{1,3} (¹国立感染研・治ワク, ²早稲田大・先進理工学, ³自治医科大・医・細菌学)

Identification of phage genes involved in evading bacterial defense systems

○Yuta Sato^{1,2}, Aa Haeruman Azam¹, Azumi Tamura¹, Wakana Yamashita^{1,2}, Shinjiro Ojima¹, Kotaro Chihara¹, Yoshimasa Takahashi¹, Koichi Watashi¹, Satoshi Tsuneda^{1,2}, Kotaro Kiga^{1,3} (¹Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Waseda Univ., ³Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

細菌は、ファージ感染から自身を守るために多様な防御機構を進化させてきた。その1つである AVAST (antiviral ATPases/NTPases of the STAND superfamily)は、ファージ由来の特定タンパク質を認識し、それに応答して多量体化することで、ファージの増殖を抑制する。しかし、ファージも AVAST による防御を回避するために進化を遂げている。本研究では、AVAST を回避するために重要なファージ遺伝子特定することを目的とした。AVAST を保有する大腸菌に、T5-like ファージのライブラリーを感染させた結果、AVAST による防御を受けずに増殖可能なファージが確認された。これらのファージのゲノムを比較解析した結果、AVAST を回避するファージに共通して存在する1つのタンパク質 (以下 anti-AVAST) が特定された。また、anti-AVAST を発現させた細菌では、AVAST によるファージ防御活性が顕著に低下した。以上の研究から、AVAST による防御機構を回避する因子として anti-AVAST が同定され、その機能解明に向けた新たな手がかりが得られた。本研究の成果は、細菌とファージ間の進化的攻防の理解を深めるだけでなく、ファージを利用した新しい抗菌戦略の開発にも繋がる可能性がある。

P1-170/FL2-22

大腸菌流行株 ST131 の外膜タンパク質を標的とするファージの探索

○波部 賢人¹, 中塚 哉太¹, 金子 知義^{1,2}, 常田 聡^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²早大・ファージセラピー研)

Isolation of Phages Targeting Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Pandemic Clone ST131

○Kento Habe¹, Kanata Nakatsuka¹, Tomoyoshi Kaneko^{1,2}, Satoshi Tsuneda^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Phage Therapy Inst., Waseda Univ.)

薬剤耐性菌に対する新規治療法であるファージ療法は、ファージの高い宿主特異性やファージ耐性化が課題である。薬剤耐性菌の中でも、大腸菌 Sequence Type (ST) 131 は Multi-Locus Sequence Typing (MLST)解析により分類される系統型で、フルオロキノロン系や第三世代セファロスポリン系の抗菌薬に耐性を示す。さらに、国内外の疫学調査により大腸菌感染症の優勢な流行株と報告されている。我々は、ST131 株同士でアミノ酸配列の保存性が高い外膜タンパク質を特定し、そのタンパク質を標的とするファージを収集することで、多くの ST131 株に対して高い溶菌効果を示すファージ製剤が作製できると考えた。まず、ST131 臨床分離株 205 株 (当研究室が保有する 12 株、NCBI に登録されている 193 株) の外膜タンパク質配列の保存性を調査し、配列多型を分類した (変異箇所が1つでもあれば別パターンに分類)。その結果、OmpC, FhuA, TolC など 12 の外膜タンパク質について、多くが1つの遺伝子型に一致することが認められた (一致度の中央値: 97.5%)。そこで、各外膜タンパク質について、大腸菌 K-12 一遺伝子欠損株に ST131 株由来で一致度の高い配列を導入した組換え株を作製し、都市下水より ST131 株の外膜タンパク質を特異的に認識するファージを獲得した。その後、獲得したファージを液体中で大腸菌と共培養したときの濁度測定により、溶菌活性の高いファージを探索するとともに、異なる外膜タンパク質を標的とするファージを組み合わせた際の溶菌持続時間の変化を検証した。これらにより、ST131 株に効果的なファージ製剤の開発に必要な知見の深まりが期待される。

P1-171

TRR 領域がファージによる細菌防御システム回避に果たす役割

○前田 知哉^{1,2}, アザム アア ハエルマン², 小島 新二郎², 千原 康太郎², 高橋 宜聖², 渡士 幸一², 常田 聡¹, 氣駕 恒太郎^{1,2} (¹早大・先進理工学・生命医科, ²国立感染研・治ワク・早大)

Role of TRR regions in phage evasion of bacterial defense systems

○Tomoya Maeda^{1,2}, Aa Haeruman Azam², Shinjiro Ojima², Kotaro Chihara², Yoshimasa Takahashi², Koichi Watashi², Satoshi Tsuneda¹, Kotaro Kiga^{1,2} (¹Dept. Life Sci. Med. Biosci., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis.)

細菌はファージ感染による溶菌に対抗するため、さまざまな「防御システム」を進化させてきた。一方で、ファージもこれらの防御を回避または阻害する因子を獲得しており、細菌とファージの間に複雑な攻防が展開されている。我々はこれまでに、大腸菌に感染する T5 様ファージの tRNA-rich-region (TRR 領域) に、tRNA を含むいくつかの防御システム阻害因子がコードされていることを見出した。しかし、TRR 領域のその他多くの遺伝子の機能と役割は不明である。そこで本研究では、TRR 領域がファージによる細菌防御システムの回避にどの程度寄与しているかを明らかにすることを目的とした。まず、TRR 領域における防御システム阻害因子の存在を検証するため、TRR を断片化してプラスミドに組み込み、細菌防御システムを発現するプラスミドと共発現させた大腸菌株を作製した。この株を用いて、TRR 領域にコードされている遺伝子による防御システム阻害効果を評価した。その後、CRISPR-Cas13 を利用して TRR 欠失変異ファージを人工的に作製し、これと野生型ファージを比較して防御システム感受性を評価した。その結果、TRR 領域内から新たに DRT 防御システムを阻害する遺伝子が発見した。また、TRR を欠失させた変異ファージでは、RT-関連の防御システムに対する感受性が増加していることが確認された。これらの結果は、TRR 領域がファージによる細菌防御システム回避に重要な役割を果たすことを示唆している。今後、TRR 領域にコードされる因子の相互作用やそのメカニズムを詳細に解明することで、ファージを活用した新規抗菌治療法の設計に貢献することが期待される。

P1-172

ポアメディア MRSA 分離培地 3 の有用性評価

○杉浦 康行 (安城更生病院・検査室・微生物検査)

Evaluation of the Utility of POURMEDIA MRSA SELECTIVE AGAR 3

○Yasuyuki Sugiura (JA Aichi Koseiren Anjo Kosei Hospital, Clinical Laboratory, Microbiology Section)

【はじめに】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染における重要な細菌であり、MRSA を早期に検出することは感染症診療上および感染対策上有用である。今回日常検査において MRSA スクリーニング培地として使用される、ポアメディア MRSA 分離培地 2 (以下 MRSA2: 栄研化学), ポアメディア MRSA 分離培地 3 (以下 MRSA3: 栄研化学), 酵素基質培地であるクロモアガー MRSA スクリーン培地 (以下関東: 関東化学), アキュレート X-MRSA 寒天培地の基本性能について評価を行った。【材料・方法】2024 年 12 月の 1 か月間に当院微生物検査室にて提出された臨床検体および臨床分離株の計 50 検体を対象とした。培養 24~48 時間後に発育した MRSA 様コロニーの卵黄反応もしくは発色の見易さを 5 段階評価でスコア化し、各培地で 50 検体の累積を行い比較した。また、MRSA 以外の夾雑菌の発育の確認を行った。【結果】24 時間判定における MRSA 陽性検体数は関東が 23 件、MRSA3 は 22 件であり、見易さのスコアでは、関東が 82 点と最も高く、MRSA3 は 61 点であった。48 時間判定では、陽性数に変化はなく、スコアはそれぞれ 85 点、86 点であった。また、48 時間培養で、関東、MRSA3 でともに 21 株の夾雑菌が発育した。【考察】酵素基質培地は MRSA の発育が早い点で、日常検査における初代分離培地の培養時間 (約 18 時間) を考慮すると、MRSA の早期の報告が可能であることは従来の報告と同様であった。一方、酵素基質培地は早期報告に有用だが、夾雑菌の影響が大きい。MRSA3 は 24 時間でマニトール分解、卵黄反応による生化学的鑑別性状が明瞭で、効率的な MRSA 判定が可能であった。培養プロトコルの見直しにより迅速な報告とコスト削減が可能であると考えられた。

P1-173/FL2-23

光免疫抗微生物戦略の標的特異的殺菌作用とバイオフィーム制御への応用

○山田 颯汰¹, 西谷 朱音^{2,3}, 光永 真人⁴, 岩瀬 忠行^{2,5} (¹慈恵医大・医, ²慈恵医大・総医セ, ³東京バイオ・バイオ, ⁴慈恵医大・医・内科, ⁵慈恵医大・院・分子診断治療)

Photoimmuno-antimicrobial strategy against biofilm based on molecular targeting

○Sota Yamada¹, Akane Nishitani^{2,3}, Makoto Mitsunaga⁴, Tadayuki Iwase^{2,5} (¹Undergrad., Sch. Med., Jikei Univ., ²Res. Cent. Med. Sci., Jikei Univ., ³Dept. Biotech., Tokyo Coll. Biotech., ⁴Dept. Intern. Med., Sch. Med., Jikei Univ., ⁵Mol. Diagn. Ther., Grad. Sch. Med., Jikei Univ.)

薬剤耐性微生物や新たな病原体の出現により、これまでとは異なる抗微生物戦略の開発が必要となっている。我々は最近、標的の生物種や薬剤耐性状態に関わらず、標的を狙い撃つことが可能な光免疫抗微生物戦略 (PIAS) を開発した (Mitsunaga M. et al. Commun Biol. 2022; Iwase T. et al. Nat Protoc. 2023)。PIAS は、抗体に光反応性プローブ IR700 が結合した光反応性抗体を用いることを特徴とする。近赤外光を受けた IR700 はその構造を変化させることで機械的ストレスを発生させ、標的の抗体結合部位を破壊し、抗微生物効果をもたらす。標的は抗体を選択することで自由に設定でき、これまでに細菌や真菌、新型コロナウイルスなど、様々な微生物種に対して種特異的な作用が確認されている。今回、標的分子を欠損させた黄色ブドウ球菌を用いた検討により、PIAS の特異的な殺菌作用は分子レベルで発揮されることが確認された。また生存に必須でない細胞壁タンパク質を標的としても、その殺菌効果は生存に必須なペプチドグリカンとを標的とした PIAS と同様であったため、細胞壁タンパク質とペプチドグリカンとの共有結合部位の傷害を介してもたらされたものと考えられる。加えて PIAS は、強固に形成されたバイオフィーム内の多剤耐性の黄色ブドウ球菌に対しても殺菌効果を示した。本法は、治療抵抗性を示すカテーテル感染などのバイオフィーム関連感染症に対する新たな治療法としての展開が期待される。

P1-174/FL2-29

アンギノーサス群レンサ球菌が産生する Streptolysin S に対する宿主炎症応答メカニズム

○山森 優護¹, 長宗 秀明^{1,2}, 友安 俊文^{1,2}, 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・院創成科学・生物資源学専攻, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Mechanism of host-inflammatory response against Streptolysin S produced by *Streptococcus anginosus*

○Yugo Yamamori¹, Hideaki Nagamune^{1,2}, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】アンギノーサス群レンサ球菌 (AGS) は、ヒト口腔内に常在する日和見病原菌と認識されてきた。しかし本菌群の構成菌種には、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の主な起因菌である A 群レンサ球菌が持つ重要な病原因子である溶血毒素 Streptolysin S (SLS) を産生する株が多数存在しており、これらの株による細胞傷害や炎症反応の惹起が *in vitro* で確認されている。また、近年では臨床現場において口腔以外の感染症から AGS が頻繁に分離されることから、AGS が血中移行などで異所性感染を起こし高い病原性を発揮する可能性に我々は注目している。そこで本研究では、ヒト血球系細胞株において、AGS 由来の SLS に対する応答メカニズムについて検討した。

【方法】*S. anginosus* subsp. *anginosus* NCTC 10713^T (基準株) と基準株由来 SLS コード遺伝子欠失株 (Δ *sagAs*) を被検菌とし、ヒト血清アルブミン存在下で対数期まで培養した菌液から培養上清を調製した。調製した培養上清をヒト血球系細胞株 THP-1 および HL-60 から分化誘導した貪食細胞モデルに作用させ、細胞傷害性試験や、遺伝子およびタンパク質の発現変動を解析した。

【結果・考察】SLS を含む培養上清の作用により、細胞膜傷害に伴う細胞内 Ca^{2+} の上昇と Ca^{2+} 依存的な複数のサイトカインの発現上昇が認められた。また、サイトカイン発現誘導には、MAPK シグナル伝達経路が関与していた。以上の結果から、SLS の作用に伴うシグナル伝達は、 Ca^{2+} の細胞内流入を起点として、MAPK 経路の活性化により誘導されることが明らかになった。近年、異所性感染の原因菌として注目されている AGS、特に SLS を産生する β 溶血性菌種の病原性の理解に向けて、さらに検討を進めている。

P1-175/FL2-30

3 種類のコレステロール依存性細胞溶解毒素の遺伝子を保有する *Streptococcus mitis* 株の特性

○福本 一鷹¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Characteristics of the *Streptococcus mitis* strain possessing three different CDC-encoding genes

○Ichiyou Fukumoto¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci. & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】*Streptococcus mitis* はミティス群レンサ球菌に属し、ヒト口腔内に常在している日和見病原菌である。我々は、*S. mitis* の中に β 溶血性を示す株が存在し、この β 溶血因子がコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) であることをこれまで明らかにしている。さらに、この CDC コード遺伝子をゲノム上に複数種保有している株も確認されており、*S. mitis* が保有する CDC コード遺伝子の多様性も確認されている。本研究では、3 種の CDC コード遺伝子をゲノム上に保有する *S. mitis* 株の諸特性について、その細胞傷害性に注目して検討した。

【方法】*S. mitis* で確認されている 3 種の CDC (Mitilysin, Sm-hPAF/Lectinolysin, Discoidinolysin) のコード遺伝子に特徴的な配列を標的とした PCR により、被検株における CDC コード遺伝子の保有パターンを確認した。被検株の細胞傷害性はヒト赤血球およびヒト由来培養細胞を対象として検討すると共に、被検株から産生している CDC コード遺伝子の転写翻訳産物をイムノブロッティングにより確認した。

【結果・考察】CDC コード遺伝子を標的とした PCR の結果より、被検株のゲノム上に 3 種の CDC コード遺伝子の存在を確認した。被検株の培養上清はヒト赤血球に対して明瞭な β 溶血性を示すと共に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 に対する細胞傷害性も確認された。さらに、イムノブロッティングにより被検株からの CDC の産生が確認され、被検株は CDC 依存的な細胞傷害性を示すことが示唆された。現在、被検株が示す細胞傷害性における 3 種の CDC の寄与度を明らかにするため、CDC 遺伝子発現の相対定量などの詳細な検討を進めている。

P2-001

市販食品および河川水における腸管毒素原性大腸菌の汚染実態調査

○新井 沙倉¹, 野本 竜平², 伊豆 一郎³, 大野 祐太⁴, 山谷 聡子⁵, 土屋 彰彦⁶, 小嶋 由香⁷, 小西 典子⁸, 千葉 雄介⁹, 大西 貴弘¹, 工藤 由起子¹⁰ (¹国衛研・衛徴, ²神戸市健科研, ³熊本県保環研, ⁴北海道衛研, ⁵宮城保環セ, ⁶さいたま健科研セ, ⁷川崎健安, ⁸東京都健安研, ⁹埼玉衛研, ¹⁰星葉大)

Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in retail food and river water

○Sakura Arai¹, Ryohei Nomoto², Ichiro Izu³, Yuta Ohno⁴, Satoko Yamaya⁵, Akihiko Tsuchiya⁶, Yuka Kojima⁷, Noriko Konishi⁸, Yusuke Chiba⁹, Takahiro Ohnishi¹, Yukiko Kudo-Hara¹⁰ (¹Div. Microbiol., Natl. Inst. Health Sci., ²Dept. Infect. Dis., Kobe Inst. Health, ³Kumamoto Prefect. Inst. Public-Health and Environmental Sci., ⁴Hokkaido Inst. Public Health, ⁵Miyagi Pref. Inst. Public Health and Env., ⁶Saitama City Inst. Health Sci. and Research, ⁷Kawasaki City Inst. for Public Health, ⁸Tokyo Metropol. Inst. Public Health, ⁹Saitama Inst. Public Health, ¹⁰Hoshi Univ.)

【背景】腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) による下痢症が国内で発生している。散発下痢症では、海外で感染し帰国後発症する例が多くを占める一方、集団食中毒事例では原因食品不明の事例が多く国内における本菌の汚染が多い食品や環境を特定することが求められている。そこで本研究では、輸入野菜等の食品および河川水における本菌の分布を調査した。【方法】食品では、市販の輸入野菜、輸入果実、鶏肉を中心に購入した。河川水では、日本の複数の河川から採水した。食品は、基本的に 25 g を 1 検体とし、9 倍量の modified EC broth (mEC) 中に 42°C で培養した。河川水では、水を濾過したフィルターを mEC 中に 42°C で培養した。その後、食品および河川水いづれもアルカリ熱抽出法によって培養液から DNA を抽出し、腸管毒素原性大腸菌の易熱性毒素 (LT) および耐熱性毒素 (STh および STp) 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。PCR 陽性検体の培養液をコロモアガー STEC 基礎培地等分離培地へ画線し培養後、大腸菌に特徴的なコロニーを選択し、毒素遺伝子の保有を PCR にて判定した。【結果と考察】PCR の結果、鶏肉および輸入野菜から LT 遺伝子が検出された。また、河川水からは LT および STp が検出された。分離培養法の結果、河川水の一部から ETEC が分離された。鶏肉の場合、鶏が LT 陽性の *Escherichia fergusonii* を保有することも報告されているため、分離株の同定の際には注意が必要と考えられた。また、本試験では培養液の PCR の Ct 値が 27 以上と高値を示す検体が多数を占めていたため、このような検体からさらに効率よく本菌を分離培養する方法の確立が必要と考えられた。

P2-002

HUS 患者から分離された *stx2f* 遺伝子保有 *E. albertii* の病原性解析

○石嶋 希¹, 岩瀬 忠行⁶, 児玉 年央⁵, 李 謙⁻¹, 大岡 唯祐², 後藤 義幸³, 八尋 錦之助⁴, 明田 幸宏¹, 伊豫田 淳¹ (¹感染研・細菌第一, ²鹿児島大・医歯学・微生物, ³千葉大・真菌・感染免疫, ⁴京都薬大・微生物, ⁵長崎大・熱研・細菌学, ⁶慈恵医大・総医セ・基盤)

Virulence traits of *stx2f*-positive *E. albertii* isolated from a HUS patient

○Nozomi Ishijima¹, Tadayuki Iwase⁶, Toshio Kodama⁵, Ken-ichi Lee¹, Tadasuke Ooka², Yoshiyuki Goto³, Kinnosuke Yahiro⁴, Yukihiko Akeda¹, Sunao Iyoda¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Nat. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., ³Div. Mol. Immunol., MMRC., Chiba Univ., ⁴Infect. Cont. Kyoro Pharm. Univ., ⁵Dept. Bacteriol., NIKKEN., Nagasaki Univ., ⁶Core Res. Facil., Res. Cent. Med. Sci., Jikei Univ.)

大腸菌の近縁菌種である *Escherichia albertii* (EA) は新興下痢症起因菌として知られ、国内でも複数の集団下痢症が報告されている。我々は溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症者から志賀毒素遺伝子 *stx2f* サブタイプを保有する EA を分離し、患者血清中に分離 EA 株に対する凝集抗体の一過的な上昇を確認したことから、この EA 株が HUS の起因菌と推定した。本研究では、HUS 患者由来 EA 株の病原性について解析したので報告する。ウサギ腸管ループ試験における腸管内の液体貯留は EA 株では確認されたが、3 型蛋白質分泌装置 (T3SS) をコードする遺伝子の欠損株では確認されなかった。すなわち、EA の下痢原性は T3SS の機能に依存しているものと考えられた。Stx2f の産生量を解析する目的で、Stx フェージ (φ) の誘導剤である Mitomycin C (MMC) 添加下で EA 株を培養したが、Stx2f は産生されなかった。一方、EA 株を大腸菌 K-12 株と混合培養すると MMC 非添加条件においても Stx2f の産生が確認された。Stx2fφ を溶原化した K-12 株 (溶原化株) を構築したところ、Stx2f の高産生性と培養上清の細胞毒性を認めた。無菌マウスを用いた経口感染モデルでは、EA 単独感染群では死亡例はなかったが、EA と K-12 株の混合培養液投与群、または K-12 株投与翌日に EA 投与した群に死亡例を認め、マウス便中に Stx2f を検出した。Stx2fφ のゲノム配列は溶原化株と EA で同一であったことから、混合培養液中や腸管内で EA から遊離した Stx2fφ が K-12 株へ溶原化して溶菌サイクルを繰り返すことで Stx2f が高発現するものと考えられた。以上の結果から、腸管内に存在する病原菌以外の細菌が毒素遺伝子を獲得して病原性を発揮する機構が存在する可能性が示唆された。

P2-003/FL3-01

A comprehensive characterisation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the oral cavity

○西濱 早紀^{1,2}, 松尾 美樹^{2,3}, Vo Minh Ngoc², 川柳 智暉^{1,2}, 菅原 庸⁴, 久恒 順三⁴, 菅井 基行^{3,4}, 柴 秀樹¹, 小松澤 均^{2,3} (¹広島大・医系科学研究科・歯髄生物学, ²広島大・医系科学研究科・細菌学, ³広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, ⁴国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)

○Saki Nishihama^{1,2}, Miki Matsuo^{2,3}, Vo Minh Ngoc², Tomoki Kawayanagi^{1,2}, Yo Sugawara⁴, Junzo Hisatsune⁴, Motoyuki Sugai^{3,4}, Hideki Shiba¹, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (¹Dept. Biol. Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., ⁴Res. Cent for AMR, NIID.)

Background and Purpose: *Stenotrophomonas maltophilia*, a naturally resistant carbapenem antimicrobial, has been isolated mainly from the environment and also humans. *S. maltophilia* sometimes causes lethal infections in compromised hosts. In this study, we aimed to clarify the characteristic properties of *S. maltophilia* isolated from the oral cavity. **Methods:** In past research, 38 strains of *S. maltophilia* were isolated from the oral cavity. Phylogenetic tree analysis was performed using these strains together with environmental strains obtained from the NCBI database. The amount of biofilm formation was quantified by crystal violet staining. Self-aggregation ability, artificial saliva aggregation ability and coaggregation ability with oral bacteria were measured over time using turbidity as an indicator. **Results:** Oral isolates were not significantly different from environmental strains in phylogenetic analysis. Biofilm formation and self-aggregation ability varied greatly depending on the strain. Compared to self-aggregation, artificial salivary aggregation and coaggregation with oral bacteria were enhanced in some strains. **Conclusion:** This study suggests that *S. maltophilia* may acquire unique characteristics in the oral cavity. *S. maltophilia* in the oral cavity may cause systemic infection through aspiration or bloodstream, and its characteristics need to be further verified.

P2-004

バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecium* 臨床分離株のバイオフィーム形成能とその形態学的特徴の検討

○浜潟 祐奈, 柳原 正志, 岡本 成史 (阪大院・医保・生体病態情報科学)

Analysis of biofilm forming ability in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates

○Yuna Hamagata, Masashi Yanagihara, Shigefumi Okamoto (Dept. Clin. Lab. Biomed. Sci., Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

【背景】Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) は環境中の汚染や医療従事者を介して伝播する院内感染の重要な病原体で、近年、入院患者の保菌によるアウトブレイク事例が国内で増加している。*E. faecium* はバイオフィームを形成することで、様々な環境条件に耐性を持つことが報告されているが、国内の VRE 臨床分離株のバイオフィーム形成能を評価した報告は少ない。【目的】VRE 臨床分離株のバイオフィーム形成能を評価し、その形態学的特徴を明らかにすることである。【方法】使用菌株は、*E. faecium* 標準株 ATCC19434 と大阪府内の医療機関の VRE 臨床分離株 32 株 (単一医療機関アウトブレイク株 6 株を含む) である。クリスタル紫によるバイオフィームアッセイを行い、非形成株 (ATCC19434) の値から形成能を (-) ~ 3+ の 4 段階で評価した。(-) 株, 2+ 株, 3+ 株から各 1 株を選び、バイオフィームの形態観察とバイオフィーム形成時のウェル内での菌の分布を検討した。【結果】VRE 臨床分離株は、71.9% (23/32) でバイオフィーム形成を認め、菌株によって形成能に違いを認めた。単一医療機関アウトブレイク株は全ての株で形成能を有していた。バイオフィーム形成能の違いによって、バイオフィーム内の菌体の形状や染色性が異なっていた。バイオフィーム形成時のウェル内の総生菌数は形成能に関わらず差異はなかったが、形成能が高いほどウェル底部に菌が密集し、培地中に浮遊する菌は少なかった。【考察】VRE 臨床分離株は菌株によって、バイオフィーム形成能に違いを認め、バイオフィーム形成能と伝播力との関連性が示唆された。また、菌同士や物質への接着力の違いがバイオフィーム形成に影響することが示唆された。

P2-005

国内の家畜における *Escherichia albertii* 保菌状況と分離株の特徴

○桃木 杏奈¹, 玉村 雪乃¹, 北島 ちひろ², 新井 暢夫¹, 岩田 剛敏¹, 渡部 綾子¹, 西 順一郎³, 大岡 唯祐³, 楠本 正博^{1,4} (¹農研機構・動物衛生, ²茨城県・県北家保, ³鹿児島大・医歯学, ⁴大阪公立大院・獣医)

Prevalence and characteristics of *Escherichia albertii* isolated from farm animals in Japan

○Anna Momoki¹, Yukino Tamamura-Andoh¹, Chihiro Kitajima², Nobuo Arai¹, Taketoshi Iwata¹, Ayako Watanabe-Yanai¹, Junichiro Nishi³, Tadasuke Ooka³, Masahiro Kusumoto^{1,4} (¹Natl. Inst. Anim. Health, NARO., ²Kenpoku LHSC, Ibaraki Pref., ³Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ., ⁴Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metro. Univ.)

【背景・目的】*Escherichia albertii* は病原因子 intimin の産生遺伝子 (*eae*) を保有し、近年ではヒトの集団食中毒事例が報告されている。本菌は野生動物から分離される傾向にあるとの報告はあるが、家畜についての調査例は限定的であり、全国規模での詳細は不明である。そこで本研究では、国内の家畜における *E. albertii* の浸潤状況およびその性状を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】国内 43 道府県で収集された健康家畜の糞便 3,975 検体 (牛 1,589 検体, 豚 1,838 検体, 鶏 548 検体) を増菌培養後、菌種特異的 PCR で陽性となった増菌培養液から *E. albertii* を分離するとともに、*eae* の配列に基づく intimin サブタイプニングを実施した。また、ディスク拡散法により抗菌剤 24 薬剤に対する感受性を調査するとともに、豚については *E. albertii* が分離された糞便から大腸菌を分離し、主要な 13 薬剤に対する感受性を *E. albertii* のデータと比較した。

【結果・考察】*E. albertii* 分離率は牛 0.4% (7 検体), 豚 3.1% (57 検体), 鶏 2.2% (12 検体) であった。分離数の多い豚について、解析した株の 75% が intimin サブタイプ v (38.5%) または o (36.5%) に分類された。これらのサブタイプは海外のヒト由来 *E. albertii* でも確認されていることから、現時点で家畜における *E. albertii* の保菌率は高くないが、本菌の分離状況および性状には今後も注意する必要がある。また、豚由来株はストレプトマイシン (STR), テトラサイクリン (TET) に対して同一糞便由来大腸菌と同等の耐性菌分布率 (約 30%) であった。STR や TET は健康豚由来大腸菌の耐性菌分布率が高い抗菌剤であり、*E. albertii* は農場における抗菌剤使用により選択されている可能性が示唆される。

P2-006

鼻腔・口腔からの薬剤耐性菌の分離とその追跡調査

○上田 航輔^{1,2}, 川柳 智暉^{1,2}, 松尾 美樹², 久恒 順三³, 菅原 庸³, 竹下 徹⁴, 柴 秀樹¹, 菅井 基行³, 小松澤 均² (¹広島大・医系科学研究科・菌叢生物学, ²広島大・医系科学研究科・細菌学, ³国立感染症研究所薬剤耐性研究センター, ⁴九州大・歯学研究院・口腔予防医学分野)

Isolation of drug-resistant bacteria from nasal and oral cavities and their follow-up studies

○Kosuke Ueda^{1,2}, Tomoki Kawayanagi^{1,2}, Miki Matsuo², Junzo Hisatsune³, Yo Sugawara³, Toru Takeshita⁴, Hideki Shiba¹, Motoyuki Sugai³, Hitoshi Komatsuzawa² (¹Dept. Biol Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Res. Cent for AMR, NIID., ⁴Sect. Prev. Publ Health. Dent., Div. Oral Health. Growth. Dev., Fac. Dent. Sci., Kyushu Univ.)

【目的】薬剤耐性菌が世界的に増加しており市中にも広がりを見せていることから、薬剤耐性菌の蔓延をいかに抑制するかが喫緊の課題である。本研究では鼻腔・口腔からの薬剤耐性菌分離の追跡調査を行うことで、2つの時点から薬剤耐性菌の現状を把握する。

【方法】当研究室では2021年8月から2022年12月の期間において、広島大学病院歯科外来を受診した50歳以上の対象者514人から、鼻腔・口腔より *Staphylococcus aureus* (Sa) および第三世代セファロスポリン/カルバペネム耐性グラム陰性菌を分離した。この時の対象者から50人を追跡対象として抽出し、1年4か月から2年10か月経過した後に再度分離を行うことで、前回の分離状況との比較や菌の定着率を検討した。Saについては、前回の分離株とのゲノムタイプの比較を行った。

【結果と考察】追跡対象50人において、前回鼻腔からSaが分離された19人のうち今回も分離されたのは12人であった。このうちの1人はMRSAであった。前回口腔からSaが分離された8人のうち今回も分離されたのは7人であった。また、前回鼻腔からグラム陰性耐性菌が分離された5人のうち今回も分離されたのは0人であった。前回口腔からグラム陰性耐性菌が分離された14人のうち今回も分離されたのは4人であった。本研究結果から、Saは鼻腔において63.2% (12/19)、口腔において87.5% (7/8)の割合で前回も今回も分離されているため、比較的高い割合で定着している可能性が示唆された。一方で、グラム陰性耐性菌は鼻腔・口腔において定着する可能性が低いことが示唆された。

P2-007

多剤耐性緑膿菌アウトブレイク株の薬剤耐性機構および分子疫学解析

○鈴木 眞^{1,2}, 小倉 康平³, 村田 正太², 宮部 安規子², 川崎 健治², 松下 一之², 秋山 徹⁴, 清水 健¹ (¹千葉大・院医・病原細菌制御学, ²千葉大病院・検査部, ³京都大・院農・食品生物科学, ⁴国立国際医療研究センター・研究所・感染症制御)

Drug resistance mechanisms and molecular epidemiology of MDR *P. aeruginosa* outbreak strains

○Shin Suzuki^{1,2}, Kohei Ogura³, Shota Murata², Akiko Miyabe², Kenji Kawasaki², Kazuyuki Matsushita², Tooru Miyoshi-Akiyama⁴, Takeshi Shimizu¹ (¹Dept. Molecular Infectiology, Grad. Sch. Medicine, Chiba Univ., ²Dept. Laboratory Medicine, Chiba Univ. Hospital, ³Div. Food Sci. Biotech., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁴Dept. Infect. Dis, Nat. Center. Global Health Med.)

【目的】複数の薬剤耐性機構を保有する多剤耐性緑膿菌 (MDRP) は、感染症治療の難渋化だけでなく医療施設におけるアウトブレイクの原因菌として問題となっている。アウトブレイク株の性状を明らかにすることは、院内感染状況を把握するために重要である。本研究では、当院の入院患者から分離されたMDRPの薬剤耐性機構および分子疫学解析を行ったので報告する。

【方法】菌株は、同病棟4人の入院患者から同時期に分離された4株 (喀痰由来2株、膿由来1株、糞由来1株) を対象とした。薬剤感受性試験は微量液体希釈法で実施し、薬剤耐性遺伝子の検出およびキノロン耐性決定領域 (QRDR) の変異検出はドラフトゲノム解析により行った。また、分子疫学解析はMLST解析およびPCR-based ORF Typing法 (POT法) により行った。

【結果・考察】全株でカルバペネム系、アミノグリコシド系、キノロン系を含む広範囲の薬剤耐性を示した。MLST解析でST235に分類される3株は、薬剤耐性遺伝子として *bla*_{TEM-1B}, *aph(3')-IIB*, *aac(6')-Iae*, *aadA1*, *fosA*, *catB7*, *sulI*などを共通で保有し、そのうち2株はカルバペネマーゼ遺伝子である *bla*_{IMP-10}を、1株は *bla*_{IMP-1}を保有していた。残り1株はST207であり、*bla*_{OXA-395}, *aph(3')-IIB*, *fosA*, *catB7*などを保有していた。QRDR変異解析では、全株でGyrA・ParC・ParEにアミノ酸置換が認められた。さらにPOT法を行った結果、ST235株のうち2株が同じPOT値であることが明らかになった。これらの結果から、アウトブレイクのハイリスティックとして国際的に問題となっているMDRP ST235が、同時期・同病棟内において3株存在し、患者間で院内感染した可能性が考えられた。

P2-008/FL3-02

Active surveillance of *Streptococcus suis* in porcine products in Nakhon Ratchasima, Thailand

○Nitchatorn Sungsirin^{1,2}, Tanit Boonsiri², Anusak Kerdin³, Thanaboon Chanwong⁴, Chuleeporn Mutuwong⁴, Marwah Abah⁴, Teerapat Phueakphong⁵, Sudaluck Thunyaharn⁴ (¹Dept. Microbiology, Fac. Medicine, Shimane Univ., ²Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, Thailand, ³Fac. Public Health, Kasetsart Univ. Chalermpkrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon, Thailand, ⁴Fac. Allied Health Sciences, Nakhonratchasima College, Nakhon Ratchasima, Thailand, ⁵Dept. Biology, Sch. Science, King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand)

Streptococcus suis is a zoonotic pathogen causing severe diseases such as meningitis, septicemia, and hearing loss. Human infections typically occur through contact with infected pigs or consumption of undercooked products, posing public health risks. This study conducted active surveillance for *S. suis* in raw porcine products from fresh markets in Mueang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand. A total of 113 samples were cultured in NNCC medium. Bacterial identification was conducted using biochemical methods, MALDI-TOF MS, and serotyping via multiplex PCR. One sample (0.88%) tested positive for *S. suis* serotype 2. Antimicrobial susceptibility testing showed susceptibility to beta-lactams, quinolones, chloramphenicol, tigeccycline, linezolid, trimethoprim/sulfamethoxazole, and vancomycin, while resistance was observed to macrolides, lincosamides, and tetracycline. Despite the low prevalence, the detection of a resistant strain emphasizes the need for ongoing surveillance and antibiotic stewardship. Active surveillance and public awareness campaigns are crucial for mitigating zoonotic transmission and reducing infection risks in high-risk areas.

P2-009/FL3-03

大腸菌ファージの組み合わせによる抗菌効果の増強と耐性化抑制

○泊 悠樹, 小島 新二郎, 氣駕 恒太郎 (感染研・治ワク)

Combination of *E. coli* phage to enhance antimicrobial efficacy and inhibit resistance

○Yuki Tomari, Shinjiro Ojima, Kotaro Kiga (Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis)

薬剤耐性菌に対する新しい治療法として注目されているファージ療法では、患者に複数種のファージを混合して投与する手法が一般的である。しかし、最適なファージの組み合わせを決定するための標準化されたプロトコルは確立されていない。本研究では、204株の大腸菌臨床分離株ライブラリと250株の大腸菌ファージライブラリを使用して、様々なファージの組み合わせにおけるファージの溶菌速度や耐性化までの時間を評価した。その結果、単一のファージと比較し、複数のファージを組み合わせることで、溶菌速度が速まり、耐性化までの時間が長くなる組み合わせが存在した。特に、Tempevirinae科のWarwickvirus属とT4様ファージの組み合わせではこの効果が顕著であった。一方でDhillonvirus属同士やT4様ファージ同士など、同種のファージを組み合わせた場合には、溶菌速度が遅くなり、耐性化までの時間が短くなる傾向が確認された。以上の結果から、複数ファージの併用は、治療効果を増強させる可能性がある一方で、ファージの種類によっては効果が減弱することも示唆された。最適なファージの組み合わせを特定するためには、さらなる研究が必要である。

P2-010/FL3-04

Characteristics of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* type E isolates

○門間 千枝, 成谷 宏文 (十文字女子大・食品開発・食品微生物)

○Chie Monma, Hirofumi Nariya (Dept. Food Science, Jumonji Univ.)

Clostridium perfringens isolates are classified into seven toxin types (A to G) based on the production of six major toxins: alpha, beta, epsilon, iota, enterotoxin, and NetB. While types B, C, D, and E of *C. perfringens* are rarely isolated, and type A is ubiquitous. *C. perfringens* type E produces two major toxins, alpha, and iota. *C. perfringens* type F produces alpha toxin and enterotoxin. In this study, we investigated the characteristics of three enterotoxin-producing *C. perfringens* type E isolates. These strains were isolated from two human fecal samples and one pork sample.

The three enterotoxin-producing *C. perfringens* type E isolates carried the genes encoding alpha toxin, iota toxin, and enterotoxin, but did not carry the genes for beta toxin, epsilon toxin, iota-like toxin, or iota-like enterotoxin. The production of enterotoxin was confirmed using reverse passive latex agglutination. Furthermore, the cytotoxicity of these isolates was confirmed in Vero cells and L929 cells. These findings indicate that the three isolates produce both enterotoxin and iota toxin. We are currently conducting a detailed study to characterize these isolates further.

P2-011

サルモネラ属菌血清型 Typhimurium 野外分離株における H 抗原相の発現状態の解析

○中山 ももこ, 新井 暢夫, 小川 洋介, 楠本 正博, 江口 正浩 (農研機構・動衛研)

The diverse expression status of H antigen in the field strains of *Salmonella* Typhimurium

○Momoko Nakayama, Nobuo Arai, Yohsuke Ogawa, Masahiro Kusumoto, Masahiro Eguchi (National Institute of Animal Health, NARO)

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) の鞭毛 H 抗原には、1 相及び 2 相の抗原相がある。2 つの相の間では、相変異と呼ばれる *hin* 遺伝子の逆位による可逆的な転換が起こる。H 抗原相の発現状態に対する定量的な評価系は確立されていなかったが、我々は *S. Typhimurium* において菌集団中の H 抗原の発現状態を定量できる新規リアルタイム PCR 系を構築した。そこで、様々な家畜由来の *S. Typhimurium* 野外分離株の中から、過去に実施された全ゲノム系統解析の結果を基に 18 株を選出し、当該リアルタイム PCR 系を用いて菌株ごとの H 抗原の発現状態を解析した。H 抗原の発現状態を基に *S. Typhimurium* 野外分離株 18 株を分類すると、菌集団中のほとんどの菌株が片側の相を強く発現する片相型と、菌集団中に 1 相及び 2 相を発現する菌株が均等に存在する両相型に二分されることが明らかとなった。それぞれの型において遺伝系統との関連を調べた結果、特徴的な遺伝系統及び由来畜種は認められず、H 抗原の発現状態と遺伝進化や宿主免疫による選択圧との関連性は低いことが示唆された。一方で、我々は当該新規リアルタイム PCR 系を基盤として、相変異が生じる頻度 (相変異率) を算出する手法についても構築している。当該手法を用いて、現在、H 抗原の表現型及び遺伝子型が多様化する要因の解明に向けて、*S. Typhimurium* 野外分離株 18 株の相変異率に関する詳細な解析を実施している。

P2-012

毒素原性大腸菌易熱性下痢毒素を高感度に検出する改良型イムノクロマト法の開発

藤本 奈那¹, 横溝 野乃花¹, 林 さくら¹, 米山 茉那¹, 井上 笑花¹, 楠本 正博², ○有満 秀幸¹ (¹兵庫県大・環境人間・微生物, ²農研機構・動衛研)

Improved immunochromatographic test highly detecting heat-labile enterotoxin produced by ETEC

Nana Fujimoto¹, Nonoka Yokomizo¹, Sakura Hayashi¹, Mana Yoneyama¹, Emika Inoue¹, Masahiro Kusumoto², ○Hideyuki Arimitsu¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Human Sci. Env., Univ. of Hyogo, ²Natl. Inst. Animal Health, NARO)

【目的】毒素原性大腸菌は食中毒を含むヒトの下痢症及びブタの離乳後下痢症の原因となっており、診断には主に易熱性下痢毒素 (LT) と耐熱性下痢毒素 (ST) の遺伝子の検出が行われている。我々は以前 LT に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製して、迅速に検出するイムノクロマト (IC) 法を報告したが、当時の IC は mAb のみの組み合わせで作製したものではなく、検体の大腸菌も LT 産生増強作用のあるリンコマイシン存在下で一晩培養する必要があるなど、検出力と迅速性に課題があった。また抗原性が低い ST については mAb を作製できていない。そこで本研究では LT の B サブユニット (LTB) と ST の融合蛋白を免疫して両毒素の mAb の作製と IC への応用を試みた。

【方法】LTB 及び STa の融合遺伝子を pBluescript II SK(+) に導入し発現プラスミドとした。蛋白の発現と精製は LT の方法に準じた。精製蛋白を免疫した BALB/c マウスの脾細胞と P3U1 細胞を融合してハイブリドーマを作製、免疫抗原に対するウエスタンブロットと ELISA で特異クローンを選別し、限界希釈法でクローニングした。作製した mAb の 2 種より一方を Hi-Flow Plus135 膜に塗布し、金コロイド標識した別の mAb を含ませたパッドを貼付して IC 試作品とした。検出試験は精製 LT 及びブタ分離菌株の CAYE 培地培養上清で実施し、サンドイッチ ELISA で LT 量を測定した。

【結果と結論】得られた 9 種類の免疫抗原特異 mAb クローンは全て LTB 特異的であり、ST に対するクローンは得られなかった。しかしながら LT の mAb の組み合わせで作製した IC は 1ng/ml の精製 LT を検出し、6 時間培養した野生株培養上清中の LT をほぼ同じ感度で検出できたことから、検出力が向上した LT の IC を作製できたと判断した。

P2-013

One-step loop-mediated isothermal amplification system for *Mycobacterium marinum* detection

○奥村 香世¹, 宮本 友司², 御手洗 聡³, 阿戸 学² (¹感染研・安全管理, ²感染研・ハンセン病研究センター・感染制御, ³結研・抗酸菌)

○Kayo Okumura¹, Yuji Miyamoto², Satoshi Mitarai³, Manabu Ato² (¹Res. Ctr., Biosafety, Lab., Anim., and Pathog. Bank, NIID, ²Dept. Mycobacteriol., Lepr. Res. Ctr., NIID, ³Dept. Mycobac. Ref. Res., Res. Inst. Tubercul., JATA)

Mycobacterium marinum is the etiological agent of cutaneous nontuberculous mycobacteriosis, inducing granuloma formation in human skin. Other mycobacterial species, including *M. ulcerans*, *M. chelonae*, and *M. fortuitum*, also cause cutaneous infections, with *M. ulcerans* and *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* showing close genetic relatedness to *M. marinum*. *M. ulcerans* is a recognized causative agent of Buruli ulcer, and numerous molecular detection and diagnostic methods have been established. However, there is a lack of specific detection methods for *M. marinum*. Currently, confirming *M. marinum* infection requires 16S rRNA or housekeeping gene sequencing, which is labor-intensive and time-consuming. In this study, we developed a one-step colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simple and specific detection of *M. marinum*. The results were confirmed by visual inspection of color change in the reaction solution, eliminating the need for specialized equipment. Our proposed workflow can be completed within 60 minutes from sample preparation to detection with high sensitivity. To the best of our knowledge, the LAMP assay developed in this study represents the sole test capable of specifically detecting *M. marinum* utilizing only the LAMP reaction. Consequently, this LAMP assay has the potential for implementation in routine diagnosis of *M. marinum*.

P2-014

抗豚丹毒菌抗体検出のための新規 ELISA 抗原の探索

○西川 明芳¹, 小川 洋介², 中山 ももこ¹, 橘 紅李¹, 江口 正浩¹ (農研機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域, ²農研機構 動物衛生研究部門 衛生管理研究領域)

Development of a novel ELISA antigen for detection of swine erysipelas protective antibodies

○Sayaka Nishikawa¹, Yohsuke Ogawa², Momoko Nakayama¹, Akari Tachibana¹, Masahiro Eguchi¹ (¹Div. Infect. Animal Dis. Res., NARO, NIAH, ²Div. Hygiene Mgmt. Res., NARO, NIAH)

豚丹毒は人獣共通感染症であり、家畜伝染病予防法でブタやイノシシの届出伝染病に指定されている。また、と畜場法によりと畜場で発見されれば全廃棄となることから、養豚農家にとって経済的損失の大きい細菌感染症の一つである。豚丹毒対策として生ワクチンと不活化ワクチンが市販されている。生ワクチンは一般的に不活化ワクチンより安価であり、免疫付与が容易である。しかしながら、豚が豚丹毒菌に感染し、豚丹毒菌に対する抗体を持つ場合や移行抗体が残っている場合はワクチンブレイクにより免疫付与ができなくなる。ワクチンブレイクの懸念がある場合は不活化ワクチンを選択し接種する。このように、汚染状況により適切なワクチンプログラムを組むことで、ワクチン効果が最大化できる。そのため、事前に家畜の抗豚丹毒菌抗体の保有状況を正確に把握することが不可欠であるが市販の簡便な検査方法は現時点で存在しない。豚丹毒の抗体検査法として、生きた菌を使用する生菌発育凝集試験があるが、判定のために生菌を培養する時間を要し、かつ無菌操作が必要なため手技も煩雑であるという難点がある。さらに、標準菌株として使用する株は強毒株であり、人に感染する危険性があるため検査を逡巡する傾向もある。そこで、安全で簡便かつ信頼できる豚丹毒菌の抗体検査法の開発が望まれている。当グループでは豚丹毒菌の感染機序に関わる因子を特定するため種々の研究を行ってきた。そこで、これまでに得られた知見を活用し、新規 ELISA 抗原候補タンパク質を複数個選抜したのでその結果について紹介する。

P2-015

Absolute quantification of viable *Campylobacter jejuni* using digital PCR with propidium monoazide

○Md. Jannat Hossain^{1,2}, 猪島 康雄^{1,3,4}, 岡田 彩加^{1,3} (¹Joint Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ., ²Dept. Microbiol. Publ. Hea., Khulna Agri. Univ., ³岐阜大学共同獣医学科, ⁴GeFAH)

○Md. Jannat Hossain^{1,2}, Yasuo Inoshima^{1,3,4}, Ayaka Okada^{1,3} (¹Joint Grad. Sch. Vet. Sci., Gifu Univ., ²Dept. Microbiol. Publ. Hea., Khulna Agri. Univ., ³Joint Depart. Vet. Med., Gifu Univ., ⁴GeFAH)

Campylobacter jejuni is a common cause of human gastrointestinal disease worldwide and enters viable but not culturable (VBNC) state under different environmental stressors. Although culture-based methods cannot detect the VBNC state, PCR can detect it. However, it also detects dead bacteria. To check this problem, propidium monoazide (PMA) treatment can be done before PCR. However, the optimal conditions for detecting VBNC state of *C. jejuni* have not been established. Therefore, we aimed to establish an absolute quantification of viable *C. jejuni* using qPCR and dPCR with PMA. *C. jejuni* was cultured in Mueller Hinton broth and adjusted to an OD₆₀₀ = 1 equivalent to 1×10^8 CFU/ml. A 10-fold serial dilution of 1×10^8 CFU/ml was used to prepare the cells. After several conditions of PMA treatment, DNA was extracted from each cell. To compare the results, qPCR and dPCR analyses were done. Ct values obtained from qPCR identified culturable and VBNC cells, while dead bacteria were undetected in *C. jejuni*. However, culturable, dead, and VBNC cells of *C. jejuni* were not detected at low concentrations by qPCR. In contrast, dPCR successfully detected culturable and VBNC cells of *C. jejuni* at low concentrations, while dead bacteria were undetected. Our results suggest that dPCR can more accurately quantify the viable *C. jejuni* compared to qPCR with PMA treatment.

P2-016

MALDI グリコタイピング法による大腸菌と赤痢菌の O 抗原解析

○浦上 彰吾, 比能 洋 (北大・生命科学院)

E. coli and Shigella spp. O-antigen analysis by MALDI glycotyping

○Shogo Urakami, Hiroshi Hinou (Grad. Sch. Life. Sci., Hokkaido Univ.)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) は、生体高分子を測定する方法として開発された。近年、この技術は微生物のリボソームタンパク質を迅速かつ簡便に検出することで、菌種同定に広く活用されている。現在、質量分析による菌種同定法は膨大なデータが蓄積されており、高い信頼性を持つ手法として、臨床微生物学における日常的な細菌同定に使用されている。一方で、質量分析による抗原型の同定は未だ実用化されていない。そこで我々は、O 抗原が糖鎖で構成されている点に着目し、その糖鎖構造を直接検出する技術 (MALDI グリコタイピング法) を開発した。この技術により、1 コロニーの菌株から 1 時間以内に O 抗原を同定することに成功した。しかし、これまでの検証例は 10 菌株に留まっていた。本研究では、大腸菌および赤痢菌の 71 株を解析し、この手法の実用性と有用性を評価した。MALDI グリコタイピング法は各 O 抗原に特徴的なシグナルパターンを検出し、80%以上の菌株で O 抗原の同定に成功した。さらに、報告されている大腸菌と赤痢菌のすべての O 抗原の構造情報を参照することで、既存のバリエーションの識別や未知の O 抗原の推定が可能であることを示した。MALDI-MS による菌種同定と抗原同定を組み合わせることで、迅速かつ高精度な同定が可能となり、臨床微生物学における新たな標準手法としての発展が期待される。

P2-017

凍結保管した大腸癌組織と唾液に存在する *Fusobacterium nucleatum* の菌株同定法

○田中 航¹, 日暮 琢磨², 松本 光晴¹ (¹協同乳業 (株)・技術開発, ²横市大・医・肝胆脾消化器病学)

The method for strain-level identifying *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer specimen

○Wataru Tanaka¹, Takuma Higurashi², Mitsuharu Matsumoto¹ (¹Dairy Science and Technology Institute, Kyodo Milk Industry Co. Ltd., ²Dept. Gastroenterol. Hepatol., Yokohama City Univ.)

【背景】大腸癌 (CRC) の増悪化因子の一つとして *Fusobacterium nucleatum* (Fn) が注目されている。我々は先に、CRC 組織と唾液から分離した Fn を AP-PCR 法にて菌株レベルの解析を行い、一部の患者では CRC に口腔内と同一菌株の Fn が存在することを報告した (Gut 68: 1335-1337, 2019)。さらに、Fn が保有する CRISPR-Cas システムを標的とした高感度の Fn-ジェノタイピング PCR 法を構築し、Fn の分離・培養を介さない菌株同定法を確立した (Microbiol Spectr 11: e0512322, 2023)。そこで、臨床応用を目指し、本法のハイスループット化と臨床検体での検証を行った。

【方法】CRC 患者の大腸内視鏡で採取した CRC と唾液試料をセットで回収し、解析まで -80°C で保管した。試料より抽出・精製したゲノム DNA を Fn-ジェノタイピング PCR し、得られた PCR 産物をマイクロチップ電気泳動システム MultiNA (島津製作所) で解析し、検出バンドサイズから同一菌株の判定を行った。

【結果と考察】MultiNA の使用により、アガロース電気泳動と比較して、大幅な時間短縮と検出バンドサイズの判定精度の向上が認められた。13 名の CRC 患者を解析した結果、7 名が CRC と唾液中に同一の Fn 菌株を保有していることを確認した (54%)。この保有率は Fn 菌株を分離・培養して解析を行った先行研究の結果 (6/14 名, 43%) と比較して高い値となった。これは、臨床試料から抽出したゲノム DNA を Fn-ジェノタイピング PCR で高感度解析することで、培養法のコロニー回収漏れ等による偽陰性の発生を防いだことに起因すると推測される。以上より、臨床検体に応用可能な、高精度化且つハイスループット化した Fn 菌株同定法が完成した。

P2-018

新たに開発した *lafA* 遺伝子の PCR 検出法とシークエンス法の *Aeromonas* 分離株への応用

○宮城 和文, 平井 到 (琉大・医・保健・病原体検査学)

Application of a newly developed PCR detection and sequencing method for *lafA* to *Aeromonas* isolates

○Kazufumi Miyagi, Itaru Hirai (Lab. Microbiol., Sch. Health Sci., Fac. Med., Univ. of the Ryukyus)

【目的】*Aeromonas* 属菌は水系の細菌で、通常は河川、井戸水、土壌などの自然環境に生息しているが、病院患者からも *Aeromonas* 感染症の起因菌として分離されている。本研究では側鞭毛の *lafA* 遺伝子の新しい PCR 検出法とシークエンス法を開発し、*Aeromonas* 属菌の臨床と環境分離株に応用した。【方法】*lafA* の PCR 検出とシークエンスには、今回 *lafA1* and/or *lafA2* (*lafA1-A2*) の両遺伝子検出のための PCR 用プライマー 1 組と *lafA1* シークエンスのための増幅用プライマー 1 組、及びインナープライマー 6 種類を設計して用いた。*Aeromonas* 属菌株は沖縄県内の病院患者由来 63 株と井戸水由来 110 株の合計 173 株を用いた。*lafA1-A2* の PCR 増幅には GoTaq Green Master Mix を用い、*lafA1* のシークエンスには BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 等を用いた。【結果と考察】*lafA1-A2* の臨床株全体の検出率は 23.8% (15 株) で環境株全体では 70.9% (78 株) であり、有意に環境株が *lafA1-A2* を多く保有していた。また、*A. dhakensis* と *A. hydrophila* 株においても有意に環境株が *lafA1-A2* を多く保有していた。シークエンスによって *lafA1* 保有が確認された菌株は 68 株で、その長さは *A. caviae* では 867bp が多く、*A. dhakensis*, *A. hydrophila* 及び *A. intestinalis* ではすべて 864bp であった。*lafA1* を用いた系統樹では、*A. caviae* が主に 3 つのクラスターに分かれ、*A. sanarellii* と *A. dhakensis* がそれぞれ 2 つ、*A. intestinalis* と *A. hydrophila* がそれぞれ 1 つに分かれた。本研究において、*lafA* の新しい PCR 検出法とシークエンス法を開発し、*Aeromonas* 属菌の各菌株の臨床と環境株での *lafA1-A2* の保有率と *lafA1* の塩基配列の特徴を明らかにすることができた。

P2-019

生物発光共鳴エネルギー移動を利用した細菌由来膜小胞イメージング

○志村 大輔¹, 木本 万結¹, 中尾 龍馬², 田代 陽介¹ (¹静大院・総合科技,²感染研・細菌一)

Bioluminescence resonance energy transfer imaging of bacterial membrane vesicles

○Daisuke Shimura¹, Mayu Kimoto¹, Ryoma Nakao², Yosuke Tashiro¹ (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., ²Dep. Bacteriol. I)

細菌が細胞外へ放出する直径約 100 nm の微粒子である膜小胞 (Membrane vesicles: MVs) は、細菌由来の物質で構成されており、病原因子や免疫誘発因子を運搬する役割を有する。また、生体内において膜小胞は由来の細菌から離れた組織まで届き、宿主の様々な疾患に関与することが示されている。そのため、宿主-細菌間相互作用を理解する上で膜小胞の動態を非侵襲で観察する技術の確立が重要となっている。そこで本研究では、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を生じることで、生体を透過しやすい波長域の光を発する LumiScarlet を膜小胞内に封入し、非侵襲で生体深部まで観察可能な発光膜小胞の作製を目指した。LumiScarlet はルシフェラーゼと蛍光タンパク質の複合体であり、基質添加により生じたエネルギーが移動することで長波光を発する。LumiScarlet と外膜タンパク質 OmpA またはペリプラズムタンパク質 Maltose binding protein (MBP) の融合タンパク質の発現ベクターを構築し、プロバイオティクス大腸菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) で発現させ、抽出した膜小胞から LumiScarlet の発現量を調べたところ、後者においてより強く発現していた。また発光基質と膜小胞内の LumiScarlet との間に BRET が生じ、生体透過性の高い 650 nm 付近の発光が確認された。本研究の結果から、MBP と LumiScarlet の結合により膜小胞への封入が促進され、MBP-LumiScarlet 封入膜小胞が生体内イメージングに有用である可能性が示された。本技術は、膜表層を蛍光標識する既存の手法と比較して本来の膜小胞表層特性を変化させないことから、膜小胞の生体内における挙動と機理解解への寄与が期待される。

P2-020

新規 *in vitro* ボツリヌス毒素検出法の開発

○油谷 雅広, 見理 剛, 妹尾 充敏 (国立感染症研究所・細菌第二部)

Development of a novel *in vitro* detection method for botulinum neurotoxin

○Masahiro Yutani, Tsuyoshi Kenri, Mitsutoshi Senoh (Dept. Bacteriol. II., Natl. Inst. Infect. Dis.)

ボツリヌス症の検査において、ボツリヌス毒素の検出には、検体を投与されたマウスが弛緩性麻痺を呈するかを調べるマウス法が用いられている。しかし、検査に動物実験を伴うこと、マウスへの投与に一定の習熟度を要することから、検査そのものや検査機関内での技術継承が困難となることがある。動物実験に関する 3Rs への対応の観点からも、*in vitro* で実施できる代替試験法の開発が望まれる。本研究では、ボツリヌス毒素の基質である SNARE タンパク質を組み込んだ新規リコンビナントタンパク質を利用した高感度なボツリヌス毒素検出系の構築を目指している。現在、血清型 A, B, E, F 型のボツリヌス毒素におけるそれぞれの SNARE タンパク質切断箇所に変異を導入することで、検出と同時に血清型別が可能となるよう検討を進めている。

P2-021

ジフテリア毒素の *in vitro* 検出法の開発

○妹尾 充敏¹, 金 玄¹, 岩城 正昭^{1,2}, 嶋崎 典子³, 見理 剛¹ (¹感染研・細菌,²感染研・安管センター,³感染研・ウ3)

Development of *in vitro* detection method for diphtheria toxin

○Mitsutoshi Senoh¹, Hyun Kim¹, Masaaki Iwaki^{1,2}, Noriko Shimasaki³, Tsuyoshi Kenri¹ (¹Dept. Bacteriol. II, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Res. Ctr. Biosafety, Lab. Anim., and Pathog. Bank, Natl. Inst. Infect. Dis., ³Dept. Virol. III, Natl. Inst. Infect. Dis.)

ワクチン等の生物学的製剤の品質管理試験において、動物愛護の観点などから 3Rs : Reduction (動物数の削減), Refinement (苦痛の軽減), Replacement (代替法への移行) が強く求められている。ジフテリアトキソイドは安全性を確認するため、ウサギおよびモルモットを用いて毒素の不活化を評価している。本研究では、Replacement を果たすことを目的とし、ジフテリア毒素活性の *in vitro* 測定系を開発した。

ジフテリア毒素は 2 本の S-S 結合で結合された 2 つのサブユニットからなる約 58kDa のタンパク質で、強い細胞毒性を有する。その作用機序は、NAD 存在下で EF-2 (Elongation Factor 2) を ADP リボシル化し、タンパク質の合成を阻害する。現在、ジフテリアトキソイド無毒化試験では、ウサギおよびモルモットにトキソイドを接種することで毒素活性の有無を判断しているが、本研究では、動物を使用しない *in vitro* 法として、Vero 細胞を用いた方法を開発した。本法は、ウサギおよびモルモットを用いた試験法よりも感度が高く、アジュバントであるアルミニウムの影響も受けないことが示された。また、実際に市販されているワクチンを用いて本法を評価したところ、既存法と矛盾のない結果が得られた。現在、トキソイド化にトラブルが発生した状況を人為的に作り、毒性が残存するサンプルを調製し、本法で残存毒性を検出することが可能か検討を進めている。

P2-022

蜜蜂幼虫の新規病原細菌の検出法と分布状況調査

○高松 大輔^{1,2}, 岡本 真理子¹, 馬田 貴史¹, 奥村 香世³ (農研機構・動物衛生研究, ²岐阜大院, ³感染研)

Detection methods for novel pathogenic bacteria of honeybee brood and survey of their distribution

○Daisuke Takamatsu^{1,2}, Mariko Okamoto¹, Takashi Mada¹, Kayo Okumura³ (¹Natl. Inst. Anim. Health, NARO, ²Gifu Univ., ³Natl. Inst. Infect. Dis.)

【背景】蜜蜂は農作物の花粉媒介に広く活用される重要な生物資源である。蜜蜂幼虫の病原細菌としては、これまで2種の腐蛆病菌しか知られていなかったが、我々は、経口投与によって幼虫の死亡率を上昇させる腐蛆病菌以外の3種の細菌 (*Paenibacillus* sp. J27TS7, *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus melissococcoides*) を発見した。これら新規病原細菌の養蜂業への影響を推測するため、各菌種に特異的な real-time PCR 法を開発し、蜂蜜を材料に国内における分布状況を調査した。【材料と方法】ゲノム解析結果を基に標的遺伝子を選択し、各菌種を特異的に検出可能なプライマーを設計した。プライマーの特異性は蜂蜜や蜜蝋から分離された65種の細菌を用いて検証し、標的細菌の芽胞をスパイクした蜂蜜を用いて感度を測定した。分布調査には2021年から2024年の間に国内で採取された293検体の蜂蜜を使用した。【結果と考察】開発した real-time PCR 法は、標的菌種のみを特異的に検出することができ、標的菌の芽胞が蜂蜜1mlあたり50個含まれていれば検出可能であった。新規病原細菌3種のうち、*Paenibacillus* sp. J27TS7 は293検体中1検体の蜂蜜のみから検出され (検出率0.34%)、陽性蜂蜜中の濃度は 3.5×10^2 個/ml であった。*P. azoreducens* は、過去に蜂蜜から分離された例はあるものの、今回調査した検体からは検出されなかった。一方、*P. melissococcoides* は69検体から 1.9×10^1 - 1.8×10^6 個/ml の濃度で検出され (検出率23.55%)、47都道府県中24道県で陽性蜂蜜が確認された。以上の結果から蜜蜂の新規病原細菌3種の中では、国内では *P. melissococcoides* が最も注意を払うべき菌種だと考えられた。

P2-023

A(B)型 *Clostridium botulinum* による食餌性ボツリヌス症の家庭内集団発生

○木全 恵子¹, 齋藤 和輝¹, 金谷 潤一¹, 大石 和徳¹, 油谷 雅広², 妹尾 充敏², 百瀬 愛佳³, 岡田 由美子³, 上間 匡³ (富山衛研・細菌, ²感染研・細菌第二部, ³医薬食品衛研・食品衛生管理)

Household food poisoning caused by *Clostridium botulinum* typeA(B)

○Keiko Kimata¹, Kazuki Saito¹, Junichi Kanatani¹, Kazunori Oishi¹, Masahiro Yutani², Mitsutoshi Senoh², Tsuyoshi Kenri², Yoshika Momose³, Yumiko Okada³, Masashi Uema³ (¹Dept. Bac. Toyama Inst. Health, ²Dept. Bacteriol. II Natl. Inst. Infect. Dis., ³Div. Biomed. Food Res. Natl. Inst. Health Sci.)

令和6年7月に、同居家族4名が複視、自律神経障害、呼吸筋麻痺等の症状を発症し、食餌性ボツリヌス症の家庭内集団発生が疑われた。症状発現前の最後の食事から発症までを推定潜伏期間とすると、4名の潜伏期間は半日から3日であった。原因究明のため、国立感染症研究所が患者4名の検体 (便、血清) のボツリヌス毒素検出と便の培養試験を実施した。国立医薬品食品衛生研究所が患者宅で収去した食品検体19検体のボツリヌス毒素検出を行った。また、患者便検体・食品検体のボツリヌス毒素遺伝子検出と培養試験を富山県衛生研究所が行った。毒素検出試験の結果、患者血清3検体がボツリヌス毒素陽性、便4検体の培養上清がボツリヌス毒素陽性であった。また、抗毒素中和試験でA型ボツリヌス毒素が検出された。培養試験の結果、ボツリヌス菌 (A型・B型ボツリヌス毒素遺伝子陽性) が検出された。これらの結果から、分離株はB型毒素遺伝子が機能していないA(B)型ボツリヌス菌と判明した。また、食品検体19検体はボツリヌス毒素及びボツリヌス毒素遺伝子は陰性であった。本事例では嫌気状態の食品の喫食歴は確認されず、原因食品は不明であった。食餌性ボツリヌス症は、1984年以降2024年までに、国内で本事例を含め35件が報告されているが、近年、本事例のように嫌気状態の原因食品の関与が不明である症例が散見されており、注意が必要である。共同研究者：川岸利臣 土井智章 洲上貴正 波多野智哉 (富山大学医学部 救急科)、江崎真佳 長岡健太郎 山本善裕 (富山大学医学部 感染症科)、池田佳歩 大島萌愛 清水ひな (富山県衛生研究所)、瀧波賢治 山田雅俊 (富山市保健所)

P2-024

腔内細菌叢由来細胞外小胞が関与する卵巣がん悪性化の解明

○稲見 恵理, 横井 暁, 吉田 康将, 長尾 有佳里, 北川 雅美, 梶山 広明 (名大・医・産婦人科)

Ovarian cancer malignant transformation involving extracellular vesicles from vaginal microflora

○Eri Inami, Akira Yokoi, Kosuke Yoshida, Yukari Nagao, Masami Kitagawa, Hiroaki Kajiyama (Dept. Obst & Gynec., Nagoya Univ. Grad. Sch. Med.)

卵巣がんは卵管上皮細胞 (FT 細胞) の形質転換から、卵巣へ生着し発生する卵管采上皮仮説が定着しているが、FT 細胞がどのように卵巣がんとして進展するのか、その詳細は不明である。近年、がん悪性化と細菌の関わりが着目されているが、腔内細菌叢が放出する細胞外小胞 (Bacterial Extracellular Vesicle: BEV) の婦人科がんへの関与は全くわかっていない。本研究では、BEV の FT 細胞への悪性化プロセスを明らかにすることを目的とした。既報腔内細菌叢 16S シーケンス結果を元に、腔常在菌である乳酸菌を選定した。FT 細胞を用いて、*Lactobacillus gasseri* (*L. gasseri*)、*Lactobacillus iners* (*L. iners*) から回収した EV の、FT 細胞への影響を検証した。その結果、*L. gasseri*-EV は FT 細胞の細胞遊走を抑え、*L. iners*-EV は細胞遊走を促進するという結果を得た ($p < 0.05$)。また、*L. iners*-EV は FT 細胞における非足場依存能の亢進を誘導していた ($p < 0.05$)。次に BEV 搭載 RNA を RNA-seq 解析し、異なるプロファイルを有していることを確認した。さらに卵巣がん患者4例と良性腫瘍患者3例の卵管采由来 EV を直接採取し、同 EV 中 RNA にも、ヒト RNA として検出されない、バクテリア由来の RNA、さらに病態に関与し得る特異的配列が存在し得ることを同定した。本結果は、卵巣がん発生機構において、腔内細菌 BEV が、がん悪性化抑制的、促進的双方へ影響を及ぼすことを示しており、卵巣がん発生初期の FT 細胞の進展に関与することを示唆する。

P2-025

Changes in gut microbiota in allergic mice treated with *Lonicera caerulea* extract

○南 正明¹, 中村 峰夫² (¹名市大院・医・細菌, ²中村薬局)

○Masaaki Minami¹, Mineo Nakamura² (¹Dept. Bacteriol. Nagoya City Univ. Grad. Sch. Med., ²Nakamura Pharm.)

In recent years, it has become clear that the diversity of gut microbiota is closely related to the onset and severity of allergic diseases. *Lonicera caerulea* fruit (LCF) is rich in functional components such as polyphenols. In this study, we investigated the effects of LCF extract on the gut microbiota of BALB/c mice, especially in an allergic disease model. Six-week-old female BALB/c mice were divided into four groups: a control group, an LCF extract-administered group, an OVA-sensitized group, and an OVA-sensitized + LCF extract-administered group. Each group was orally administered raw food or LCF extract. After 14 days, feces were collected aseptically from each mouse, DNA was extracted, and the 16S rRNA gene region was analyzed using a next-generation sequencer. In the LCF extract-administered group, the proportion of the Firmicutes phylum was significantly decreased and the proportion of the Bacteroidetes phylum tended to be significantly increased compared to the untreated group. A similar tendency was observed in the OVA-sensitized mice. However, in the OVA-sensitized + LCF extract-administered group, the proportion of Firmicutes increased and the proportion of Bacteroidetes decreased. We suggest that LCF extract significantly changes the composition of the intestinal microbiota of mice, especially in allergy model mice.

P2-026

Prevention of Fish skin Infections by Antimicrobial Bacteria isolated from fish Epidermal Mucus

○中谷 肇, 末武 直人, 塚本 裕也, 本間 道夫, 堀 克敏 (名大院・工・生命分子工学)

○Hajime Nakatani, Naoto Suetake, Yuya Tsukamoto, Michio Homma, Katsutoshi Hori (Dept. Mol. Eng., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

The bacteria that produce antimicrobial compounds have been studied for use as probiotics. In this study, we screened for bacteria with antimicrobial activity against fish pathogens and identified the bacterium, *Pseudomonas mosselii* KH-ZF1. Upon administration to fish, KH-ZF1 adhered temporarily to the epidermal mucus, leading to changes in the composition of the bacterial flora. Zebrafish infected with *Yersinia ruckeri* and treated with KH-ZF1 exhibited higher survival rates under the specific condition. KH-ZF1 became dominant in the bacterial flora of the epidermal mucus, inhibiting the growth of *Y. ruckeri* in the mucus, though in a certain condition, *Y. ruckeri* was able to prevail. These results suggest that the microbial substitution triggered by KH-ZF1 in the epidermal mucus influences zebrafish mortality during infection. The antimicrobial compound produced by KH-ZF1 was identified as Fluviol C (FluC). FluC inhibited the growth of several fish pathogens at low concentrations, and promoted microbial substitution in the epidermal mucus when administrated to zebrafish. In conclusion, our findings show that microbial substitution induced by KH-ZF1 in the epidermal mucus bacterial flora can effectively prevent infections and inhibit pathogen growth without causing toxicity. FluC produced by KH-ZF1 promotes microbial substitution.

P2-027

腋臭症に関連する皮膚常在細菌に対する次世代ファージ療法の開発

○藤本 康介^{1,2}, 植松 智^{1,2} (¹大阪公大・医・ゲノム免疫, ²東大医科研・メタゲノム医学)

Development of phage therapy against skin-resident bacteria associated with axillary odor

○Kosuke Fujimoto^{1,2}, Satoshi Uematsu^{1,2} (¹Dept. Immunol. Genom., Sch. Med., Osaka Met. Univ., ²Div. Metagenome Med., HGC, IMS, UTokyo)

腋臭は腋窩汗中のアポクリン腺分泌物を皮膚常在細菌が代謝することで生じる。日本人男性の腋臭は臭気判定士により7つのタイプに分類できる。ミルク様臭 (M型) が最も臭いが弱く、カレースパイス様臭 (C型) が最も臭いが強い。腋臭症の特徴的な臭いであるC型腋臭の発生機序を解明するため、C型腋臭11人 (以下C群) とM型腋臭9人 (以下M群) に対して、腋窩汗のメタボローム解析と腋窩皮膚細菌叢のメタゲノム解析を行った。メタボローム解析では、臭気物質やその前駆体がC群で有意に多く検出された。メタゲノム解析では *Staphylococcus hominis* を中心とする *Staphylococcus* 属細菌がC群で多い傾向にあった。さらに臭気物質の産生に関連する遺伝子を検索したところ、*S. hominis* の持つ臭気物質関連遺伝子がC群で有意に多かった。これらの結果から *S. hominis* がC型腋臭の治療標的と考えられるが、抗菌薬は他の常在菌にも広く影響するため適さない。そこで、菌特異的な特性を持つファージ由来の溶菌酵素 (エンドライシン) を用いた次世代ファージ療法に着目した。*S. hominis* のメタゲノムデータから、ファージ由来のエンドライシン候補配列を特定し、合成に成功した。このエンドライシンは *S. hominis* を特異的に溶菌し、他の主な皮膚常在菌には影響しなかった。以上から、このエンドライシンが皮膚の *S. hominis* を特異的に制御することで、腋臭の原因となる代謝物の生成を抑制できる可能性が示唆された。

P2-028/FL3-05

【演題取り下げ】

【Withdrawn】

P2-029/FL3-06

ショットガンメタゲノム解析を用いたタイ小児の口腔細菌叢における薬剤耐性遺伝子の検出

○小林 桃子^{1,2}, Lapidattanakul Jintana³, 大野 誠之¹, 元岡 大祐⁴, Tansriratanawong Kallapat⁵, Tantivitayakul Pornpen³, Smutkeeree Apiwan⁶, 川端 重忠^{1,7}, 山口 雅也² (¹阪大・院歯・微生物, ²医薬基盤・健康・栄養研, ³Dept. Oral Microbiol., Mahidol Univ., ⁴阪大・OUBIC, ⁵Dept. Oral Med. Periodontol., Mahidol Univ., ⁶Dept. Pediatr. Dent., Mahidol Univ., ⁷阪大・CiDER)

Metagenomic detection of antimicrobial resistance genes in the oral microbiome of Thai children

○Momoko Kobayashi^{1,2}, Lapidattanakul Jintana³, Masayuki Ono¹, Daisuke Motooka⁴, Tansriratanawong Kallapat⁵, Tantivitayakul Pornpen³, Smutkeeree Apiwan⁶, Shigetada Kawabata^{1,7}, Masaya Yamaguchi² (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Dent., ²NIBIOHN, ³Dept. Oral Microbiol., Mahidol Univ., ⁴OUBIC, ⁵Dept. Oral Med. Periodontol., Mahidol Univ., ⁶Dept. Pediatr. Dent., Mahidol Univ., ⁷CiDER, Osaka Univ.)

現在、薬剤耐性菌の増加が世界的な問題となっている。抗菌薬の使用量が多い国の1つであるタイは日本との交流が深く、薬剤耐性遺伝子が常在微生物叢にどの程度存在しているかという情報は、耐性遺伝子の拡大を防ぐ上で重要である。本研究では、タイの健康な小児の常在口腔細菌叢について、薬剤耐性遺伝子の分布をショットガンメタゲノム解析により明らかにすることとした。タイの全身状態が健康な3~4歳の小児95人から唾液および歯面プラークを採取し、ショートリードシーケンサーによるショットガンメタゲノム解析を行った。得られたリード配列情報からメタゲノムアセンブリツールを用いて contig を作成し、binning によって Metagenome assembled genome (MAG) を構築した。ゲノム品質評価ツール checkM2 によって、推定ゲノムの完全性が50%以上、かつコンタミネーション率が5%以下のMAGを中程度以上の品質とした。その結果、中程度以上の品質であるMAGを、唾液とプラークからそれぞれ862個および1,188個得た。微生物ゲノムデータベース GTDB-tk による分類の結果、唾液とプラークでは共通して Actinomycetota 門、Bacteroidota 門の存在率が高く、全体の45%を占めていた。次に、薬剤耐性遺伝子データベースを用いて耐性遺伝子の分布検索したところ、すべての小児の口腔から何らかの薬剤耐性遺伝子が検出された。特に、β-ラクタマーゼをコードする *cfxA* とアミノグリコシドホスホターゼをコードする *aph(3')-IIIa* は約9割の小児から検出された。本研究より、タイの健康な小児の唾液およびプラークには薬剤耐性遺伝子が広く分布していることが示唆された。

P2-030

スマホ画面およびエレベータボタンに付着・生息する細菌バイオフィーム解析

○加藤 優希¹, 涌井 杏奈^{1,2}, 関口 未来¹, 河内 美帆^{1,3}, 今井 真奈美¹, 佐藤 遥菜¹, 岡部 璃佳¹, 成瀬 悠香¹, 鷲尾 純平⁴, 佐藤 拓一¹ (新潟大・院保・臨床化学, ²新潟医福大・医療技術, ³日本歯科大・新潟生命歯・病理, ⁴東北大・院歯・口腔生化学)

Bacterial biofilm profiles on the surface of smartphone touchscreen and elevator buttons

○Yuki Kato¹, Anna Wakui^{1,2}, Mirai Sekiguchi¹, Miho Kawachi^{1,3}, Manami Imai¹, Haruna Sato¹, Rika Okabe¹, Yuka Naruse¹, Jumpei Washio⁴, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare, ³Dept. Pathol., Nippon Dent. Univ. at Niigata, ⁴Div. Oral Ecol. Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. Dent.)

【目的】 スマホ画面やエレベータボタンに付着する細菌を分子生物学的に解析し、手指の常在皮膚細菌叢との関連について解析を試みた。

【方法】 インフォームドコンセントを得た、研究室の学生7名を被験者とした。通常使用しているスマホ画面から滅菌綿棒で擦過し、緩衝液に懸濁し、試料とした。また利き腕の5本の指先からも試料を採取した。試料を分散均一化後、CDC血液寒天平板に接種し、37°Cで嫌気および好気培養を行い、細菌量を算定した。得られたコロニーを純培養し、genomic DNAを抽出し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。研究室様のエレベータボタンについても同様に試料採取・解析を行った。

【結果】 スマホ画面からは、嫌気培養で $(2.3 \pm 2.7) \times 10^2$ CFU/mLの細菌が検出され、好気培養では $(7.2 \pm 10.0) \times 10^1$ と少なかった。細菌構成は *Cutibacterium acnes* (65.6%), *Streptococcus* (13.3%), *Staphylococcus* (5.0%)が優勢であった。指先の細菌量は嫌気培養で $(3.3 \pm 4.7) \times 10^3$ であったのに対して、好気培養では $(6.5 \pm 9.5) \times 10^2$ と少なかった。細菌構成は *C. acnes* (74.1%), *Staphylococcus* (22.8%)が優勢であった。エレベータの開閉ボタン (3ヶ所) からは嫌気培養で $5.0 \times 10^1 \sim 5.5 \times 10^2$ の細菌が検出され、その細菌構成は *C. acnes* (80.0%), *Staphylococcus* (16.9%)が優勢であった。

【考察】 スマホ画面は清拭などを施していないにもかかわらず、指先の十分の一程度と細菌量が少なかった。エレベータボタンについても同様に少なく、日常的に手指で触れていても、スマホ画面やエレベータボタンといった物体の表面は、さほど細菌が生息するには適していないことが窺えた。

P2-031/FL3-07

腸管粘膜近傍細菌 *Adlercreutzia* は大腸炎緩和作用を持つ

○楊 佳約¹, 尾花 望^{2,3}, 中藤 学⁴, 野村 暢彦³, 福田 真嗣^{1,2,4,5,6} (慶大・先端生命研, ²筑波大・医学医療系・TMRC, ³筑波大・生命環境系, ⁴神奈川産技総研, ⁵順大・院・医, ⁶株式会社メタジェン)

Intestinal mucosa-associated bacteria *Adlercreutzia attenuates colitis*

○Jiayue Yang¹, Nozomu Obana^{2,3}, Gaku Nakato⁴, Nobuhiko Nomura³, Shinji Fukuda^{1,2,4,5,6} (¹Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., ²TMRC, Inst. Med., Univ. of Tsukuba, ³Inst. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba, ⁴KISTEC, ⁵Grad. Sch. Med., Juntendo Univ., ⁶Metagen. Inc.)

ヒト腸管内には多種多様な腸内細菌が生息しており、それらが産生する様々な代謝物質が人体に影響を与えることが報告されている。腸内細菌は腸管内の粘液層でバイオフィームを形成することが知られており、特に粘液層付近に局在する腸内細菌も宿主に影響を与えることが報告されていることから、その機能理解は重要である。これまでの腸管粘膜近傍細菌叢の解析では、腸管組織の採取といった侵襲的な手段が必要であった。そこで、本研究では非侵襲的な採取を実現するために便に着目した。細菌叢解析の結果から、便表面と大腸粘膜近傍の細菌叢は類似しており、便を用いることで大腸粘膜近傍の細菌叢を経時的に解析可能であることを明らかにした。本手法により大腸の炎症と逆相関する新規の粘膜局在細菌属 *Adlercreutzia* を同定した。当該細菌属の基準株を定着させたノットバイオームマウスを作成し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて実験的に大腸炎を起こさせたところ、同菌は大腸炎緩和作用を有することが明らかとなった。盲腸内容物のメタボローム解析から腸内でタウリン量が増加していることが明らかとなった。タウリンを経口投与した無菌マウスはDSS大腸炎の緩和作用を示したことから、同菌は腸管内でタウリン量を増加させることで、大腸炎を緩和することが示唆された。腸管内のタウリンは腸内細菌が有する胆汁酸脱抱合酵素によって抱合型胆汁酸より生産される。In vitro 試験により、同菌の胆汁酸脱抱合酵素はその他の腸内細菌由来酵素と比較してその活性が格段に高いことが明らかとなった。したがって同菌の高い胆汁酸脱抱合作用は大腸炎緩和に有用であると考えられる。

P2-032/FL3-08

Time-Series Causal Discovery Reveals the Ecological Importance of Patescibacteria (CPR)

○島 玄太¹, 東樹 宏和¹, 鈴木 健大² (¹京大・生命・統合生命, ²理研・BRC・統合情報)

○Genta Shima¹, Hirokazu Toju¹, Kenta Suzuki² (¹Div. Integr. Life Sci., GSB, Kyoto Univ., ²Integr. Bioresour. Info. Div., BRC, RIKEN)

Bacterial communities composed of numerous species are expected to exhibit complex interactions. Understanding these interactions is essential for maintaining and managing communities. However, the complexity of community composition makes interaction analysis challenging. Time-series causal discovery based on long-term data offers a promising approach to overcome this complexity. One such method, the Granger causality test, estimates causality (Granger causality) by examining whether one time-series variable can predict another variable. By utilizing neural networks, which excel in time-series prediction, it is possible to estimate Granger causality in a model-free manner. In this study, we tracked the bacterial community dynamics in 5 eel aquaculture tanks over one year. In addition, we collected time-series data on non-biological factors such as pH, water temperature, feeding amount, and eel population. Applying time-series causal discovery to these datasets, we constructed "causal networks". These networks revealed that "eel population", "feeding amount", and Patescibacteria (Candidate Phyla Radiation: CPR) were key regulatory factors influencing community dynamics. Some OTUs of Patescibacteria have interactions with many hosts. These findings suggest that Patescibacteria, despite being poorly understood ecologically, may play a significant role in ecosystems.

P2-033

Bacteriophages as a tool for reducing target bacteria while preserving microbial diversity

○Priyanka Baranwal¹, 宮永 一彦¹, 相羽 由詞¹, 渡邊 真弥¹, XinEe Tan¹, Srivani Veeranarayanan¹, Huong Minh Nguyen¹, 佐々木 一雅¹, 崔 龍洙¹ (¹Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

○Priyanka Baranwal¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Yoshifumi Aiba¹, Shinya Watanabe¹, XinEe Tan¹, Srivani Veeranarayanan¹, Huong Minh Nguyen¹, Kazumasa Sasaki¹, Longzhu Cui¹ (¹Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Dept. Inf. Immunity., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Obesity, affecting 43% of adults as overweight and 16% as obese (WHO, 2024), is linked to dysbiosis, with *T. ramosa* identified as a key contributor. Current approaches, such as FMT, antibiotics, and antibody-based treatments, are often unpredictable and risky, highlighting the need for safer, targeted alternatives. This study investigates the potential of bacteriophages (phages) as precision tools to combat target bacteria while preserving gut microbiota diversity. We isolated ten phages (phiTR001 to phiTR010) from JMU hospital sewage and characterized their host specificity and antibacterial activity. Among these, phiTR001 and phiTR004 showed high infection rates. In vitro, they inhibited *T. ramosa* growth in isolated cultures and complex gut microbiota, with efficacy dependent on the multiplicity of infection (MOI). In vivo studies using murine models revealed that a single dose of a phiTR001-phiTR004 phage cocktail significantly reduced *T. ramosa* levels throughout the gut while preserving gut microbiota diversity, outperforming antibiotics. These findings highlight the transformative potential of phage therapy as a targeted, microbiota-sparing strategy for obesity management. By selectively targeting obesogenic bacteria like *T. ramosa*, phage-based treatments offer a safe and effective alternative for managing obesity and other gut-related disorders.

P2-034

機能性不織布マスクに付着・生息する細菌バイオフィーム解析

○関口 未来¹, 佐野 拓人^{1,2}, 涌井 杏奈^{1,3}, 加藤 優希¹, 河内 美帆¹, 今井 真奈美¹, 佐藤 遥菜¹, 岡部 瑠佳¹, 成瀬 悠香¹, 佐藤 拓一¹ (新潟大・院保・臨床化学, ²日本歯科大・新潟生命歯・病理, ³新潟医福大・医療技術)

Bacterial biofilm profiles on the surface of multifunctional non-woven fabric masks

○Mirai Sekiguchi¹, Hiroto Sano^{1,2}, Anna Wakui^{1,3}, Yuki Kato¹, Miho Kawachi¹, Manami Imai¹, Haruna Sato¹, Rika Okabe¹, Yuka Naruse¹, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Pathol., Nippon Dent. Univ. at Niigata, ³Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare)

【目的】機能性（抗菌性）マスクの細菌叢を分子生物学的に解析し、通常の不織布マスクと比較し、マスク用スプレーの併用についても検討した。【方法】研究室の学生 12 名からインフォームドコンセントを得て、機能性マスク（バイロン PL Pro マスク；シオノギヘルスケア）を半日着用後、内側を滅菌綿棒で擦過し、緩衝液に懸濁し試料とした。別日に、同社製のマスク用スプレー（マジッシュ）を噴霧し、1 晩陰干し後、試料採取した。試料を CDC 血液寒天平板上で嫌気培養し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種を同定した。ゲノムリード（株）にて NextSeq1000（イルミナ社）によってメタゲノム解析を行った。【結果】半日着用した不織布マスクから口唇部分と同程度の細菌量 [$2.0 \pm 0.6 \times 10^4$] が検出された例（同程度群）もあったが、大半 ($n=8$) が少なめであった [$(3.6 \pm 3.0) \times 10^3$]。機能性マスクでは細菌量は $1/3 \sim 1/7$ となり、スプレー併用で著減した。細菌構成は同程度群では *Cutibacterium* が 9 割以上で、少ない群では不織布マスク、機能性マスク各々で *Cutibacterium* (54.5%, 24.2%), *Staphylococcus* (29.8%, 45.3%) などであった。機能性マスクのメタゲノム解析で、同程度群、少ない群各々で *Cutibacterium* (62.1%, 16.7%), *Streptococcus* (9.3%, 31.7%), *Staphylococcus* (8.0%, 2.8%) の他、少ない群で *Neisseria* (6.1%), *Rothia* (5.8%), *Haemophilus* (5.8%), *Staphylococcus* (2.8%), *Veillonella* (2.6%), *Granulicatella* (2.3%), *Actinomyces* (2.2%) 等が優勢と多様であった。【考察】不織布マスクに付着・生息する細菌量は口唇より少なく、また機能性マスクおよびスプレーの併用でより少なくなる傾向であることが判明した。

P2-035

ペットボトル紅茶および珈琲飲料の細菌プロファイリング：ミルク添加の影響

○佐藤 遥菜¹, 河内 美帆¹, 涌井 杏奈^{1,2}, 今井 真奈美¹, 加藤 優希¹, 岡部 瑠佳¹, 成瀬 悠香¹, 諸橋 もも子¹, 浅野 七海¹, 佐藤 拓一¹ (新潟大・院保・臨床化学, ²新潟医福大・医療技術)

Bacterial profiling of the remaining bottled black tea and coffee beverages: Effects of adding milk

○Haruna Sato¹, Miho Kawachi¹, Anna Wakui^{1,2}, Manami Imai¹, Yuki Kato¹, Rika Okabe¹, Yuka Naruse¹, Momoko Morohashi¹, Nanami Asano¹, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare)

【目的】ペットボトル飲料を飲み残した際、口腔からの唾液の流入・汚染が懸念される。紅茶および珈琲ペットボトル飲料を対象に、唾液由来細菌の生育実験を実施し、ミルクあるいは糖質添加の影響を探索した。【方法】インフォームドコンセントを得た、研究室の学生 10 名から唾液を採取し細菌カウンタ（Panasonic 社）で細菌量を求め、市販の紅茶（4 種）および珈琲ペットボトル飲料（3 種）に唾液（ 10^3 台の細菌）を混入させた。37°C で 1 日置いた後、試料を採取し、CDC 血液寒天平板に接種し、37°C で 1 週間、嫌気培養し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。【結果】無糖の紅茶ペットボトル飲料（K 社）では殆ど細菌が検出されず、加糖（3.9%）の紅茶ペットボトル飲料で、検出された例でも $10^1 \sim 10^3$ 台であった。一方、ミルクやミルク加糖の紅茶ペットボトル飲料では、 10^7 台前後にまで増加した。その細菌構成は、各々（125 菌株, 175 菌株中）、*Streptococcus parasanguinis/salivarius* (66%, 69%), *S. mitis/oralis/sanguinis/infantis* (34%, 31%) が優勢菌であった。ミルクやミルク加糖の珈琲ペットボトル飲料（S 社）についても、各々（116 菌株, 65 菌株中）、*S. parasanguinis/salivarius* (35%, 63%), *S. mitis/oralis/sanguinis/infantis* (63%, 37%) と同様であった。【考察】無糖のペットボトル紅茶および珈琲飲料では細菌が増えにくく、加糖の効果も限定的であった。一方、ミルク添加で劇的に細菌量が増加し、その構成は唾液細菌（*Streptococcus*）であることが判明した。飲みかけの、ペットボトル紅茶および珈琲飲料の保存の可能性としては、無糖あるいは加糖のペットボトル飲料が保存および再飲用に適していると思われた。

P2-036/FL3-09

黄色ブドウ球菌の脂肪酸感受性と *Corynebacterium* 属細菌との共存関係に関する検討

○麻田 恭之^{1,2}, 大段 慶十朗^{1,3}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹¹, 朝川 美加李⁴, 久恒 順三⁵, 菅原 庸⁵, 竹下 徹⁴, 菅井 基行⁵, 小松澤 均¹ (広島大・医系科学研究科・細菌学, ²広島大・医系科学研究科・口腔腫瘍制御学, ³広島大・医系科学研究科・口腔外科学, ⁴九州大・院歯学研究院・口腔予防医学分野, ⁵国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Investigation of the coexistence relationship between *S.a* fatty acid resistance and *Cb* bacteria

○Yasuyuki Asada^{1,2}, Keijuro Ohdan^{1,3}, Yujin Suzuk¹, Miki Kawada-Matsuo¹, Mikari Asakawa⁴, Junzo Hisatsune⁵, Yo Sugawara⁵, Toru Takeshita⁴, Motoyuki Sugai⁵, Hitoshi Komatsuzawa¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Oral Oncology., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Dept. Oral and Maxillofacial Surgery., Grad. Sch. of Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ⁴Dept. Oral Preventive Medicine., Grad. Sch. of Dental Sci., Kyushu Univ., ⁵Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Inst. Infectious Diseases)

【背景】黄色ブドウ球菌（Sa）はヒトの鼻腔や口腔の常在細菌である。Sa 同様、鼻腔内に常在する *Corynebacterium* 属（Cb）は、生体のトリグリセリドを分解し脂肪酸を産生し、化膿レンサ球菌や Sa の増殖を阻害することが報告されている。本研究は、鼻腔・口腔由来の Sa 株の脂肪酸感受性の多様性を検証し、Sa と Cb との関連性について明らかにすることを目的とする。【方法】鼻腔・口腔から分離した Sa 171 株と、Cb 86 株を用いた（広島大学倫理委員会承認：E-2525）。Sa および Cb における脂肪酸であるリノール酸（LA）およびパルミトオレイン酸に対する最小発育阻止濃度（MIC）および Cb については脂肪酸要求最小濃度も判定した。また、脂肪酸の増殖への影響について検証した。【結果】Sa において、脂肪酸感受性は菌株により異なっていたが、鼻腔由来株は口腔由来株に比べ感受性が低い傾向を認めた。また、MRSA はメチシリン感受性菌に比べて LA の感受性が低い傾向を認めた。同一被験者での鼻腔および口腔分離株を比較すると、鼻腔由来株で脂肪酸感受性が低い傾向を認めた。Cb においては、菌株・菌種により脂肪酸感受性および要求性は異なっていた。また、sub-MIC 濃度の脂肪酸により Sa の増殖抑制が認められた。【考察】Cb が産生する脂肪酸の Sa に与える影響は、菌種間の相互作用や発育環境に依存する可能性が示唆された。今後は、脂肪酸感受性に影響を及ぼす遺伝的背景や Cb との相互作用を詳細に解析することで、Sa の鼻腔への定着機序の解明につながり、新たな感染制御の戦略を確立することが期待される。

P2-037

Characterization of oral and nasal microbiota and factors associated with their uniqueness

○朝川 美加李¹, 川柳 智暉^{2,3}, 影山 伸哉¹, 松尾（川田）美樹², 柴 秀樹³, 小松澤 均², 竹下 徹¹ (九州大・院歯・口腔予防, ²広島大・医系科学研究科・細菌, ³広島大・医系科学研究科・歯髄生物)

○Mikari Asakawa¹, Tomoki Kawayanagi^{2,3}, Shinya Kageyama¹, Miki Kawada-Matsuo², Hideki Shiba³, Hitoshi Komatsuzawa², Toru Takeshita¹ (¹Sect. Prevent. Dent. Public Health., Grad. Sch. Dent., Kyushu Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ³Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

The oral and nasal cavities are neighboring and connected via the pharynx, but colonized by distinct microbial consortia. In this study, we aimed to characterize the tongue and nasal microbiota divergence and investigate factors associated with their uniqueness. The tongue and nasal microbiota were collected from 461 patients who visited dental clinics in Hiroshima University Hospital and determined their bacterial composition based on amplicon sequencing of the 16S rRNA gene. Dissimilarities between overall composition of tongue and nasal microbiota were evaluated by using UniFrac distance metrics. The bacterial compositions of tongue and nasal microbiota were distinct, and their differences were primarily characterized by *Neisseria* and *Streptococcus* predominance on the tongue dorsum and *Corynebacterium* and *Staphylococcus* predominance in the nasal cavity. On the other hand, The tongue and nasal microbiota of the individuals with fewer teeth, inpatients, smoking experiences, and denture users exhibited significantly more similar bacterial composition enriched by indigenous taxa of the other site. Our study reveals decreased uniqueness of oral indigenous microbiota associated with oral and systemic conditions, suggesting a lower selection pressure in the oral niche. It might contribute to the ectopic colonization, as well as invasion of exogenous pathogens.

P2-038

Dietary protein alters gut microbiota composition and susceptibility to enteric bacterial infection

○井上 幸信^{1,2}, 金 倫基¹ (北里大・薬・微生物学, ²慶應義塾大・薬)

○Yukinobu Inoue^{1,2}, Yun-Gi Kim¹ (¹Dept. Microbiol. Pha., Kitasato Univ., ²Pha., Keio Univ.)

Objective: Dietary protein sources influence susceptibility to intestinal infections, but the mechanisms remain unclear. In this study, we examined how different protein sources impact enteric infection and analyzed gut microbiota composition to identify the bacteria associated with disease outcomes.

Methods: Mice were fed diets with different protein sources (P1-P4) and infected with *Citrobacter rodentium*, a bacterium that causes lethal dehydration through diarrhea. Survival rate, fecal water content, *C. rodentium* counts, and lipocalin-2 were measured. Gut microbiota was analyzed by 16S rDNA sequencing.

Results: The P3-fed group had a lower survival rate after *C. rodentium* infection and a higher pathogen load and fecal lipocalin-2 levels in the early phase of infection. Fecal water content was higher in the P3-fed group after the infection. The relative abundance of Lachnospirales decreased, and that of Bacteroidales increased in the P3-fed group. Treatment with antibiotics that eliminate Bacteroidales prevented a decrease in Lachnospirales and improved mouse survival.

Conclusion: P3 supplementation exacerbated *C. rodentium* infection. Changes in the gut microbiota, particularly a decrease in Lachnospirales and an increase in Bacteroidales, may contribute to susceptibility to infectious diarrhea.

P2-039

各種メーカーの濃い緑茶ペットボトル飲料内の細菌プロファイリング: スクリーニング実験

○今井 真奈美¹, 河内 美帆¹, 涌井 杏奈^{1,2}, 佐藤 遥菜¹, 加藤 優希¹, 岡部 璃佳¹, 成瀬 悠香¹, 浅野 七海¹, 鷲尾 純平³, 佐藤 拓一¹ (新潟大・院保・臨床化学, ²新潟医福大・医療技術, ³東北大・院菌・口腔生化学)

Bacterial profiling in catechin-enriched green tea bottled beverages: a screening experiment

○Manami Imai¹, Miho Kawachi¹, Anna Wakui^{1,2}, Haruna Sato¹, Yuki Kato¹, Rika Okabe¹, Yuka Naruse¹, Nanami Asano¹, Jumpei Washio³, Takuichi Sato¹ (¹Div. Clin. Chem., Niigata Univ. Grad. Sch. Health Sci., ²Dept. Med. Technol., Niigata Univ. Health Welfare, ³Div. Oral Ecol. Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. Dent.)

【目的】 各種ペットボトル飲料を対象に、唾液細菌の生育のスクリーニング実験を実施してきたが、特に緑茶ペットボトル飲料では旧 *Lactobacillus* が生育する例が見られた。カテキンが増量された緑茶ペットボトル飲料にスクリーニング対象を拡げ、保存・再飲用の可能性について探求した。

【方法】 インフォームドコンセントを得た、研究室の学生 10 名から唾液を採取し細菌カウンタで細菌量を求め、市販の緑茶 (3 種) およびカテキン増量の緑茶 (O 茶, I 茶, H 茶, A 茶, C 茶の 5 種) に唾液 (10^3 台の細菌) を混入させた。37°C で 1 日置いた後、試料を採取し、CDC 血液寒天平板に接種し、37°C で 1 週間、嫌気培養し、16S rRNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。

【結果】 緑茶 (3 種) では、 $10^4 \sim 10^5$ 台の細菌が生育したのに対し、カテキン増量の緑茶 (5 種) では大半が $10^1 \sim 10^3$ 台に生育が抑えられた。但し、唾液から *Limosilactobacillus* が検出された群で細菌量が多い傾向が見られた。その細菌量が多い群 (3 種の濃い茶; 各々 n=4, 3, 1) の細菌構成は、O 茶 (*Limosilactobacillus* 98.3%), I 茶 (*Streptococcus* 59.4%, *Limosilactobacillus* 27.5%, *Lactiplantibacillus* 10.1%, *Actinomyces* 2.9%), H 茶 (*Limosilactobacillus* 88.2%, *Lactiplantibacillus* 11.8%) であった。

【考察】 カテキン増量の緑茶では細菌が増殖しづらく、ペットボトル飲料の保存および再飲用に適している可能性が示唆された。中には *Limosilactobacillus* を主体として、通常の緑茶と同程度まで増殖する例があった。旧 *Lactobacillus* の生育に影響する酢酸を含む緑茶もあり、唾液中に *Lactobacillus* を多く含む人では再飲用に注意を払う必要があるのかもしれない。

P2-040

高脂肪食および幼若期アンピシリン暴露がマウス腸内環境と脂肪性肝疾患に及ぼす影響

石川 隆司¹, 仲村 真樹¹, 今大路 治之², 桑原 知巳², 獅々堀 正幹³, 清水 真佑子⁴, 櫻井 明子⁵, 〇片岡 佳子⁵ (徳島大・院・保健科学, ²香川大・医・分子微生物, ³徳島大・理工・人工知能, ⁴徳島大・医・疾患病理, ⁵徳島大・医 (保健)・微生物・遺伝子解析)

High-fat diet and antibiotic in early life affect gut environment and fatty liver disease in mice

Ryuji Ishikawa¹, Maki Nakamura¹, Haruyuki Imaohji², Tomomi Kuwahara², Masami Shishibori³, Mayuko Shimizu⁴, Akiko Sakurai⁵, 〇Keiko Kataoka⁵ (¹Grad. Sch. Health Sci., Tokushima Univ., ²Dept. Mol. Microbiol., Sch. Med., Kagawa Univ., ³Dept. Intelligent Systems, Sch. Sci. Tech., Tokushima Univ., ⁴Dept. Pathol. Lab. Med., Sch. Med., Tokushima Univ., ⁵Dept. Microbiol. Genetic Anal., Sch. Health Sci., Tokushima Univ.)

【目的】 マウスへの幼若期の抗菌薬アンピシリン (AMP) 暴露と 8 週齢からのウェスタンダイエット摂取が腸内環境に及ぼす影響と脂肪性肝疾患の発症との関連を検討した。**【方法】** C57BL/6J マウスに 8 週齢から 20 週間ウェスタンダイエット (Research Diet 社, D12079B) を自由摂取させるモデルを用い、一部マウスは出生直後から 3 週齢までの間に 1g/L AMP 水溶液を自由摂取させた。通常食のみの陰性対照群とウェスタンダイエット群, AMP 暴露+ウェスタンダイエット群について、4, 8, 28 週齢時の糞便菌叢構成の解析および菌種特異的 PCR による *Bifidobacterium* 属菌の定量を行い、菌叢の経時的な変化と 28 週齢時の脂肪性肝疾患の肝臓組織スコアとの相関の有無を検討した。**【結果と考察】** ウェスタンダイエット摂取マウスでは 28 週齢時の肝臓の NAS スコアが上昇し、AMP 暴露マウスの中には線維化まで進んだ個体も存在した。AMP 暴露群では 4 週齢時の菌叢構成の多様性が著しく減少し、8 週齢時でも菌叢の多様性の低さは続いていた。8 週齢からのウェスタンダイエット摂取したマウスの菌叢構成は陰性対照群とは大きく異なり、さらに AMP 暴露の有無によって異なっていた。4 週齢時の便中 *Bifidobacterium* 菌量は、組織スコアが高い個体で有意に少なく、4 週齢時の菌量と NAS スコアと線維化レベルを合わせた総スコアの間に有意な負の相関があった。以上の結果から、幼若期の腸内環境の dysbiosis (多様性の低下や *Bifidobacterium* 属菌がいらない) が脂肪肝炎の進展に影響するものと考えられる。

P2-041/FL3-10

Development of a Mouse Model to Evaluate Wild-Type Phages in Eliminating Enterotoxigenic *B. fragilis*

○ホセイン エムディ ラジブ, Mahmoud Arbaah, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Priyanka Baranwal, 崔龍洙 (自治医科大・細菌学)

○Md Razib Hossain, Mahmoud Arbaah, Yoshifumi Aiba, Shinya Watanabe, Kazuhiko Miyanaaga, XinEe Tan, Srivani Veerananarayanan, Priyanka Baranwal, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Sch. Medicine, Jichi Medical Univ.)

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) is implicated in the development of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. However, current technologies are unable to specifically eliminate target bacteria from the intestinal microbiota without inducing dysbiosis. This study aimed to establish a method for evaluating the bactericidal activity of wild-type phages against ETBF using a mouse infection model. The wild-type phage (Φ12-7), targeting ETBF, was isolated from the Jichi Medical University sewage plant and exhibited a host range of 79% (33 out of 42 strains). To enable in vivo evaluation, a rifampicin-resistant *B. fragilis* (BF12) was generated. Mice were inoculated with 10^8 CFU of BF12 at 24-h intervals over a 72-h. Subsequently, wild-type phage Φ 12-7 was administered at multiplicities of infection (MOIs) of 10 and 100 at 8-h intervals over a 48-h. Fecal samples were collected at every 24-h from the start of bacterial administration to monitor bacterial loads. Phage treatment resulted in a significant reduction in BF12 numbers within 24-h. These findings underscore the potential of phage therapy to selectively target pathogenic bacterial strains without disrupting overall balance of the gut microbiome. This approach provides a promising foundation to selectively eliminate target bacteria while preserving the beneficial microbiome essential for overall health.

P2-042/FL3-11

ウシ消化管内における大腸菌の空間的分布と多様性

○井口 純¹, 小野 雅弥², 菊地 泰生² (¹宮崎大・農・動植物資源生命, ²東大・新領域)

Spatial distribution and diversity of *Escherichia coli* in the bovine gastrointestinal tract

○Atsushi Iguchi¹, Masaya Ono², Taisei Kikuchi² (¹Fac. Agr., Miyazaki Univ., ²Grad. Sch. Front. Sci., Tokyo Univ.)

【目的】宿主が保有または排菌する細菌の検査や調査では、通常、便や直腸スワブが検体として用いられるが、それらに含まれる細菌が消化管のどこに由来するのかは不明である。ウシの消化管では、それぞれの部位で特有の細菌叢を構成していると予想されるが、その詳細はほとんど分かっていない。そこで本研究ではウシ一頭の消化管（全長約50m）を丸ごと用いて、各所における細菌叢の解析と大腸菌に注目した空間的分布と多様性について調べた。【材料・方法】県内食肉処理場において解体された乳用牛一頭の消化管（第一胃から肛門まで）を取得し、計20箇所から内容物を採取した。検体からDNAを抽出し、メタ16S rRNA解析（V3-V4領域）を行った。さらに、検体をDHL寒天平板培地に塗抹して培養し、生育した大腸菌様のコロニーを各検体のにつき最大20個鉤菌し、それぞれの血清型遺伝子型（Og型）をPCR法で判定した。並行して、検体をmEC液体培地に接種し、培養液から精製したDNAを用いて病原性遺伝子を確認した。陽性となった培養液をDHL寒天平板培地に塗抹して培養し、上記遺伝子保有株の単離を試みた。【結果・考察】第一胃から第二胃（上流）および盲腸以下（下流）の検体からは多数の大腸菌が単離できたのに対し、第三胃から盲腸まで（中流）の検体からは単離できないか僅かな大腸菌しか単離できなかった。上流から単離された80株は13種類のOg型に分離され、下流から単離された120株は3株を除く全てがOgGp7（O2またはO50）であった。以上の結果より、上流には多様な大腸菌が存在し、下流には特定クローン株が優勢して定着していると示唆された。本会では菌叢解析と病原大腸菌分布の結果も含めて発表したい。

P2-043

沖縄県長寿村における腸内細菌叢の世代間伝播と長寿との関連性

○與古田 英裕¹, 伊波 幸紀¹, 村山 裕子¹, 石田 明夫², 池松 真也¹ (¹沖縄高専・生物資源, ²琉球大・医)

Relationship between intergenerational transmission of gut microbiome and longevity in Okinawa

○Hidehiro Yokoda¹, Yukitoshi Iha¹, Yuko Murayama¹, Akio Ishida², Shinya Ikematsu¹ (¹Dept. Bioresource Engr., NIT, Okinawa College, ²Med., Ryukyu Univ.)

沖縄県は、「ブルーゾーン」と呼ばれる世界の5大長寿地域の1つであり、その生活習慣や食事などの「長寿の秘訣」に世界中の注目が集まっている。我々は沖縄県の北部に位置する「日本一長寿の村」大宜味村と、中部に位置し2021年に女性の平均寿命日本一となった北中城村に住む長寿者の腸内細菌叢に注目した。既に、大宜味村の長寿者についての先行研究(Morita, Hら)¹⁾により、大宜味村に住む女性長寿者の腸内細菌叢には *Akkermansia muciniphila* の存在比が多いことが明らかとなっている。本研究では、大宜味村および北中城村の長寿者、子（孫）において長寿菌 *Akkermansia* が世代を越えて伝播しているのか、各地点の長寿者の腸内細菌叢の特徴と「長寿のカギ」に結びつく腸内細菌群を明らかにすることを目的とした。大宜味村長寿者（≥80歳）は日本人長寿者データセット²⁾の高齢者（85-89歳）よりも *Akkermansia* 科の占有率が高かった。一方、北中城村長寿者も同様に有意に高く、この事象は、大宜味村特有ではなく沖縄の長寿者にて多い可能性が示唆された。一方、大宜味村長寿者は子世代と比較し *Lactobacillus* 属の占有率が高く、北中城村の長寿者と比較しても有意であった。また、食事調査では特定の食物の摂取頻度が多い大宜味村長寿者にて *Lactobacillus* 属の占有率が高いことが示された。

1) Morita, H et al. Gut microbial composition of elderly women born in the Japanese longevity village Ogimi. Bioscience of microbiota, food and health, 40(1) (2021).

2) Sato, Yuko et al. Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. Nature vol. 599 (2021).

P2-044

硫黄獲得経路は植物中において細菌に適応的利点をもたらす

○石川 一也¹, 山口 咲季¹, 角田 誠², 古田 和幸¹, 垣内 力¹ (¹岡山大学・院医歯薬, ²東大・院薬)

Sulfur-acquisition pathways confer a fitness advantage to bacteria in plant tissue

○Kazuya Ishikawa¹, Saki Yamaguchi¹, Makoto Tsunoda², Kazuyuki Furuta¹, Chikara Kaito¹ (¹Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Pharm., Tokyo Univ.)

細菌と植物は、農業、産業、公衆衛生などで人間社会に多面的に関与しており、細菌が植物中で増殖するための普遍的な要因を知ることは重要である。細菌は進化の過程で、それぞれの主要な生息環境で効率よく生育するための栄養利用システムを発達させてきた。しかし、植物中で必要な栄養利用能はほとんど明らかになっていない。我々は、植物中で必要な増殖に関わる遺伝子を調べるために、V8野菜ジュースを基にした培地（V8培地）を用いて大腸菌遺伝子欠損ライブラリーをスクリーニングした。その結果、硫酸同化経路を欠損しシステインへ硫黄を供与できなくなると、V8培地での生育が大きく低下することがわかった。V8培地や多くの野菜は遊離システイン含量が低かった。さらにV8培地中では、動物病原細菌の宿主体内における主要システイン源であるグルタチオンの利用能が阻害された。このことから植物組織液中では、硫酸イオンが大腸菌のほぼ唯一の硫黄源となっており、硫酸同化経路を欠損するとシステイン欠乏により生育ができなくなることが示唆された。その他の細菌属について調べると、硫酸同化経路を持たない黄色ブドウ球菌はV8培地で生育が大腸菌よりも弱く、硫酸同化経路に加えてメチオニンからもシステインに硫黄を供与できる枯草菌はV8培地での生育が大腸菌よりも良好だった。細菌全体についての硫酸同化経路とメチオニンからシステインに硫黄を供与する経路の有無を調べると、植物を主要な生息環境とする細菌種でこれらの経路を有する頻度が有意に高かった。以上のことから、システイン合成のための硫黄獲得経路が植物での細菌の生育に大きく寄与していることが示唆された。

P2-045

培養条件の違いによる細菌のポルフィリン生成および光不活性化作用への影響

○加藤 久登, 太田 実由, 大谷 陽希, 増田 和文 (就実大・薬・薬品物理化学)

Effects of incubation conditions on bacterial porphyrin production and photoinactivation

○Hisato Kato, Miyu Ohta, Haruki Ohtani, Kazufumi Masuda (Sch. Pharm., Shujitsu Univ.)

【目的】緑膿菌は自身が産生するポルフィリンにより光不活性化し、また、ポルフィリン産生量が少ない細菌は、5-アミノレブリン酸（ALA）を投与することで光不活性化を起こす。しかし、細菌の培養条件の違いにより光不活性化作用の強さに差が生じることが示唆されている。そこで、本研究では培養条件の違いが光不活性化作用へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、異なる振盪速度による振盪培養および、静置培養で培養したときの細菌のポルフィリン産生量および光不活性化作用を評価した。【方法】細菌として、緑膿菌（PAO1株）、大腸菌（W3110株）および黄色ブドウ球菌（209P株）を用いて、振盪培養（振盪速度 30～90 回/分）または静置培養を行った。ALAを添加する場合は、培養開始時に培地へ1 mMのALAを添加した。ポルフィリン産生量は菌懸濁液からポルフィリンを抽出し、蛍光光度計を用いて定量した。光不活性化作用は、殺菌作用および細胞膜損傷作用の観点から、それぞれ生存率およびK⁺流出率を測定した。【結果】緑膿菌はALA非添加時および添加時において、いずれもポルフィリン産生量および光不活性化作用に有意な差が生じる培養条件が存在した。大腸菌および黄色ブドウ球菌はALA添加時にのみポルフィリンの産生がみられた。これらの菌種においては、大腸菌では静置培養時にポルフィリン産生量の顕著な増加がみられ、また、黄色ブドウ球菌では低振盪速度下でポルフィリン産生量が著しく低下した。これらの結果から、細菌が産生するポルフィリンによる光不活性化作用は、培養条件の影響を強く受けることが示され、実験系の設定には十分な考慮が必要であることが示唆された。

P2-046

迅速発育性抗酸菌 *Mycobacterium abscessus* species の休眠移行性の亜種間差異

○森重 雄太¹, 村瀬 良朗¹, 御手洗 聡^{1,2} (¹結研・抗酸菌, ²長崎大院・医歯薬・基礎抗酸菌症)

Inter-subspecific differences in dormancy of *Mycobacterium abscessus* species via hypoxic stress

○Yuta Morishige¹, Yoshiro Murase¹, Satoshi Mitarai^{1,2} (¹Dept. Mycobac. Ref. Res., Res. Inst. Tubercul., JATA, ²Dept. Basic Mycobacteriol., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ.)

【背景】近年急速に罹患者数が増加している非結核性抗酸菌症の休眠現象に関する知見は少ない。今回、我々は結核菌の休眠誘導実験系である段階的低酸素曝露法を応用し、一般的薬剤への耐性から難治性となりやすい迅速発育性抗酸菌 *Mycobacterium abscessus* species (MABS) を構成する3亜種 *abscessus* (Mabs), *boletii* (Mbol), *massiliense* (Mmas) の休眠誘導実験系を構築したので、報告する。

【方法】ガラス製共栓三角フラスコに、ヘッドスペース比0.5でDubos Tween-Albumin培地を分注し、対数増殖期のMABS 3亜種をOD₆₀₀=0.004で接種し、天然ゴム製のセプタムで密閉した。対照群はガス交換を可能とした。PTFE回転子を用いて37°C 130 rpmで培養し、培地に添加したメチレンブルーの退色を確認した8日目をエンドポイントとした。また、MABSの治療に使用される抗菌薬Amikacinを最終濃度256 µg/mLとなるように培養開始8日目で添加し、上記の条件でさらに3日間培養し、CFUを測定することでAmikacin感受性の差異を解析した。

【結果】3亜種全てにおいて対照群に対する被験群の増殖は抑制された。しかし、結核菌の休眠状態の指標である抗酸性の消失を評価したところ、MabsとMbolではそれぞれ46.5±17.3%及び68.3±15.5%の菌が抗酸性を失っていたが、Mmasでは19.6±19.9%にとどまっていた。また、Amikacin感受性の差異をコロニー形成能を指標に解析した所、被験群は大部分が生残した。

【考察】MABSも結核菌同様に休眠し、それらの休眠移行性には亜種間差異がある可能性が考えられる。現在、3亜種の通常酸素条件および低酸素条件における菌体表面の超微形態学的解析及び表面脂質の構成成分の分析を進めている。

P2-047

抗生物質 Acyldepsipeptide¹ (ADEP1) による枯草菌 ClpP プロテアーゼの活性化機構の研究

○本間 道夫^{1,4}, 石川 文洋², 高橋 幹士¹, 高屋 明子³, 田邊 元三², 内橋 貴之¹ (¹名古屋大・院理・物理, ²近畿大・薬・医療薬学, ³千葉大・院薬・生命薬学, ⁴名古屋大・院工・生命分子工学)

Activation mechanism of *B. subtilis* ClpP protease by antibiotics Acyldepsipeptide 1 (ADEP1)

○Michio Homma^{1,4}, Fumihiko Ishikawa², Kanji Takahashi¹, Akiko Takaya³, Genzoh Tanabe², Takayuki Uchihashi¹ (¹Div. Material Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., ²Fac. Pharmacy, Kinki Univ., ³Grad. Sch. Pharma. Sci., Chiba Univ., ⁴Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

タンパク質の恒常性は生命活動の維持をするうえで非常に重要であり、合成と分解によって保たれている。原核生物や真核生物の細胞小器官に、セリンプロテアーゼ部分とATPaseから構成されるタンパク質分解複合体Clp (Chaperonin-linked-protease)が存在している。枯草菌では、リング構造を形成するClpPプロテアーゼとATPaseのClpXが結合し、ATPaseが特定のタンパク質を選択的にほぐしながらClpP内に引き込むことでタンパク質の分解を引き起こしている。生体内においてClpPはそれ単独ではタンパク質を分解することはできない。*Streptomyces hawaiiensis* NRRL 15010から単離される抗生物質Acyldepsipeptide¹ (ADEP1)は、ClpPを標的として作用し抗菌活性を持つため、抗生物質としての利用が期待されている。ADEP1はClpPに結合すると、ClpXなしにClpPはプロテアーゼ活性を持つことになる。単量体で存在している枯草菌由来のClpP (BsClpP)にADEP1を加えると、速やかに14量体を形成することが報告されている。本研究では、ADEP1およびその誘導体が、ClpPの構造にどのように影響するのかを、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) 観察と生化学的な解析を合わせて行い、明らかにしようと試みた。

P2-048

Transition of energy sources in oral *Veillonella* depending on the growth phases

○眞島 いづみ¹, 中澤 太², 村田 清志³ (¹奥羽大・歯・口腔病態解析制御, ²インドネシア大・歯・口腔生物, ³奥羽大・薬・天然資源)

○Izumishi Mashima¹, Futoshi Nakazawa², Kiyoshi Murata³ (¹Dept. Oral Med. Sci., Sch. Dent., Ohu Univ., ²Dept. Oral Biol., Fac. Dent., Univ. Indonesia, ³Dept. Pharm. Nat. Resour. Sci., Sch. Pharm. Sci., Ohu Univ.)

Purpose: Our recent studies revealed that oral *Veillonella* could utilize the fructose as energy sources besides short chain organic acids, such as lactate. Therefore, this study investigated what and how oral *Veillonella* utilized as energy sources.

Methods: The type strain of *Veillonella atypica* was cultivated in TYH medium with fructose or/and lactate substrates under the anaerobic conditions. Metabolome analysis of bacterial cells at the exponential phases (EP) and the stationary phases (SP) in cultures were conducted by CE-TOFMS.

Results: Growth of *V. atypica* most increased with lactate, while the double substrates remarkably extended the SP. In addition, each intermediate metabolite related to fructose metabolism along with EMP pathway were identified at both EP and SP except in the control culture. But in this pathway, relatively highest concentrations of all metabolites were detected in *V. atypica* cells when they were cultured with double substrates at SP. Furthermore, malate, fumarate and succinate in TCA cycle were only detected when they were cultured with lactate substrate at SP.

Discussions: It was suggested that oral *Veillonella* mainly utilized the lactate at EP, however they utilized the fructose as their energy source to extend their life span at SP. Furthermore, oral *Veillonella* might have the branched TCA pathway which functioned with lactate substrate at SP.

P2-049/FL3-12

Chlamydia trachomatis (L2/434/Bu)の酸素分圧依存的な感染細胞適応機構においてミトコンドリアが果たす役割

○辰宮 大翼, 大久保 寅彦, 山口 博之 (北大・院・保健科学)

The role of mitochondria in the cellular adaptation mechanism of *Chlamydia trachomatis* (L2/434/Bu)

○Tsubasa Tatsumiya, Torahiko Okubo, Hiroyuki Yamaguchi (Fac. Health Sci., Hokkaido Univ.)

性感染症起因菌クラミジア (*Chlamydia trachomatis*, 以下 Ct) は、感染細胞内に形成する封入体の中で増殖する偏性細胞内寄生性細菌である。これ迄の私達は、Ctが21%通常酸素に比べ2%低酸素環境の細胞内で100倍程度良く増殖することを発見した。またCtが炎症応答の惹起に関わるp38MAPKとCREBを通常酸素環境で利用することも見出した。さらに低酸素環境におけるCtの細胞での増殖が、細胞の生存性を維持するAktのリン酸化 (Ser473) に依存することも分かった。一方、これらCt標的分子の制御にミトコンドリア (Mt) が関与することが報告されている。そこで既に確立したMt機能不全 (Mt^d) 細胞を用いて、細胞内でのCt増殖の様子を確認するとともに、Ct感染時に起こるp38MAPK, CREB, Aktリン酸化に与える影響を検討した。感染実験には、GFP発現Ct (L2/434/Bu) とHEp-2細胞を用いた。2%低酸素はガス置換型チャンバーで構築した。Mt^d細胞は、HEp-2細胞を臭化エチジウムで6ヶ月間暴露して確立し、Mtゲノム上のCox2とD-loopの欠落、NADPH/NADH量が10倍程度増加していた。形態学的にはMtの縮退が確認された。このMt^d細胞にCtを感染させると、通常酸素環境ではその細胞内増殖が正常細胞に比べ1/1000程度に減少したが、低酸素環境では正常細胞と遜色なく増殖した。Mt^d細胞では酸素分圧に関わらず感染早期 (2hpi) にAkt (Ser473) はリン酸化されるが、p38MAPKとCREBのリン酸化については変化が認められなかった。これらの結果から、MtはAktリン酸化のタイミングを規定し、タイミングを損なうと特に通常酸素ではCtが増殖できないことが明らかとなった。現在、Mt^d細胞と正常細胞の遺伝子発現レベルの網羅的な比較解析を行っている。

P2-050/FL3-13

Effect of a mutation in *metK* from BCG on the SAM synthesis activity

○西谷 悠希^{1,2}, 武部 克希³, 佐藤 啓子⁴, 土佐 郁恵², 中山 真彰², 有村 友紀¹, 阿戸 学⁵, 飯田 征二¹, 大原 直也² (¹岡山大院・医歯薬・顎口腔再建外科学, ²岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ³岡山大院・医歯薬・歯科薬理学, ⁴長大・院医歯薬・フロンティア口腔科学, ⁵国立感染研・感染制御)

○Yuki Nishiya^{1,2}, Katsuki Takebe³, Keiko Sato⁴, Ikue Tosa², Masaaki Nakayama², Yuki Arimura¹, Manabu Ato⁵, Seiji Iida¹, Naoya Ohara² (¹Dept. Oral Maxillofac. Reconst. Surg., Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Oral Microbiol., Grad. Schl. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Dept. Dent. Pharmacol. Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁴Dept. Front. Oral Sci., Grad. Sch. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ⁵Dept. Mycobacteriol., Leprosy Res. Cent., NIID)

Purpose: Para-aminosalicylic acid (PAS) is a classic antituberculosis drug that inhibits folate metabolism. We found that a PAS resistant BCG strain (PAS13) possessed a point mutation in *metK* encoding S-adenosylmethionine (SAM) synthetase. In this study, we investigated the effect of this mutation on SAM synthesis activity. **Methods:** 1) SAM synthesis activity of PAS13 was measured. 2) Wild-type and mutated *metK* proteins were expressed as His-tagged form in *Escherichia coli* and these recombinant proteins were purified with affinity chromatography. 3) SAM synthesis activity was measured with recombinant proteins. **Results & Discussion:** SAM synthesis activity of PAS13 strain was significantly lower than that of the parent strain. The enzyme activity of the mutant protein was also significantly lower than that of the wild-type protein. The results of this study and comparison of the predicted structure of MetK in this bacterium with those of MetK homologues in other species suggested that this point mutation in MetK identified in PAS13 is located at the ATP binding pocket, i.e., it is directly related to the rate of ATP uptake and the rate of SAM deviation, which contributes to enzyme turnover frequency of MetK.

P2-051/FL3-14

長期培養した *Corynebacterium matruchotii* の菌体内元素分析

大原 直子¹, 小川 みどり², 武部 克希³, 土佐 郁恵⁴, 齋藤 光正², ○大原 直也^{4,5} (¹岡山大院・医歯薬・歯科保存, ²産業医大・医・微生物, ³岡山大院・医歯薬・歯科薬理, ⁴岡山大院・医歯薬・口腔微生物, ⁵岡山大院・医歯薬・腸健康科学研セ)

Intracellular elemental analysis of long-term cultured *Corynebacterium matruchotii*

Naoko Ohara¹, Midori Ogawa², Katsuki Takebe³, Ikue Tosa⁴, Mitsumasa Saito², ○Naoya Ohara^{4,5} (¹Dept. Operative Dent., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Microbiol., Sch. Med., UOEH Univ., ³Dept. Dent. Pharm., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁴Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁵Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci.)

【目的】*Corynebacterium matruchotii* は口腔内に存在し、歯石形成との関連性が従来から示唆されてきた。本菌を長期培養し、菌体成分を元素分析することで、細菌の石灰化機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】*C. matruchotii*JCM9386 を用いた。Ennever ら (J Dent Res, 1971) の培地をもとに結晶核としてシリカ (Si) を加えた。塩化カルシウムを含む培地 (添加群) と含まない培地 (非添加群) を用いて細菌の石灰化を比較検討した。植菌後、37°C で4年間静置し、静置後の菌体を走査電子顕微鏡 (SEM, 日立 Regulus 8100) と透過電子顕微鏡 (TEM, 日本電子 JEM-1400 Plus) にて観察した。またエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて菌体内の元素分析を行った。

【結果と考察】SEM 観察にて、非添加群の菌体は長く、滑沢な表面を示すものが多いのに対し、添加群の菌体は非添加群より短く、菌表面は不整で菌体外の凝集物が多く観察された。TEM 観察では、添加群に菌体内に針状結晶物が認められ、同部の元素分析では、リンとカルシウムのピークが明瞭に観察された。非添加群では結晶物は観察されなかった。本菌は菌体内のカルシウムのみでは石灰化せず、菌体外からカルシウムを取込むことにより、菌体内にリンイオンとカルシウムイオンからなる結晶化合物が形成されることが示された。

P2-052/FL3-15

The effect of amino acid and succinate metabolism on *Campylobacter jejuni* virulence

○牧本 真奈^{1,2}, 下畑 隆明^{1,2}, 福島 志帆¹, 山中 咲季¹, 上番増 喬¹, 馬渡 一論¹, 高橋 章¹ (¹徳島大・院医歯薬学研究部・予防環境栄養学, ²福井県立大・海洋生物資源)

○Mana Makimoto^{1,2}, Takaaki Shimohata^{1,2}, Shiho Fukushima¹, Saki Yamanaka¹, Takashi Uebanso¹, Kazuaki Mawatari¹, Akira Takahashi¹ (¹Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch., ²Marine Bio., Fukui Prefect Univ.)

Background: *Campylobacter jejuni* (Cj) is a cause of gastrointestinal foodborne disease in human. Cj has a unique metabolism, suggesting intestinal nutrient composition is closely associated with Cj virulence, but the association between Cj metabolism and the virulence is unclear. To reveal the relationship between metabolism and virulence during Cj infection, we estimated critical metabolites and investigated the contribution of those in the virulence of Cj in an in vitro model. **Method:** To investigate the crucial metabolites involved in Cj infection, culture supernatant was analyzed by Capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS). In addition, we assessed the effect of the metabolite on the Cj adhesion and invasion to host cells. The intracellular bacterial cell number was estimated by gentamycin protection assay. **Results & Discussion:** CE-MS analysis revealed the reduction of amino acids and induction of succinic acid in culture supernatant of Cj. The succinate secretion in the culture medium was depending on the aspartate and glutamate utilization. Moreover, succinate stimulation increased the number of bacteria adhering to and invading to host cells with the increase expression of virulence genes. Our results suggest that Cj produces succinate and modulates own virulence by utilizing amino acids.

P2-053/FL3-16

Identification of Oral Bacteria and Metabolites Associated with Periodontal Disease

○石原 央子, 迫 美里, 堤 康太, 藤井 愛実, 橋本 泰樹, 佐藤 惇志, 近澤 貴士, 柿澤 恭史 (ライオン (株)・研究開発本部)

○Chikako Ishihara, Misato Sako, Kota Tsutsumi, Naumi Fujii, Daiki Hashimoto, Atushi Sato, Takashi Chikazawa, Yasushi Kakizawa (R&D Headquarters., Lion Co., Ltd.)

Introduction: Dysbiosis of the oral microbiome has been implicated in the onset and progression of periodontal diseases. An altered oral microbiome can significantly affect the concentration and composition ratio of bacterial-derived metabolites, thereby contributing to disease development. This study aims to identify the metabolites correlated with various bacterial species significantly implicated in periodontal disease. **Methods:** Mouth-rinsed water was collected from 24 patients with periodontal disease and 22 healthy individuals. We isolated bacterial species that are significantly more prevalent in periodontal disease. The correlations between these various bacterial species and metabolites were assessed using Spearman's rank-order correlation. **Results:** We isolated 25 bacterial species that were significantly more prevalent in periodontal disease, and identified 20 metabolites that were positively correlated with the increase of these bacteria. The identified metabolites included short-chain fatty acids, sugar metabolites, and amino acid metabolites such as propionate, succinate, and citrulline. **Conclusion:** We identified 20 metabolites that are significantly associated with bacteria prevalent in periodontal disease. These findings are considered crucial insights for investigating the involvement of the oral microbiota and its metabolites in periodontal disease.

P2-054

Metabolic changes of *Vibrio parahaemolyticus* under different salinity conditions

○藤井 悠介¹, 牧本 真奈^{1,2}, 石田 快^{2,3}, 高橋 章², 下畑 隆明^{1,2} (1)福井県立大・海洋生物資源, (2)徳島大・院医歯薬学研究部・予防環境栄養, (3)京都府立医科大・医学研究科・感染病態学)

○Yusuke Fujii¹, Mana Makimoto^{1,2}, Kai Ishida^{2,3}, Akira Takahashi², Takaaki Shimohata^{1,2} (1)Marine Bio., Fukui Prefect Univ., (2)Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch., (3)Dept. Infectious Diseases, Kyoto Prefec. Univ. Medicine)

Background: *Vibrio parahaemolyticus* is a halophilic bacterium commonly found in marine and brackish environments. It is a well-known causative agent of foodborne illness, particularly through seafood contamination. Despite its preference for high-salinity conditions, the bacterium often encounters low-salinity environments, such as brackish waters and food surfaces during handling. However, the metabolic adaptations under low-salinity conditions remain largely unexplored. In this study, we employed metabolomic analysis to investigate the metabolic changes in *V. parahaemolyticus* while low-salinity environments. **Methods:** *V. parahaemolyticus* cultures were incubated for 6 hours with 0.5% NaCl, 1% NaCl, 3% NaCl-LB broth, and supernatant samples were collected at 0, 1, 2, 4, and 6 hours incubation. The samples were then subjected to capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) for metabolite analysis. **Results:** The analysis of metabolites in the liquid phase revealed that the amino acids utilization and associated organic acids production were significantly different between 0.5-1% NaCl and 3% NaCl condition. These findings suggest that different metabolic pathways are activated depending on the salinity concentration.

P2-055

Study on Growth-Promoting Factor for *Leptospira* Produced by the *Massilia*

○吉村 芳修¹, 尾鶴 亮^{1,2}, 園田 卓己¹, 宮原 敏³, 齋藤 光正³, Jason Papin², 小幡 史子⁴, Glynis Kolling², 吉田 眞一⁵, 廣松 賢治¹ (1)福岡大・医・微生物免疫, (2)Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, (3)産業医大・医・微生物, (4)鳥取大・医・細菌, (5)九州大)

○Michinobu Yoshimura¹, Ryo Ozuru^{1,2}, Takumi Sonoda¹, Satoshi Miyahara³, Mitsumasa Saito³, Jason Papin², Fumiko Obata⁴, Glynis Kolling², Shin-Ichi Yoshida⁵, Kenji Hiromatsu¹ (1)Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Fukuoka Univ., (2)Dept. Biomed. Eng., Univ. Virginia, (3)Dept. Microbiol., Sch. Med., UOEH, (4)Div. Bacteriol., Dept. Microbiol. Immunol., Fac. Med., Tottori Univ., (5)Kyushu Univ.)

Leptospira is frequently isolated from soil and aquatic environments. Soil, in particular, is considered a reservoir for *Leptospira* and a source of infection for humans and animals. Incidentally, we observed a phenomenon in which contamination by *Massilia* spp. in 1% agar EMJH of *Leptospira interrogans* resulted in enhanced growth of *Leptospira* colonies surrounding *Massilia* colonies. This observation suggested that *Massilia* spp. may produce factors that promote the growth of *Leptospira*. *Massilia* spp. are known to inhabit diverse environments, including soil and aquatic ecosystems, similar to *Leptospira*. Thus, it is plausible that *Massilia* spp. and *Leptospira* coexist in the same environments. In this study, we aimed to verify the growth-promoting effects of *Massilia* spp. culture supernatant on *Leptospira* and to identify the growth-promoting factors. *Massilia* spp. were cultured in R2A medium, commonly used for bacterial cultivation, and the resulting culture supernatant was sterilized by filtration for analysis. When the supernatant was mixed with EMJH and used to culture *L. interrogans*, growth was enhanced compared to cultures mixed with fresh R2A. Metabolic modeling of *Leptospira* and *Massilia* spp., conducted using genome-scale metabolic network reconstruction, suggested that both microorganisms release nutrients essential for each other's growth into their environment.

P2-056

環化超硫黄分子 (S₈) の生物種横断的生成と超硫黄依存型エネルギー代謝機構の解明

○松永 哲郎¹, Uladzimir Barayeu², 緒方 星陵², Minkyung Jung², 清水 隆之³, 守田 匡伸², 吉沢 道人⁴, 本橋 ぼづみ⁵ (1)秋田大・感染統括制御・疫学・分子病態研究センター, (2)東北大・院医・環境医学, (3)奈良女子大・自然科学・生物科学, (4)東京科学大・化生研, (5)東北大・院医・医学)

Supersulfides-dependent energy metabolism by *cyclo-octasulfur* (S₈) produced across species

○Tetsuro Matsunaga¹, Uladzimir Barayeu², Seiryō Ogata², Minkyung Jung², Tkayuki Shimizu³, Masanobu Morita², Michito Yoshizawa⁴, Hozumi Motohashi⁵ (1)Center for Integrated Control, Epidemiology and Molecular Pathophysiology of Infectious Diseases, Akita Univ., (2)Dept. Environ. Health Sci. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med., (3)Fac. Div. Nat. Sci., Biol. Sci. Res. Group, Nara Women's Univ., (4)Lab. Chem. Life Sci., Inst. Innov. Res., Inst. Sci. Tokyo, (5)Dept. Med. Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】我々は、硫黄原子が連鎖・重合（カテナーション）した超硫黄分子種が生体内で豊富に生成され、硫黄酸化酵素である sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) を介して硫黄呼吸など多様な生理機能を発揮することを明らかにしてきた。本研究では、未だ不明な点が残されている硫黄依存型エネルギー代謝の分子機構の解析、特に、環化超硫黄分子（cyclo-octasulfur, S₈）に着目した解析を行った。

【方法・結果】独自に開発した単離ミトコンドリアを用いた硫黄呼吸の可視化・定量解析法を駆使して、超硫黄分子による膜電位形成を精度よく定量解析した。その結果、マウス胎児線維芽細胞（MEF）の単離ミトコンドリアにおける膜電位が、硫黄ドナー（NaHS および Na₂S₂）の添加により SQR 依存的に増加した。一方、超硫黄 S₈ を効率良く捕捉する分子カプセルを用いた質量分析により、硫黄細菌 *Allochromatium vinosum* および *Rhodobacter capsulatus* における SQR 依存的な S₈ 生成が検出され、HEK293T 細胞のミトコンドリアにおいて硫黄細菌に匹敵する高いレベルの S₈ 生成が示された。さらに、シングルミトコンドリア解析により、分子カプセルを添加した直後に HEK293T のミトコンドリア膜電位が著しく消失した。

【考察】S₈ 定量分析法および単一ミトコンドリア機能解析システムを用いて、超硫黄分子に依存したミトコンドリアの膜電位形成を精度良く定量分析することで、真核生物の酸素呼吸が、実際は、超硫黄分子と酸素分子によるハイブリッド型のエネルギー代謝であることが示唆された。

P2-057

腸炎ビブリオの乳酸及びピルビン酸に対する走化性応答の解析

○寺島 浩行¹, 児玉 年央² (1)金城学院大・薬, (2)長崎大・熱研・細菌学)

Analysis of chemotaxis to lactate/pyruvate in *Vibrio parahaemolyticus*

○Hiroyuki Terashima¹, Toshio Kodama² (1)Col. Pharm., Kinjo Gakuin Univ., (2)Dept. Bacteriol., Inst. Trop. Med. (NEKKEN), Nagasaki Univ.)

魚介類の生食に起因する感染症に腸炎ビブリオ感染症がある。本菌は主に腸で炎症性の下痢を引き起こし、食中毒を引き起こす。本菌の病原性には、耐熱性溶血毒 TDH と III 型分泌装置が重要な働きをする。III 型分泌装置は、宿主細胞に直接エフェクターを注入することから、宿主細胞にコンタクトすることが病原性発揮に重要なステップであると考えられる。細菌のべん毛運動は走化性によって制御されている。走化性は、自身にとってより好ましい環境に移動する能力であるので、腸管上皮細胞の周辺には本菌を誘引する物質が存在すると予想される。そこで、腸炎ビブリオが、腸管内のどのような物質を感知できるのか明らかにすることを目的とした。まず、腸内の代謝産物に対して走化性を示すかどうか調べた。短鎖脂肪酸や乳酸・コハク酸に対して、キャピラリーアッセイによって走化性を評価した。その結果、乳酸、ピルビン酸などに対して誘引応答を示した。受容体のメチル化アッセイによって乳酸・ピルビン酸を感知する受容体を探索した結果、Mcp1, Mcp28 が乳酸及びピルビン酸によってメチル化されたことから、乳酸・ピルビン酸受容体であることが示唆された。変異体を用いたキャピラリーアッセイによって乳酸応答・ピルビン酸応答を解析したところ、Mcp1, Mcp28 が乳酸・ピルビン酸に対する走化性受容体であることを示した。それに加え、Mcp1, Mcp28 以外にも乳酸・ピルビン酸応答を媒介する走化性受容体が存在することが示唆された。

P2-058

Light-responsive mechanism of photokinesis in *Vibrio cholerae*

○許 駿¹, 中村 修一², 山城 哲¹ (1琉球大・医・細菌, 2東北大・工・応用物理)

○Jun Xu¹, Shuichi Nakamura², Tetsu Yamashiro¹ (1Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus, 2Dept. Appl. Phys., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Photokinesis is the change in an organism's motility in response to light, with variations in intensity or wavelength modulating speed or direction. It is common in microorganisms and crucial for adapting to light environments. This study discovered that a *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from the Aja River in Okinawa, Japan, exhibited pronounced motility responses to light stimulation. This strain demonstrated a marked increase in motility upon light exposure, a phenomenon indicative of photokinesis. In addition to previously known chemotactic reactions to environmental factors such as salinity and pH, this study reveals that *V. cholerae* is also sensitive to "light" as an environmental cue. Furthermore, we found that this light response depends on the intensity and wavelength of the light, with specific light conditions triggering significant changes in motility. Our analysis suggested that adenyl cyclase in *V. cholerae* plays a critical role in this photokinesis phenomenon. The use of mutant strains showed that inhibiting adenyl cyclase suppressed the light-responsive motility, indicating the existence of a genetic mechanism linking light to *V. cholerae* motility. This discovery provides new insights into how *V. cholerae* adjusts its survival strategies in the environment.

P2-059/FL3-17

Inhibition of sodium ion flux in the flagellar stator from *Vibrio* due to an inhibitor binding

○錦野 達郎^{1,2}, 竹川 宜宏³, 岸川 淳一⁴, 廣瀬 未果⁴, 小嶋 誠司⁵, 本間 道夫⁵, 加藤 貴之⁴, 今田 勝巳³ (1名工大・院工・工, 2名工大・オプトバイオテクノロジーセンター, 3阪大・院理・高分子化学, 4阪大・蛋白研, 5名大・院理・生命理学)

○Tatsuro Nishikino^{1,2}, Norihiro Takekawa³, Jun-ichi Kishikawa⁴, Mika Hirose⁴, Seiji Kojima⁵, Michio Homma⁵, Takayuki Kato⁴, Katsumi Imada³ (1Dept. Life Sci. & Applied Chem., Nagoya Inst. of Tech., 2OptoBioTech. Res. Ctr., Nagoya Inst. of Tech., 3Dept. Macromol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., 4Inst. for Protein Res., 5Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Many bacteria move toward favorable environments using flagellum. A polar flagellum of *Vibrio* is rotated by a sodium ion-driven motor, which is composed of the stator and the rotor. Five PomA and two PomB molecules form a stator complex that works as a sodium ion channel. Phenamil, an amiloride derivative compound, binds to the PomAPomB complex and inhibits ion flux. To elucidate sodium ion flux pathway in the PomAPomB complex and inhibition mechanism of phenamil, we performed single particle analysis by cryo-electron microscopy, and found two putative channel pores, named short and long tunnels, in the PomA-PomB interface. We found two sodium ions in a long tunnel composed of two cavities, one is hydrophobic and the other is hydrophilic. The size of the former cavity is 2.4 angstrom, which is close to that of a hydrated sodium ion. The hydrophilic cavity contains the other sodium ion near the bottle neck region that separates the two cavities. Considering the distance between the sodium ion and the hydrophilic residues, the sodium ion is hydrated or partially dehydrated. We also solved the structure of phenamil-bound PomAPomB complex, revealing that a phenamil molecule binds to the PomA-PomB interface, where is close to the short tunnel. This suggests that phenamil does not directly block the sodium ion pathway but may disturb the PomA rotation coupled with sodium ion flux.

P2-060/FL3-18

LafTU functions as the lateral flagellar stator of *Vibrio alginolyticus*

○小嶋 誠司¹, 横山 和輝¹, 竹川 宜宏² (1名古屋大・院理・生命理学, 2大阪大・院理・高分子科学)

○Seiji Kojima¹, Kazuki Yokoyama¹, Norihiro Takekawa² (1Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., 2Dept. Macromol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Vibrio alginolyticus induces numerous lateral flagella and swarms on the surface or in viscous environments. Rotation of the lateral flagellum is powered by a H⁺-driven motor, but its stator units have not been studied yet. Based on sequence homology, lateral stator components are assumed to be encoded by *lafT* and *lafU*. Here we cloned these genes and deleted from the genome to ask whether LafTU functions as lateral flagellar stator. After cloning, we deleted *lafT* and *lafU* from the genome of strain YM19, which lacks polar flagellum but constitutively produces lateral flagella. On soft agar plate, YM19 formed a small motility ring, but the YM19Δ *lafTU* strain did not. On hard agar plate, YM19 formed a large motility ring, whereas YM19Δ *lafTU* completely lost the formation of ring. Electron microscopy showed that YM19Δ *lafTU* cells formed wild-type level of lateral flagella, confirming that *lafTU* deletion did not affect lateral flagellar formation. Ectopic expression of LafTU from a plasmid restored motility of the Δ *lafTU* strain, but mutation at critical Asp conserved in the stator B subunit (LafU D31) abolished lateral flagellar motility. From these results, we conclude that LafTU functions as the lateral flagellar stator. Currently we examine the interaction of LafTU with FliL, the single transmembrane protein believed to support stator units incorporated into the motor.

P2-061

A 6-blade β-propeller domain-containing protein is essential for the motility of *Leptospira*

○高部 響介, 小泉 信夫 (感染研・細菌1)

○Kiyosuke Takabe, Nobuo Koizumi (Dept. Bacteriol. I, NIID)

Leptospira spp. are members of spirochetes and the pathogenic species cause leptospirosis. The establishment of infection by *Leptospira* spp. is known to involve motility generated by periplasmic flagella. However, the mechanisms of flagellar assembly and motility remain unclear. Here, we obtained mutants with defective motility by the transposon mutagenesis. The gene *I1807* was found to be essential for the motility and intact morphology. Results from western blotting and the flagella purification indicated that the Δ *I1807* mutant had defective flagella in which the amount of FlaA2 required for the coiled flagella was reduced. On the other hand, qPCR showed that the expression level of *flaA2* as well as other flagellar associated genes in the Δ *I1807* was comparable to that of the wild type, suggesting that *I1807* has a function in the post-transcriptional process. Furthermore, RNA stability in the Δ *I1807* was significantly lower than that in the wild type and it was restored when the gene was complemented. In addition, bioinformatic and transcript analyses revealed that *I1807* is potentially composed of an operon with the downstream gene *I1808*, which is predicted to possess the structure corresponding to a motor protein of other spirochetes, and that it affects the *I1808* mRNA stability. Based on these results, we will discuss how *I1807* could contribute to the flagellar assembly.

P2-062

Analysis of *Campylobacter jejuni* response to bile stimulation

○小野 実優¹, 牧本 真奈^{1,2}, 下畑 隆明^{1,2}, 上番増 喬¹, 馬渡 一論¹, 高橋 章¹ (¹徳島大・院医歯薬学研究部・予防環境栄養, ²福井県立大・海洋生物資源)

○Miyuu Ono¹, Mana Makimoto^{1,2}, Takaaki Shimohata^{1,2}, Takashi Uebanso¹, Kazuaki Mawatari¹, Akira Takahashi¹ (¹Dept. Prevent. Environ. Nutr., Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch., ²Marine Bio., Fukui Prefect Univ.)

Background: *Campylobacter jejuni* (Cj) is known as a major cause of foodborne disease, and it induces inflammation in gastrointestinal tract. While the infection, pathogenic bacterium are exposed by bile in intestine. Which stimulation induces disruption of bacterial membranes, oxidative damage, and modulation of the virulence genes in several bacteria. However, the response in Cj for the bile is not known. The aim of this study is to elucidate the how affect bile to Cj. **Method:** To assess the effect of bile on growth and motility of Cj the growth curve was measured. Additionally, the motility was investigated by a soft-agar swim assay. **Results&Discussion:** Bile stimulation suppressed Cj growth in a dose dependent manner. On the other hand, bile facilitated Cj motility. Inhibition of Cj growth and acceleration of mobility by bile stress may be involved in adaptation to the gastrointestinal environment which could contribute to Cj colonialization in the intestinal tract.

P2-063

Structural Basis of TolC-mediated Drug Efflux Channel and Development of Novel Inhibition Strategies

○田辺 幹雄¹, 稲葉 (井上) 理美², 守屋 俊夫¹ (¹高エネ機構・物構研・構造生物, ²北海道大・先端生命)

○Mikio Tanabe¹, Satomi Inaba-Inoue², Tosihio Moriya¹ (¹Struct. Biol. Res. Cen, Inst. Mat. Struct. Sci. KEK, ²Adv. Life. Sci, Hokkaido Univ.)

The spread of drug-resistant species of pathogenic bacteria has become an increasingly severe medical problem worldwide. It is crucial to understand drug efflux mechanisms. This study focuses on TolC, an outer membrane protein that is a key component of drug efflux systems in Gram-negative bacteria. TolC functions as an outer membrane channel, forming large complexes with various drug efflux pumps (RND, MFS, and ABC-type) located in the inner membrane and secretion systems via periplasmic adapter proteins. These complexes facilitate the export of various toxins and antimicrobial agents. Our aims to elucidate the diverse functions of TolC and attempts to inhibit drug efflux by targeting these essential functions. TolC consists of an α -helical domain spanning the periplasmic region and a β -barrel domain embedded in the outer membrane, creating a long tunnel through which antimicrobial agents must pass. We hypothesized that similar to other β -barrel proteins, substrates might follow specific pathways formed within TolC. As an initial step, we determined TolC structures at resolutions of 2.0 (native) and 2.6 (with inhibitor) angstrom using cryo-EM single particle analysis. Based on the structural information, we are conducting in silico analyses to identify drug passage routes through TolC and attempting to block these pathways using designed proteins.

P2-064/FL3-19

構造生物学に基づいた歯周病菌に存在するシャペロン様タンパク質の機能解明

○武部 克希¹, 佐藤 啓子², 宮川 柊兵³, 土佐 郁恵⁴, Yujiang Chen⁴, 加島 佳奈⁵, 大原 直也⁴ (¹岡山大院・医歯薬・歯科薬理学, ²長大・院医歯薬・フロンティア口腔科学, ³阪大院・薬学研究科・量子生命情報薬学分野, ⁴岡山大院・医歯薬・口腔微生物学, ⁵阪大院・歯学研究科・顎口腔腫瘍外科学講座)

Functional analysis of chaperone-like protein in periodontitis bacteria based on structural biology

○Katsuki Takebe¹, Keiko Sato², Shuhei Miyakawa³, Ikue Tosa⁴, Yujiang Chen⁴, Kana Kashima⁵, Naoya Ohara⁴ (¹Dept. Dent. Pharmacol, Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Dept. Front. Oral Sci., Grad. Schl. Biomed. Sci., Nagasaki Univ., ³Dept. Quantum Life Sci and Bioinfo., Grad. Sch. Pharma. Sci., Osaka Univ., ⁴Dept. Dent. Pharmacol, Grad. Sch. Med., Dent. and Pharm. Sci., Okayama Univ., ⁵Dept. Oral & Maxillofac. Onco and Surg, Grad. Sch. Dent., Osaka Univ.)

輸送タンパク質である三量体シャペロン Skp は、大腸菌では β -barrel assembly machinery (BAM) ファミリーと協調して機能することが知られている。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) では、同一オペロン上に 2 種類の Skp タンパク質 SkpA と SkpB が存在し、SkpA は 9 型分泌装置との関連が明らかにされたが、SkpB の構造や機能は未だ不明な点が多い。本研究では、X 線結晶構造解析と計算科学により、*P. gingivalis* における SkpB の構造生物学的な特色を明らかにし、遺伝子変異株の作製により、その機能解析を行なった。SkpB 欠損株に導入した SkpB 発現プラスミドの存続性から SkpB は *P. gingivalis* に必須であることが示唆された。大腸菌で作製した rSkpB の立体構造を決定したところ、大腸菌 Skp と同様に、特徴的な長い 2 つの α helix 領域が存在し、三量体を形成していた。一方で、SkpA と異なり、9 型分泌装置との相互作用に重要な α helix 領域のループ構造は存在しなかった。分子動力学シミュレーションとフラグメント分子軌道法の計算結果より、三量体形成には Tyr135 が重要であることが示唆された。また、大腸菌 Skp とは異なる領域で、部分的な α helix の解けが生じることが明らかになった。以上の結果に加え、SkpB のオペロンに BamA 類似タンパク質が存在することから、SkpB は SkpA とは異なり 9 型分泌装置とは関連せず、大腸菌 Skp と同様に BAM ファミリーと協調して機能する可能性が示唆された。一方で、構造変化の違いは SkpB と大腸菌 Skp の輸送タンパク質の大きさの違いに関与する可能性があり、今後、本研究により明らかになった重要残基を変異させ、質量分析と組み合わせる事で輸送タンパクの同定を行う。

P2-065

iYH543, *Streptococcus pyogenes* 血清型 M1 株 ゲノムスケール代謝モデル

○広瀬 雄二郎¹, 池田 恵莉¹, 大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也³, 川端 重忠^{1,4} (¹阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオイノフォ, ³医薬基盤・健康・栄養研, ⁴阪大・感染症総合研究教育拠点)

iYH543, a genome-scale metabolic model of the serotype M1 strain of *Streptococcus pyogenes*

○Yujiro Hirose¹, Eri Ikeda¹, Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi³, Shigetada Kawabata^{1,4} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³NIBIOHN, ⁴CiDER. Osaka Univ.)

Streptococcus pyogenes は咽頭炎や劇症型溶血性レンサ球菌感染症など、多様な疾患を引き起こす病原菌である。200 以上の血清型が存在する中でも、M1 血清型株は高頻度に検出され、臨床的重要性が高いとされている。我々は、M1 血清型株の菌の本態をより深く理解するため、精度の高いゲノムスケール代謝シミュレーションモデルを構築し、iYH543 と名付けた。また、我々の過去の研究では、合成培地中で *S. pyogenes* を培養する際、グルコースよりもその多糖であるデキストリンを栄養源とした場合に増殖効率が高いことを示したが、その具体的なメカニズムは不明であった。本研究では、このような事例に対する iYH543 の活用法を示す。iYH543 は、データベース AGORA2 から得たドラフト版シミュレーションモデルを基に、過去に報告された必須遺伝子情報や実験で同定された栄養取り込み能力を反映し、予測の整合性を確保するように構築された。iYH543 の遺伝子必須性の予測精度は 92.6% (503/543 遺伝子)、アミノ酸要求性の予測精度は 95% (19/20 アミノ酸) であった。合成培地にグルコースまたはデキストリンを添加した条件で培養した菌のトランスクリプトーム (過去のデータ) を詳しく調べると、デキストリン条件下で多くのアミノ酸代謝が下方制御される一方、アルギニンとヒスチジンの利用経路が顕著に上方制御されていた。このデータを iYH543 に反映させると、全てのアミノ酸代謝が下方制御されている場合でも、アルギニンの利用度が増加すると菌の増殖速度が上昇することが示された。本研究の結果は、iYH543 は菌の利用する代謝経路や栄養源の選択が菌の増殖に与える影響を解明する有効な手段であることを示唆する。

P2-066/FL3-20

祖先推定アプローチによる肺炎球菌が高病原化する過程で喪失した遺伝子の探索

○大野 誠之^{1,2}, 山口 雅也³, 川端 重忠^{1,4} (¹阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオインフォ, ³医薬基盤・健康・栄養研, ⁴阪大・CIDER)

Ancestral estimation revealed pneumococcal genes abandoned to obtain virulence

○Masayuki Ono^{1,2}, Masaya Yamaguchi³, Shigetada Kawabata^{1,4} (¹Dept. Microbiol., Sch. Dent., Osaka Univ., ²Bioinformatics Res. Unit, Sch. Dent., Osaka Univ., ³NIBIOHN, ⁴CIDER, Osaka Univ.)

細菌ゲノム解析において、収集した細菌株が現に保有する遺伝子は観察可能であるが、進化の過程で喪失した因子を観測することはできない。本研究では肺炎球菌に着目し、共通祖先の遺伝子の保有状態を推定することで喪失した因子を探索し、致死的な侵襲性感染症の病態との関連を解析した。

1916年から2018年にかけて全世界で分離された12,592株の肺炎球菌の全ゲノム情報を収集し、パンゲノム解析プログラムRoaryを用いて42,473遺伝子を検出した。また、集団が共通して保有するコア遺伝子群を決定し、最尤法を用いて系統樹を作成した。続いて、分離年代の情報に基づきRパッケージBactDatingを用いて系統樹の再構築をおこなったのち、侵襲性と非侵襲性由来株とを分ける病原性関連分岐を統計学的に決定し、25分岐を同定した。全ての分岐における各遺伝子の保有確率をプログラムPastMLにより算出し、病原性関連分岐から子分岐に至る過程で保有確率が低下する遺伝子を同定した。

侵襲性由来株の割合がそれぞれ66%と18%の系統を分ける病原性関連分岐において、侵襲性率66%の高病原性系統は転写制御因子および3つのABCトランスポーターをコードする遺伝子群を喪失していた。一方、別の病原性関連分岐では侵襲性率4%の低病原性系統に分かれる過程でトランスボザゼとチロシンキナーゼをコードする遺伝子を喪失していることが予測された。

本研究では、祖先推定の手法を利用し、進化の過程で獲得または喪失した遺伝子を推定することで侵襲性肺炎球菌感染症の病態との関連を解析した。特定された遺伝子群は感染局所における適応変化に寄与する可能性が考えられる。

P2-067/FL3-21

Deep learning-based enzyme screening to identify orphan enzyme

○廣田 佳亮¹, 山田 拓司^{1,2,3,4} (¹科学大・生命理工, ²株式会社メタジェン, ³メタジェンセラピューティクス株式会社, ⁴株式会社digzyme)

○Keisuke Hirota¹, Takuji Yamada^{1,2,3,4} (¹LST, Science Tokyo, ²Metagen, Inc., ³MGTx, ⁴digzyme, Inc)

Progress in sequencing technology has yielded large numbers of protein sequences, including enzymes which are proteins that catalyze specific chemical reactions. However, despite growth of enzyme databases, there are many enzymes with confirmed activities yet without sequence information called orphan enzymes. This gap between known proteins and enzyme reactions suggests that some proteins of unknown function might be orphan enzymes. However, most existing in silico enzyme screening tools have limited applicability to orphan enzymes. Therefore, a novel computational approach designed for orphan enzyme screening is needed. In this study, we propose a deep learning-based framework for enzyme screening that takes protein sequences and enzyme reactions as inputs and evaluates their correspondence. The proposed method differs from previous studies in two aspects. First, our approach performs a two-step evaluation: classification of enzymes and non-enzymes, and prediction of their correspondence with enzymatic reactions of interest. Second, the proposed method does not rely on enzymatic reaction labels, such as EC numbers. To show our proposed method's effectiveness, we explored 1,233 orphan enzymes involved in the metabolism of human gut bacteria. This study establishes the computational enzyme screening tool and enables a fast and large-scale exploration of orphan enzymes.

P2-068/FL3-22

Detection of 1000s beneficial genome changes within a species

○小林 一三¹ (¹法政大・マイクロナノ, ²基礎生物学研)

○Ichizo Kobayashi¹ (¹Micro-nano, HOSEI Univ., ²NIBB)

It is difficult to identify beneficial genome changes because most of the genome changes are neutral. We solved this problem with a model organism with free homologous recombination and discrete population structure: *Helicobacter pylori*.

We collected 1000s of its genome sequences, half from *Helicobacter pylori* Genome Project and the remainder from the open genomes. We divided them into small groups by sequence sharing (PCA-IUMAP) and identified their highly subgroup-specific single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Their high N/S (amino-acid changing substitution/ amino-acid retaining substitution) indicated most of them are adaptive. To our surprise, when mapped on protein structures, most of these SNPs are around a site critical for their structure/function such as an active/binding site, a hinge, a subunit interaction site and an apex. They are often on host interaction proteins: known/novel virulence factors, sensor-motors, drug-resistance proteins, outer-membrane proteins, transporters, and restriction-modification systems. They are also on proteins for basic functions, especially translation, and in microbiome-related proteins. (I. Kobayashi, T. Sakamoto, H. Nishide, I. Uchiyama, H. Innan, *Helicobacter pylori* Genome Project Research Network (C. Camargo; C. Rabkin), N. Osada; Submitted)

P2-069/FL3-23

健康保菌者から分離された志賀毒素産生性大腸菌の薬剤耐性遺伝子の解析

○今井 有未¹, 金子 寛², 奥野 未来¹, 山本 武司¹, 野口 秋雄², 佐藤 寿夫², 小椋 義俊¹ (¹久留米大・医・感染医学, ²株式会社 日本微生物研究所)

Analysis of antibiotic resistance genes in STEC isolated from asymptomatic carriers

○Yumi Imai¹, Hiroshi Kaneko², Miki Okuno¹, Takeshi Yamamoto¹, Akio Noguchi², Toshio Sato², Yoshitoshi Ogura¹ (¹Div. Microbiol. Dept. Infect. Med. Kurume Univ. Sch. Med., ²Japan Microbiological Laboratory Co., Ltd.)

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は下痢や出血性大腸炎に加えて溶血性尿毒症症候群など重篤な合併症の原因となる。STECはウシなどの反芻動物の腸管に常在しており、汚染された牛肉や生野菜などの食品を介してヒトへと感染し、ヒトからヒトへの二次感染も問題となる。日本ではSTEC感染の拡大防止のため、食品従事者や福祉施設労働者を対象に定期的な検便検査が行われているが、被験者の約0.03%がSTECを健康保菌していることが判明している。STECは3類感染症のため、陰性化するまで就業規制される。STEC保菌者は抗菌薬により除菌が行われるが、長期間陰性化しない例もある。健康保菌者由来STECの薬剤耐性に関する研究はあまり行われていないため、本研究では健康保菌者由来STECの薬剤耐性遺伝子保有状況の調査を目的とし、検便分離株の大規模ゲノム解析を実施した。2021年に分離された健康保菌者由来STEC計495株のゲノム配列を決定した。薬剤耐性遺伝子はARG-ANNOTデータベースを用いてABRicateで解析した。その結果、495株のうち83株 (17%) が薬剤耐性遺伝子を保有していた。アミノグリコシド耐性遺伝子が65株と最も多く、次いでスルホンアミド/トリメトプリム耐性遺伝子 (52株)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (50株) であった。ホスホマイシン耐性遺伝子は5株、マクロライド耐性遺伝子は6株、キノロン耐性遺伝子は7株であった。さらに *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) 内の変異をAMRFinderPlusで解析したところ、*gyrA* で14株、*parC* で1株、*parE* で6株、既知の変異が検出された。今後は現在行っている薬剤感受性試験の結果と合わせて健康保菌者由来STECの薬剤耐性保有状況を評価する予定である。

P2-070

機械学習の手法を用いた細菌の培地成分予測

○佐藤 龍飛, 廣田 佳亮, 山田 拓司 (科学大・生命理工)

Prediction of medium components for bacteria using Machine Learning

○Ryui Sato, Keisuke Hirota, Takuji Yamada (LST., Science Tokyo)

微生物, 特に細菌の単離培養はその種の応用や利用に向けて重要な過程である。近年, メタゲノム解析技術の発展により, 単離培養を行わずに環境中の細菌の DNA を抽出し, その種や機能の推定することが可能になった。これにより, 細菌のゲノム情報は取得できるようになった。一方で, 未知の細菌やサンプル中で存在量の少ない細菌に対する研究や利活用には依然として培養法の確立が急務である。本研究の目的は, 細菌の機能遺伝子の情報から細菌選択的な培地を明らかにすることである。これにより, 培養条件の選択や推定に加え細菌の代謝と培地成分の関連の解明が期待される。本研究では, 細菌の培地成分情報とゲノムから得られる機能遺伝子の情報から代謝経路が紐づいたデータベースを作成した。また, 細菌の機能遺伝子の情報として, KEGG Orthology あるいは KEGG module の情報を入力とし, 生育培地の培地成分の有無を出力する機械学習モデルを構築した。また, 細菌の機能遺伝子の情報と培地成分情報を入力として, 細菌の機能類似性と生育培地の類似性が反映された対応関係を可視化する深層学習ベースの手法を開発した。先行研究では, 16S rRNA 遺伝子による系統学的, 生態学的な種の類似性でのみ細菌を扱っているため, 細菌の代謝経路やそこに関わっている遺伝子には言及できない。提案手法は細菌の機能遺伝子に着目している点で先行研究とは異なっている。これにより, 系統学的, 生態学的な種の類似性では予測できない, 同一の代謝機能を有しながらも系統樹上で異なる位置に存在する細菌に関しての培地成分の予測や代謝経路と培地成分の関連が期待される。

P2-071/FL3-24

ピロリ菌の塩基切り出し型制限酵素が胃がんを起こす

○福世 真樹¹, 高橋 規子^{2,3}, 花田 克浩⁴, 矢原 耕史⁵, 米澤 英雄^{3,6}, 長田 直樹⁷, 金田 篤志^{1,8}, 内山 郁夫⁹, 大崎 敬子³, 小林 一三^{2,3,10} (1千葉大・医, ²東大・新領域, ³杏林大・医, ⁴大分大・医, ⁵感染研・薬剤耐性, ⁶東京歯大・微生物, ⁷北大・情報科学, ⁸千葉大・健康疾患オミックス, ⁹基生研・ゲノム情報, ¹⁰法政大・マイクロナノ)

Helicobacter pylori base-excision restriction enzyme in stomach carcinogenesis

○Masaki Fukuyo¹, Noriko Takahashi^{2,3}, Katsuhiro Hanada⁴, Koji Yahara⁵, Hideo Yonezawa^{3,6}, Naoki Osada⁷, Atushi Kaneda^{1,8}, Ikuo Uchiyama⁹, Takako Osaki³, Ichizo Kobayashi^{2,3,10} (1Grad. Sch. Med., Chiba Univ., ²Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, ³Fac. Med., Kyorin Univ., ⁴Fac. Med., Oita Univ., ⁵Antimicrob. Resist. Res. Cent., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁶Dept. Microbiol., Tokyo Dent. Coll., ⁷Div. Bioeng. & Bioinf., Hokkaido Univ., ⁸Health & Dis. Omics Ctr., Chiba Univ., ⁹Lab. Genome Inform., Natl. Inst. Basic Biol., ¹⁰Res. Ctr. Micro/Nanotechnol., Hosei Univ.)

胃癌は本邦において年間4万人死亡する重大疾患であり, その主因はピロリ菌である。ピロリ菌の病原因子についてはCagA 等様々な因子が研究されているが, ホストゲノムにどのように作用して発癌に至るのかは分かっていない。一方, 私達は塩基を切り出す新しい型の制限酵素ファミリーを発見し, ピロリ菌にもこの酵素を発見した (Fukuyo et al. NAR, 2015, Zhang et al. NAR, 2017)。今回, 我々はピロリ菌のこの酵素ファミリー HpPabI が胃がんを引き起こすのではないという仮説の検証を多方面から行い, 以下の証拠を得た。(1) NIH のピロリ菌ゲノムプロジェクト HpGP 株 1000 株と公開ゲノムを合わせて調べたところ, 「胃がん患者由来であること」と, 「この制限酵素の遺伝子を無傷で持つこと」の間に強い関連を発見した。(2) この制限酵素の認識配列 GTAC の塩基切り出しサイト A での変異が, 胃がんゲノムでは頻繁に起きていることを, 4-mer 変異シグナチャー解析から突き止めた。その変異を持つ遺伝子には, 胃がんでの役割が知られているものがあつた。(3) 培養ヒト細胞にピロリ菌を感染させると, この制限酵素がヒト染色体の切断を起こすことを, パルスフィールドゲル電気泳動で証明した。(4) 大腸菌の変異検出系で, この制限酵素が変異生成を上昇させた。さらに, この制限酵素の立体構造を予測し, DNA との結合サイトで多様化選択が起きたことを示した。これらの結果は, ピロリ菌のこの制限酵素が胃がんを起こすことを示す。他の種類のがんでも, k-mer 変異シグナチャーの解析から, 同様な細菌-制限酵素の対を発見した。欄外共著者: 石川健 11), 寺林健 4), 桂有加子 12)

11) 久留米大・生命科学, 12) 京大・ヒト行動進化

P2-072

利己的な可動遺伝因子によるファージ防御システム回避機構

○千原 康太郎, アザム アア ハエルマン, 氣賀 恒太郎 (国立感染症研究所・治療薬ワクチン開発研究センター)

Evasion of Phage Defense Systems by Selfish Mobile Genetic Elements

○Kotaro Chihara, Aa Haeruman Azam, Kotaro Kiga (Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis.)

細菌はファージ感染を克服するため, 多様な抗ファージ防御システムを獲得している。代表的な例として制限修飾系や CRISPR-Cas システムが挙げられるが, 近年の研究により 150 以上の新規防御システムが発見されている。一方, ファージ側はこれらの防御システムに対抗する阻害因子を獲得し, 両者は進化的な軍拡競争の関係にある。我々はこれまで, 新規防御システム「Retron Eco-7」に着目して研究を行ってきた。この系では, ファージ感染時にエフェクター因子が活性化し, 宿主の tRNA-Tyr を分解することで不稔感染を誘導することを示した。一方, ファージ由来の tRNA-Tyr が, 分解された宿主の tRNA-Tyr を補充し, Retron Eco-7 の防御活性を中和することも明らかにした。さらに我々は, 新規防御システム「Septu (セプトゥ)」が, ファージ感染時に宿主 tRNA の分解を誘導すること, ファージ由来 tRNA の補充によってその防御活性が中和されることを確認した。つまり, “tRNA 分解による感染防御とファージ由来 tRNA 補充による防御システムの中和”は, 細菌とファージの軍拡競争における普遍的な現象と考えられる。興味深いことに, 一部のファージは利己的可動遺伝因子によってゲノム上の tRNA のコピー数を増やし, Septu を回避する能力を進化的に獲得していることを発見した。加えて, 系統学的解析により, 利己的可動遺伝因子と tRNA がファージゲノム上で高頻度に共局在していることが示された。このことは, 広範なファージが防御システムの対抗策として, 可動遺伝因子を採用していることを示唆している。

P2-073

FRI 型カルバペネマーゼ遺伝子搭載プラスミドの F 因子依存的な可動性

○久保田 寛顕¹, 小林 甲斐¹, 水戸部 森歌¹, 上養 義典², 鈴木 康規³, 鈴木 淳¹, 貞升 健志¹ (1都健安研・微生物部, ²慶應大・医・臨床検査医学, ³北里大・獣医・獣医衛生学)

F-factor-dependent mobility of FRI-type carbapenemase-encoding plasmids

○Hiroaki Kubota¹, Kai Kobayashi¹, Morika Mitobe¹, Yoshifumi Uwamino², Yasunori Suzuki³, Jun Suzuki¹, Kenji Sadamasu¹ (1Dept. Microbiol., Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, ²Dept. Lab. Med., Sch. Med., Keio Univ., ³Lab. Animal Hygiene, Sch. Vet., Kitasato Univ.)

我々は, 2018 年から 2019 年にかけて欧米外で初めて FRI 型カルバペネマーゼ遺伝子の亜型である FRI-4, FRI-5 を, 臨床分離 Enterobacter asburiae が運搬するプラスミドから検出し, 報告した。その後, これまでに報告されている 13 種類の FRI 型遺伝子全てがプラスミド性であると確認されている。しかし, FRI-6 型搭載のひとつを除いて実験的に大腸菌 J53 に伝達するプラスミドは確認されておらず, どのようにして FRI 型遺伝子が拡散しているかが定かではない。そこで, FRI 型搭載プラスミドが可動性プラスミドとして伝達していると仮定し, 実験検証を行った。まず, FRI-4 型搭載プラスミド (pTMTA61661) をいくつかの大腸菌株に対してエレクトロポレーションにて強制的に導入して供与菌とし, 受容菌である J53 に伝達するかを調べた結果, F 因子が機能する XL1-blue と SS360 から伝達することを見出した。次に, 断片化した pTMTA61661 に対する F 因子由来 TraI によるブルダウン, ならびに Nicking assay を行うことで, F 因子に類似しつつも過去に報告のない伝達開始点 (oriT) を特定した。興味深いことに, この oriT は多くの FRI 型搭載プラスミドに共通していたことから, これらのプラスミドは可動性プラスミドとして F 因子依存的に拡散される共通の性質を有していると考えられた。さらに, pTMTA61661 には自己伝達には不十分ながらいくつかの接合関連遺伝子が存在し, RNAseq により発現していることが確認された。既報のどの FRI 型搭載プラスミドも一定数の接合関連遺伝子を保有し, その保有数はプラスミドによって異なるが, このことが可動性効率に影響するかについては今後の検証課題と言える。

P2-074

Mycobacterial giant linear plasmids carry a tRNA array

○矢野 大和^{1,2}, 有川 健太郎³, 池田 治生⁴, 野々山 翔太², 丸山 史人⁵, 木田 博⁶, 阿戸 学⁷, 岩本 朋忠³, 西内 由紀子⁵ (¹感染研・薬剤耐性研セ, ²東北大・院生命, ³神戸市・健康科学研, ⁴次世代天然物化学技研, ⁵広島大・IDEC, ⁶NHO大阪刀根山医療セ, ⁷感染研・ハンセン病研セ)

○Hirokazu Yano^{1,2}, Kentaro Arikawa³, Haruo Ikeda⁴, Shouta Nonoyama², Fumito Maruyama⁵, Hiroshi Kida⁶, Manabu Ato⁷, Tomotada Iwamoto³, Nishiuchi Yukiko⁵ (¹AMR-RC, NIID, ²Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ., ³Kobe Inst. Health, ⁴NGNPC, ⁵IDEC, Hiroshima Univ., ⁶NHO Osaka Toneyama Med. Cntr., ⁷Leprosy Res. Cntr., NIID)

Nontuberculous mycobacteria, exemplified by *Mycobacterium avium*, are opportunistic pathogens that cause chronic lung diseases. Members of nontuberculous mycobacteria occasionally carry clustered tRNA genes, called tRNA array, a putative anti-defense system in their genomes. To date, information on the genomic location of the tRNA array remains lacking. To corroborate this, we determined complete genome sequences of five *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains carrying a tRNA array by a hybrid assembly of long reads and short reads followed by manual curation. The assembly results suggested that these strains possess three to five extrachromosomal DNA elements. The tRNA array was located on a linear contig comprising 300 kb to 460 kb in all five strains. PFGE and SDS-PAGE experiments revealed that the linear contigs originate from linear plasmids, and their termini are covalently linked to protein. The five linear plasmids commonly possess ca. 400-bp inverted repeats at the termini and encode a new type of ESX-P system. Members of this specific linear plasmid group were so far detected only in *M. avium* isolates from Japan, suggesting their recent acquisition by horizontal gene transfer in the East Asia. This study presents the first experimental evidence that genus *Mycobacterium* possesses giant linear plasmids carrying a tRNA array and inverton-type termini.

P2-075

志賀毒素産生性大腸菌 O145 の志賀毒素ファージの多様性と志賀毒素 2 型産生性に関連するファージ尾部構造

○中村 佳司¹, 伊豫田 淳², 林 哲也¹ (¹九大院・医・細菌学, ²感染研・細菌第一)

Diversity of Stx phages and the Stx2 production levels associated with short- or long-tailed phages

○Keiji Nakamura¹, Sunao Iyoda², Tetsuya Hayashi¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ., ²Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis.)

志賀毒素 (Stx) 産生性大腸菌 (STEC) の病原因子である Stx1・Stx2 はバクテリオファージ (Stx phage) にコードされている。Stx phage はファージの形態に関わる遺伝子群の組成によって、O157 Sakai 株の Sp5 様の short-tailed phage (S-Stx phage) と、ラムダファージ様の long-tailed phage (L-Stx phage) の 2 つに大別できる。STEC 感染症重篤化の危険因子である Stx2 の産生はファージ誘導に密接に関連しており、我々はこれまでに、Stx2 phage のゲノム多様性が宿主菌の Stx2 産生量に影響することを報告してきた。また、STEC 主要血清型の O145 の 239 菌株を対象としたゲノム解析により、本血清型の集団構造や Stx 遺伝子の分布などを明らかにしてきたが、Stx phage 及び宿主菌株の Stx2 産生性の多様性の実態は不明である。本研究では、O145 系統を代表する 71 菌株が保有する計 84 の Stx ファージゲノムを解析することで、Stx ファージの高度なゲノム多様性と系統内における動態を明らかにした。また、O145 菌株の Stx2 産生性を比較し、S-Stx2 phage 保有株が L-Stx2 phage 株よりも有意に高い Stx2 産生量を示すことを見出した。ファージ誘導に関与する遺伝子群をコードする初期領域のゲノム解析を行った結果、形態形成遺伝子群と同様に、本領域の遺伝子組成も S-Stx2 phage と L-Stx2 phage の間で明らかに異なっていたため、2 つの尾型の間における初期領域の配列多様性が宿主菌株の Stx2 産生性の明らかな違いに影響していると考えられた。(謝辞) O145 菌株を分与にご協力頂いた衛生研究所の先生方: 磯部先生、木全先生 (富山県), 井川先生 (長野県), 北橋先生 (千葉市), 高橋先生 (青森県), 野本先生 (神戸市), 岩淵先生 (岩手県), 森本先生 (北海道)

P2-076

プロファージが仕掛ける外来ファージ防御戦略メカニズムの解明

○田村 あずみ^{1,2,3}, 千原 康太郎¹, Aa Haeruman Azam¹, 小島 新二郎¹, 近藤 恒平⁴, 中村 暢宏¹, 渡士 幸一¹, 高橋 宜聖¹, 四柳 宏^{2,3}, 氣賀 恒太郎^{1,5} (¹国立感染研・治ワク, ²東大・院新領域・メディカル情報生命, ³東大・医科研・感染症分野, ⁴国立感染研・AMRセンター, ⁵自治医科大・医・細菌学)

Elucidation of the mechanism of the phage defense system derived from *Escherichia coli* prophage

○Azumi Tamura^{1,2,3}, Kotaro Chihara¹, Aa Haeruman Azam¹, Shinjiro Ojima¹, Kohei Kondo⁴, Tomohiro Nakamura¹, Koichi Watashi¹, Yoshimasa Takahashi¹, Hiroshi Yotsuyanagi^{2,3}, Kotaro Kiga^{1,5} (¹Res. Ctr. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ²Dept. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Univ. of Tokyo, ³Div. Infect. Dis., Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo, ⁴AMR Res. Ctr., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁵Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

細菌が保有する「ファージ防御システム」の研究が盛んに行われている中、細菌ゲノムに組み込まれたプロファージが、侵入するファージを防ぐ仕組みが注目されている。しかし、その防御メカニズムについては十分に解明が進んでいない。

本研究では、大腸菌株に広く保存されているプロファージ由来の遺伝子が、複数の溶菌ファージに対して防御活性を持つことを明らかにした。構造予測 (AlphaFold3) により、この防御システムが四量体を形成することが示唆された。また、この防御システムの有するヌクレアーゼドメインが防御活性に必須であることを確認した。

さらに、侵入ファージの尾部タンパク質がこの防御システムの活性化に重要な役割を果たすことを見出した。尾部タンパク質における防御システム活性化に必要な 2 つのアミノ酸を特定し、それらが防御システムへの結合を介して自己誘導的な細菌死を引き起こし、結果としてファージの増殖を阻害する仕組みが示唆された。

本研究によって、プロファージが外来のファージを阻害するメカニズムが解明された。この成果は、細菌とファージの進化的相互作用の解明や、プロファージに阻害されないファージ開発など、新たな抗菌戦略の開発に貢献することが期待される。

P2-077

IncF 型薬剤耐性プラスミドに低接合率を示す薬剤感受性大腸菌の探索

○林 謙吾¹, 鈴木 匡弘¹, 土井 洋平^{1,2,3} (¹藤田医科大・医・微生物, ²藤田医科大・医・感染症, ³ピッツバーグ大・医・感染症)

Search for *Escherichia coli* with low conjugation frequency against IncF plasmid encoding AMR genes

○Kengo Hayashi¹, Masahiro Suzuki¹, Yohei Doi^{1,2,3} (¹Dept. Microbiol., Sch. Med., Fujita Health Univ., ²Dept. Infect. Dis., Sch. Med., Fujita Health Univ., ³Div. Infect. Dis., Sch. Med., Pittsburgh Univ.)

近年、外来遺伝子に対する細菌の防御機構が数多く発見されている。そこにはプラスミド防御機構も含まれているが、薬剤耐性遺伝子をコードしたプラスミドを特異的に防御する機構についてはあまり知られていない。腸内細菌目細菌は耐性プラスミドを獲得して耐性化することが知られており、なかでも薬剤耐性大腸菌では IncF 耐性プラスミドを獲得して耐性化している菌株の割合が高い。一方で、大腸菌には耐性菌検出率の低い遺伝子型 (ST: Sequence Type) の報告もあるが、その中のごく一部の ST において CRISPR による防御が関与していると示唆する報告があるのみで、多くの遺伝子型では原因が判明していない。この原因を明らかにすることは、薬剤耐性遺伝子の伝播の可否を考えるうえで重要な要素となる可能性がある。そこで我々は耐性プラスミド防御に関与する要因探索の第一段階として、薬剤感受性大腸菌を対象に臨床分離 ESBL 産生大腸菌から得られた IncF プラスミドを受け取りにくい菌株を調査した。

耐性プラスミドの接合はフィルター法にて実施し、供与菌と受容菌にはそれぞれ大腸菌 β3914 と臨床分離薬剤感受性大腸菌 112 株を用いた。加えて MLST, plasmid replicon typing, pMLST, バクテリオシン、防御システムを解析した。

感受性大腸菌 112 株のうち、18 株で接合体が得られなかった。また残り 94 株中において標準偏差-2SD を下回った 2 株も接合率が低いとし、合計 20 株を本研究での低接合率株と定義した。これら 20 株では ST73 と ST357 の占める割合がその他の ST と比較して多かった。ST73 における低接合率株では III 型制限修飾系を保有する菌株が多く、制限系によってプラスミドが排除されている可能性が考えられた。

P2-078**大腸菌の転写制御における H-NS ホモログの重要性**

○大島 拓 (富県大・工・生物工)

Importance of H-NS homologs in the transcriptional regulation of *E. coli*

○Taku Oshima (Dept. Biotechn., Toyama Pref. Univ.)

多くの細菌には、遺伝子水平伝搬の際に、外来遺伝子が発現することにより生じる宿主の転写ネットワークへの悪影響を避けるため、外来遺伝子の発現を特異的に抑制するサイレンサーが存在する。基礎研究で頻繁に用いられる大腸菌 K-12 株には、H-NS と呼ばれるサイレンサーが存在し、そのホモログが 3 種存在している。H-NS も含めた、4 つの H-NS ホモログタンパク質のうち、DNA と強く結合することが可能なホモログが 2 種、DNA との結合能が、ほとんどないホモログが 2 種存在し、DNA との結合能がないホモログは DNA との結合能を持つホモログと相互作用して機能する。しかしながら、DNA との結合能を持たないホモログを欠損しても、大きな表現型は見出されず、これらのホモログの生物学的な重要性はほとんどわかっていない。本発表では、DNA 結合能を持たない H-NS ホモログの特定の growth phase においてのみ、強く観察される炭素代謝に関わる生物学的な重要性について報告する。

P2-079/FL3-25**A novel Retron targeting multiple tRNAs confers robust phage resistance**

○アザム アア ハエルマン, Matthew Imanaka, Wenhan Nie, 千原 康太郎, 小島 新二郎, 高橋 宜聖, 渡士 幸一, 氣賀 恒太郎 (国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Aa Haeruman Azam, Matthew Imanaka, Wenhan Nie, Kotaro Chihara, Shinjiro Ojima, Yoshimasa Takahashi, Koichi Watashi, Kotaro Kiga (Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases)

Retrons are bacterial defense systems that utilize reverse transcriptase (RT), multicopy single-stranded DNA (msDNA), and diverse effector proteins. Retron-Eco7, a type IA retron, targets tRNA-Tyr to inhibit phage infection. However, some phages evade this defense by overproducing tRNA-Tyr (Azam et al., Nat Commun 2024). In this study, we identified a novel type IA retron, retron-Kp85, from *Klebsiella pneumoniae*. Unlike retron-Eco7, retron-Kp85 blocks multiple phages from different genera. Overexpression of PtuA and PtuB from retron-Kp85 downregulated multiple bacterial tRNAs, suggesting that retron-Kp85 targets more than one tRNA to abort phage infection. Functional analysis confirmed that tRNA and PtuB serve as effector proteins in retron-Kp85, while the RT and non-coding region act as an antitoxin component, neutralizing PtuA and PtuB within the retron-Kp85 complex. Furthermore, screening escaper phages revealed that a phage-derived exonuclease triggers retron-Kp85 activation. In vitro assays demonstrated that this exonuclease cleaves retron msDNA, releasing PtuA and PtuB from the retron complex. Our findings reveal the versatility of retron type IA systems and their potential to provide broad-spectrum phage resistance. This knowledge could be exploited to develop novel strategies for engineering phage-resistant bacteria.

P2-080/FL3-26**Identification of novel conjugation gene of pELF-type linear plasmid of *Enterococcus faecium***○久留島 潤¹, 富田 治芳^{1,2} (¹群馬大・医・薬剤耐性菌実験施設, ²群馬大・医・細菌学)○Jun Kurushima¹, Haruyoshi Tomita^{1,2} (¹Lab. Bact. Drug Resist., Sch. Med., Gunma Univ., ²Dept. Bact., Sch. Med., Gunma Univ.)

Enterococcus faecium is the one of the most important antimicrobial resistant bacterial pathogens causing opportunistic infection (e.g. vancomycin resistant enterococci, VRE). Recent genomic epidemiological study revealed that pELF-type linear plasmid family carry those antimicrobial resistance genes in *E. faecium* strains. pELF-type linear plasmids are highly conjugative in experimental condition but has no conventional conjugation gene set identified in circular plasmids. Here, we first developed improved genetic engineering system optimized for *E. faecium* and identified novel conjugation gene (*traC*) that is essential for conjugative transfer of pELF2, a model plasmid for pELF-type plasmid family with VanA-type vancomycin resistance gene. Isogenic pELF2 mutant with in-frame deletion of *traC* failed conjugative transfer to recipient strain in condition of filter or broth mating. Ectopic expression of *traC* gene from synthetic plasmid vector in the mutant completely restored the impaired conjugation. The *traC* gene is conserved among pELF-type plasmids and encodes hypothetical protein with transmembrane domain. Finally, transcriptome analysis showed the *traC* belongs to an operon, designated *tra*_{pELF2} operon. The most of genes in the *tra*_{pELF2} operon show no similarity to conventional conjugation genes, suggesting that pELF-type linear plasmids have unique conjugation system.

P2-081**Genetic variants of hyper-mucoid Group A streptococcus emerged in vitro**○Chang Ma¹, 村瀬 一典¹, 野澤 孝志¹, 竹本 訓彦², 中川 一路¹ (¹京都大・医・微生物, ²Dept. Infectious Diseases, Research Inst., NCGM)○Chang Ma¹, Kazunori Murase¹, Takashi Nozawa¹, Norihiko Takemoto², Ichiro Nakagawa¹ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., ²Dept. Infectious Diseases, Research Inst., NCGM)

Group A streptococcus (GAS) is one of major human pathogenic bacteria and causes a variety of clinical manifestations as well as invasive infections. A number of isolates from patients exhibit mucoid colonies on agar plates. The mucoid morphology is caused by the abundant production of capsular polysaccharides-hyaluronic acid (HA), which is indicative of pathogenic capability. It can be caused by covRS gene mutation, but others are little known. While infect cells with non-mucoid strains (56 strains) and incubate them on plates, we observed the emergence of mucoid-colony variants (MCV) among normal-colony variant (NCV) morphotype in 5 strains (M1, 1 strain; M6, 4 strains). To investigate the genetic basis, we sequenced the genomes of NCV and MCV. The average number of single-nucleotide polymorphisms or insertion/deletion mutations did not differ significantly. However, mutations in covRS genes were found in 77.1% (27/35) of MCV, but not in NCV. Notably, one MCV chromosome contained 1.7-Mb inversion, caused by recombination based on two distant IS genes, and this inversion altered the promoter region of hasABC operon, responsible for HA biosynthesis. Therefore, we found that genetic variants in GAS cause HA overproduction and thereby acquire mucoidization.

P2-082

尿路病原性大腸菌における細胞剥離とシャペロン・アッシャー型線毛の相関性

○嶋本 一葉¹, 井上 陽晴¹, 西川 禎—^{2,3}, 和田 崇之^{1,3} (¹大阪公大院・生・食栄養・微生物, ²帝塚山学院大・食環境, ³大阪公大・大阪国際感染症センター)

Correlation between cell detachment and chaperone-usher fimbria in uropathogenic Escherichia coli

○Kazuha Shimamoto¹, Hiharu Inoue¹, Yoshikazu Nishikawa^{2,3}, Takayuki Wada^{1,3} (¹Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ²Sch. Food Nutr Sci., Tezukayama Gakuin Univ., ³Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

【背景】尿路病原性大腸菌(UPEC)は、尿路を遡上することによって炎症を引き起こす。UPECは多数の病原因子を産生し、なかでもHlyおよびCnfは分泌毒素としてはたらき、宿主細胞の剥離を引き起こす可能性が知られている。さらに、接着因子の保有との関連も示唆されているが、メカニズムや保有遺伝子の前提条件など、詳細は十分に解明されていない。【目的】当研究室が保有するUPEC株の中から、*hly*および*cnf*を保有する株に着目し、P線毛をはじめとしたシャペロン・アッシャー(CU)線毛との相関性について明らかにすることを目的とした。【方法】尿検体から分離された大腸菌(90株)を対象として、リアルタイムPCRを用いて*hlyA*および*cnf1*を検出した。両遺伝子の保有株をゲノム解読し、MLSTが一致する菌株間で比較解析を行った。さらに、代表的なCU線毛遺伝子を網羅的に検索・抽出し、細胞剥離との相関性を評価した。【結果と考察】本研究に供試したUPECのうち16株(17.8%)が*hlyA*および*cnf1*を保有しており、MLSTではST12(2株), ST95(3株), ST73(6株), ST127(2株), およびST998(3株)に分類された。また、HEp-2への感染実験により、そのうち10株が細胞剥離を引き起こすことが示された。ST73を除く菌株(10株)では、P線毛遺伝子(*pap*)の配列保存性と細胞剥離に相関があった。一方、ST73については*pap*遺伝子に多様な変異、欠損が認められる場合でも細胞剥離を引き起こす菌株が見出され、未知の分子機序が背景となっている可能性がある。現在、それらについて完全長ゲノム解読を進行中であり、本総会ではその比較結果と合わせて報告する予定である。(会員外協力者: 藤原佐美)

P2-083

大腸菌多細胞化因子 EibG の腸管出血性大腸菌における分布と多様性

○小高 優人^{1,2}, 李 謙—², 石嶋 希², 明田 幸宏², 伊豫田 淳², EHEC Working Group³ (¹都立大・理, ²感染研・細菌1, ³地方衛生研究所等)

Distribution and diversity of *E. coli* multicellularization factor EibG in enterohemorrhagic *E. coli*

○Yuto Kotaka^{1,2}, Ken-ichi Lee², Nozomi Ishijima², Yukihiro Akeda², Sunao Iyoda², EHEC Working Group³ (¹Dept. Biol. Sci., Tokyo Metropolitan Univ., ²Dept. Bacteriol. 1, Natl. Inst. Infect. Dis., ³Pub. Health Inst.)

腸管出血性大腸菌(EHEC)の病原性には、LEE(Locus of enterocyte effacement)遺伝子群による宿主細胞への接着が重要な役割を果たしている。一方、臨床的には重症例を含む有症者からも、LEEを持たないEHEC(LEE-neg EHEC)が繰り返し単離されている。我々はLEE-neg EHECにおける接着因子の同定を進めており、その過程でEHECが鎖状に多細胞化しながら培養細胞へ接着する表現型(Chain-Like Adhesion; CLA)と原因遺伝子*eibG*(*E. coli* immunoglobulin binding protein G)を報告している。*EibG*は免疫グロブリン結合蛋白質Eibファミリー蛋白質であり、IgGのFc領域への結合活性を持つとともに培養細胞への接着に関与する。我々は保有するEHECドラフトゲノムをbaktaによりアノテーションし、アミノ酸配列ベースの相同性検索によって、臨床分離株における*EibG*の分布と多様性を解析した。2022年以降に国内で分離された642株のLEE-neg EHECのうち、*EibG*および*EibG*様タンパク質を保有する株は191株(29.8%)存在し、O91, O128を中心に多様な血清群で見出された。次に、得られた*EibG*様タンパク質をmmseq2によって14クラスターに分類した。これらの*EibG*様タンパク質はAlphaFoldによる立体構造予測からN末端部分の構造に多様性が見出された。多様性が見出された各系統の*EibG*様タンパク質ごとに、HEp-2細胞への接着表現型、ヒトIgGへの結合活性を調べたところ、IgGへの結合活性とCLA表現型は必ずしも関連がないことが明らかとなった。今後、これらの多様な*EibG*様タンパク質を用いた解析から*EibG*によるEHECの多細胞化機構やその分子メカニズム、病原性への寄与などの解明を目指す。

P2-084/FL3-27

κ-シャペロン・アッシャー(CU)線毛におけるオペロン構造の多様性

○井上 陽晴¹, 和田 崇之² (¹大阪公大院・生・食栄養・微生物, ²大阪公大・大阪国際感染症研究センター)

Diversity of operon structure in kappa-chaperone usher (CU) fimbriae

○Hiharu Inoue¹, Takayuki Wada² (¹Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ²Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

【背景】シャペロン・アッシャー(CU)線毛はグラム陰性菌の菌体構造であり、菌体外の環境や宿主に接着する役割を担う。大腸菌はゲノム内に平均10個程度のCU線毛オペロンを保有し、それぞれが異なる接着特性を発揮して生存ニッチを拡大する役割を果たしていると考えられる。CU線毛は6つの系統群に分類できるが、その1つであるκ-CUには家畜下痢症の原因となるETECが保有するF4(K88), F5(K99), F18のほか、ヒト細胞への接着因子として知られるCS13などが含まれる。【目的】CU線毛系統群の1つであるκ-classに注目し、大腸菌ゲノムにコードされたκ-CUオペロンの遺伝的多様性と構造的特徴を明らかにすることを目的とした。【方法】BV-BRCデータベースより、ヒトおよび家畜由来の大腸菌ゲノム配列(17,799株)を取得した。そこからアッシャー遺伝子を探し、前後のORFを抽出してκ-CUオペロンを構成する遺伝子のオーソログ関係を網羅的に抽出した。【結果】κ-CU線毛は1,624株(9.1%)が保有し、その保有頻度は分離宿主によって異なった。全てのκ-CU線毛(1,752本)は既知のCU線毛(K99, F18, K88)に対応する3つの主要系統に細分類された。このうち、K88系統におけるオペロン構造は大きく2パターンに分類され、主要アドヘジン遺伝子のマルチコピー化や、関連遺伝子との共発現を示唆する多様な遺伝子構成が確認された。【考察】κ-CUはヒトを含む多様な動物宿主に接着能をもたらすことが報告されており、アドヘジンの遺伝的多様性・オペロン構造変化がその宿主選択性に関与している可能性が示唆される。

P2-085/FL3-28

クライオ電子顕微鏡によるETEC由来IV型線毛CFA/IIIの立体構造解析

○馬場 輝星¹, 沖 大也², 村本 龍希¹, 今井 友也⁴, 吉田 卓也³, 上田 卓見³, 松田 重輝^{2,5}, 飯田 哲也^{2,5}, 中村 昇太^{2,5}, 河原 一樹^{3,5} (¹大阪大・薬, ²大阪大・微研, ³大阪大院・薬, ⁴京都大・生存研, ⁵大阪大・感染症総合教育研究拠点)

Cryo-electron microscopy structure of Type IV pilus CFA/III from ETEC

○Teruhoshi Baba¹, Hiroya Oki², Ryuki Muramoto¹, Tomoya Imai⁴, Takuya Yoshida³, Takumi Ueda³, Shigeaki Matsuda^{2,5}, Tetsuya Iida^{2,5}, Shota Nakamura^{2,5}, Kazuki Kawahara^{3,5} (¹Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ²RIMD, Osaka Univ., ³Grad. Sch. Pharm. Sci. Osaka Univ., ⁴RISH, Kyoto Univ., ⁵CiDER, Osaka Univ.)

腸管毒素原性大腸菌(ETEC)の病原性発現には、宿主腸管上皮への定着が必須であり、その機能は定着因子が担っている。ETECが保有する定着因子の一種である定着因子抗原III(CFA/III)は、*caf*オペロンと命名された遺伝子クラスターの働きにより形成されるIV型線毛であり、ピリンと呼ばれる構成要素が螺旋状に会合した糸状構造体である。IV型線毛は、腸管上皮への付着、凝集、バイオフィーム形成、可溶性定着因子の分泌など、細菌定着における様々な過程に関与することから、ワクチンや定着阻害剤の有望な標的と考えられている。しかしながら、巨大かつ不溶性である特徴から、その構造生物学的研究は進んでおらず、これまでに得られたIV型線毛の構造モデルは、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法により得られたサブユニット構造を、中〜低分解能で得られた線毛の電子顕微鏡(EM)マップに当てはめた推定構造であった。そのため、本研究では、クライオEMを用いてCFA/IIIの立体構造を近原子レベルで明らかにし、より正確な構造情報を得ることを目的とした。CFA/III産生性大腸菌株をCFA寒天培地により培養し、菌体上に線毛を発現させた後、超遠心分離などの手法により線毛成分を精製し、クライオEMにより構造解析を実施した。その結果、約2.4Åの高い分解能でクライオEMマップを得ることに成功し、得られたEMマップから、アミノ酸側鎖を含むCFA/IIIフィラメントの立体構造を構築することができた。本発表では、得られた近原子レベルの構造情報と種々のアミノ酸変異実験に基づき、ETECが保有するIV型線毛の形成機構および構造安定性について議論する。

P2-086

High cell density drives biofilm formation in *Vibrio cholerae* despite HapR repression

○Jant Cres Caigoy¹, 島本 敏¹, 成谷 宏文², Zhiqun Yan³, 島本 整¹ (1)広島大・院・統合生命科学, 2)十文字学園女子大・人間生活・食品開発, 3)丸善製薬株式会社)

○Jant Cres Caigoy¹, Toshi Shimamoto¹, Hirofumi Nariya², Zhiqun Yan³, Tadashi Shimamoto¹ (1)Grad. Sch. Int. Sci. Life, Hiroshima Univ., 2)Grad. Sch. Human Life Sci. Jumonji Univ., 3)Res. Cent. Maruzen Pharm. Co. Ltd)

The pathogenicity of *Vibrio cholerae* during infection is characterized by colonization of the intestinal wall and cholera toxin production. *V. cholerae* forms biofilms in response to cell density, promoting biofilm formation at low cell density and repressing it at high cell density by HapR activation. However, we found that the pathogen employs strategies to override HapR-mediated biofilm repression under HCD, allowing continued biofilm formation. One mechanism involves mutations in the *hapR* gene resulting to a non-functional HapR protein. Frameshift and terminal deletion HapR variants showed significantly greater biofilms versus wild-type HapR strains. Biofilm formation assay using *hapR* allele-exchange mutants of a functional and non-functional HapR variants confirmed that these mutations enable robust biofilm formation even under HCD. In HapR-positive variants, we found that the ArcAB system promotes biofilm formation by repressing *hapR* transcription under anoxic conditions. Isogenic deletion of the *arcA* and *arcB* genes, followed by biofilm formation assay, confirmed that this regulation is evident only in HapR-positive strains. This dual strategy highlights the pathogen's evolutionary flexibility. These mechanisms facilitate biofilm formation under HCD and contribute to *V. cholerae*'s resilience against stressors, such as fluctuating oxygen levels and host immune responses.

P2-087

ヒト腸内常在細菌 *Mediterraneibacter gnavus* の腸管定着時に高発現する遺伝子の機能解析

○声名 琉¹, 野村 暢彦^{2,3}, 尾花 望^{3,4}, 福田 真嗣^{3,4,5,6,7,8} (1)筑波大・生物資源, 2)筑波大・生命環境系, 3)筑波大・MiCS, 4)筑波大・医・TMRC, 5)慶大・先端生命研, 6)神奈川産技総研, 7)順天堂大・医, 8)(株)メタジェン)

Functional analysis of genes highly expressed during gut colonization in *Mediterraneibacter gnavus*

○Ryu Ashina¹, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Nozomu Obana^{3,4}, Shinji Fukuda^{3,4,5,6,7,8} (1)Biol. Resource Sci., Tsukuba Univ., 2)Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3)MiCS, Univ. Tsukuba, 4)TMRC, Inst. Med., Univ. Tsukuba, 5)Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., 6)KISTEC, 7)Inst. Med., Univ. Juntendo, 8)Metagen. Inc.)

ヒトの腸管内にはおよそ 40 兆個の細菌が常在しており、ヒト-腸内細菌叢間相互作用は宿主の疾患や健康に深く関与する。*Mediterraneibacter gnavus* はヒト腸内常在細菌の一種であり、炎症性腸疾患 (IBD) などの様々な疾患との相関が報告されている。一方で、本菌の腸管定着機構や病原性に関与する遺伝子の報告は乏しい。本研究では、*M. gnavus* の宿主腸管定着に関与する遺伝子を同定および解析することによって、本菌の腸管定着機構の解明を目的とした。宿主腸管定着に重要な遺伝子は、宿主腸管環境に应答して発現が上昇すると予測した。無菌マウス腸管に定着した *M. gnavus* および試験管培養した *M. gnavus* より RNA を抽出し、*in vivo* と *in vitro* の遺伝子発現を比較した。RNA シーケンス解析の結果より、*kdp* オペロンの発現が *in vivo* で 100 倍以上も大幅に上昇していることが明らかになった。*kdp* オペロンはカリウム輸送体である KdpFABC と KdpD1 をコードする。*KdpD* は広く保存される二成分制御系のセンサーキナーゼ (SK) であるが、本菌では KdpD1 と KdpD2 に分断されており、KdpD1 は標的タンパク質の翻訳後制御に関わる N 末端のドメインを有し、KdpD2 は転写制御に関わる SK ドメインを有する。*M. gnavus* の *kdpB* および *kdpD1* の各破壊株を用いた野生株に対する *in vivo* 競合試験の結果、*kdpB* は腸管定着に影響を与えない一方で、*kdpD1* は腸管定着に寄与することが示唆された。本菌では KdpD1 による標的タンパク質の翻訳後制御が腸管定着に寄与する可能性が考えられた。

P2-088

ウェルシュ菌表層上のオートリシン Acp と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の複合体形成

○松永 望¹, 青野 りよ², 櫃本 泰雄¹, 片山 誠一¹ (1)岡理大・理・臨床生命, 2)香川保健医療大・保健医療学・臨床検査学)

Complex formation of GAPDH with autolysin (Acp) on *Clostridium perfringens* surfaces

○Nozomu Matsunaga¹, Riyo Aono², Yasuo Hitsumoto¹, Seiichi Katayama¹ (1)Dept. Life Sci., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., 2)Dept. Med. Tech., Kagawa Pref. Univ. Health Sci.)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は解糖系に関与する酵素ではあるが、近年、様々な病原細菌において菌体表出に出現し、その病原性が注目されている。我々もまたウェルシュ菌において GAPDH が表出していることを見出した。先行研究において黄色ブドウ球菌ではオートリシンと GAPDH が複合体を形成して、GAPDH が菌体へ表出していることが報告されている。そこで本研究では、ウェルシュ菌菌体表層上のオートリシンである Acp が GAPDH との複合体形成に関与している可能性について検討した。菌株は土壌分離株である strain 13 株 (st 13 株), st13 株を親株として *acp* 遺伝子 (CPE1231) を欠損させた *acp::erm* 株、およびキシロース誘導型プロモーター下流に *acp* 遺伝子を挿入し *acp::erm* 株へ形質転換させた *acp::erm/pacp* 株を用いた。ELISA により、菌体表層の GAPDH 量は st13 株と比較して *acp::erm* 株では有意に減少し、さらにキシロース誘導による *acp::erm/pacp* 株では GAPDH の表出量が回復した。また、フローサイトメトリーの解析でも *acp::erm* 株と比較し、st 13 株では菌体表層に GAPDH 表出していることが分かった。蛍光免疫染色により、Merge 像では GAPDH と Acp が共染色されていることが観察された。以上のことから、ウェルシュ菌 GAPDH は Acp と複合体を形成することにより菌体表層へ表出していることが考えられた。

P2-089

尿路感染症(UTI)マウスの膀胱内で高発現する尿路病原性大腸菌 (UPEC) 由来蛋白質の同定と機能解析

滝田 綾子¹, 下川 瑞起¹, 鈴江 一友², 木村 鮎子³, 田保 日向鈴², 佐藤 百美佳¹, 富田 治芳¹, 〇平川 秀忠¹ (1)群馬大・医・細菌, 2)群馬大・医・生体防御, 3)群馬パース大・保・医療科学)

Identification of UPEC derived proteins highly expressed in the bladder of mice with UTI

Ayako Takita¹, Mizuki Shimokawa¹, Kazutomo Suzue², Ayuko Kimura³, Himari Tabo², Yumika Sato¹, Haruyoshi Tomita¹, 〇Hidetada Hirakawa¹ (1)Dept. Bacteriol., Sch. Med., Gunma Univ., 2)Dept. Biodefens., Sch. Med., Gunma Univ., 3)Dept. MedSci., Sch. Health Sci., Gunma Paz Univ.)

UPEC は、UTI を引き起こす主要な起因菌である。この細菌は、尿路上皮細胞に付着、侵入し、バイオフィルム様のマイクロコロニーを形成する。その結果、様々な抗菌薬や自然免疫に対して抵抗性を持つことから、UPEC による UTI は、難治化リスクが高いと考えられている。私たちは、UPEC の感染および、難治化に寄与する責任因子を探索する目的で、感染部位である膀胱内において高発現する UPEC の蛋白質に着目している。本研究では、UTI マウスから膀胱を摘出し、プロテオーム解析により UPEC 由来の蛋白質を同定した。その中で、リボソーム蛋白質やシャペロン蛋白質、呼吸に関するものなど生存必須あるいは生存に極めて重要な蛋白質の多くが含まれていた一方で、シデロフォア合成酵素 EntF や外膜蛋白質 OmpA など尿路への感染に寄与していると報告されている蛋白質も検出された。そこで、上記を除く蛋白質について該当する遺伝子欠損株を作製し、UTI マウスモデルを用いて病原性の評価を行った。その結果、*guaB*, *gatD*, *ble*, *azoR* 欠損株は親株と比べて有意に膀胱への感染能が低いことがわかった。中でも、*guaB* 欠損株は、親株よりも 1000 倍以上低い感染能を示した。さらに、定量 PCR 解析とプロモーターアッセイの結果から、*GuaB* は、尿を模倣した人工尿培地において発現が亢進していること、そのメカニズムとして尿に豊富に含まれる尿素によって発現が増強されることを見出した。本研究において、UPEC の病原性因子として新たに *GuaB* を発見した。本蛋白質は、感染部位において発現が亢進しており、UPEC の感染過程において重要な役割を持つことが示されたことから、UPEC 感染症の有望な治療標的になりうるものと期待している。

P2-090/FL3-29

Identification of *Helicobacter pylori* virulence factor that regulates bacterial pathogenicity

○Naomi Aini¹, Weichen Gong², 西田 叶², 三好 智博¹, 三室 仁美¹ (¹大分大・グローカル, ²大阪大・微研)

○Naomi Aini¹, Weichen Gong², Kana Nishida², Tomohiro Miyoshi¹, Hitomi Mimuro¹ (¹RCGLID, Oita Univ., ²RIMD, Osaka Univ.)

Helicobacter pylori is one of the main risk factors of gastric cancer. Outer membrane proteins (OMPs) of *H. pylori* are essential for the attachment of the bacteria to the gastric epithelial cells to establish infection. PomX is an OMP reported to be involved in bacterial adhesion, however the host receptor remains uncharacterized. Phase variation plays a pivotal role in bacterial adaptability and survival within the host, and *pomX* is known to be a phase-variable gene. We aim to investigate whether PomX is involved in bacterial pathogenesis and whether the phase variation of *pomX* is important for persistent infection. A murine infection model was used to evaluate the role of PomX in stomach colonization. We found that ATCC43504 *pomX*-deficient strains showed reduced colonization of the stomach *in vivo*, while a phase-locked PomX mutant did not cause a persistent infection. To identify potential host-binding partners of the PomX protein, pull-down assays were carried out and several candidates were detected. Our findings indicate preliminary evidence of the importance of PomX maneuvering the host immune system, though the underlying mechanisms remain to be elucidated.

P2-091/FL4-01

壊死性筋膜炎マウスモデルの病態形成に *Streptococcus pyogenes* の溶血毒素が果たす役割の検討

○森 あり沙¹, 広瀬 雄二郎¹, 池田 恵莉¹, 大野 誠之^{1,2}, 川端 重忠^{1,3} (¹阪大・院歯・微生物, ²阪大・院歯・バイオインフォ, ³阪大・CiDER)

Role of *Streptococcus pyogenes* hemolytic toxins in necrotizing fasciitis mouse model pathogenesis

○Arisa Mori¹, Yujiro Hirose¹, Eri Ikeda¹, Masayuki Ono^{1,2}, Shigetada Kawabata^{1,3} (¹Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ²Bioinfo., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ³CiDER, Osaka Univ.)

劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (STSS) は、主たる起因菌として *Streptococcus pyogenes* とする致死率の高い感染症で壊死性筋膜炎を伴うことがある。本研究では、マウス壊死性筋膜炎モデルを用い、*S. pyogenes* の溶血毒素である streptolysin S (SLS) および streptolysin O (SLO) がサイトカインストームと横紋筋融解に果たす役割を検討した。まず、*S. pyogenes* 5448 株を親株 (WT) とし、SLS 欠失株 (Δ *sagA*), SLO 欠失株 (Δ *slo*), SLS および SLO の二重欠失株 (Δ *sagA* Δ *slo*) を作製した。栄養培地中で定常期まで培養した各株を PBS に再懸濁し、マウスの後肢に筋肉注射した。感染 24 時間後のマウス後肢では、いずれの菌株の感染群でも明らかな病変は認めなかったが、感染 48 時間後では WT 感染群および Δ *slo* 感染群で Δ *sagA* Δ *slo* 感染群と比較して、重度の病変が認められた。血液中の IL-6, TNF α , IL-1 β 濃度は、 Δ *sagA* Δ *slo* 感染群と比較し、WT 感染群で感染 24 時間後に有意な上昇を認めた。また、横紋筋融解のマーカーである血中ミオグロビン (Mb) 濃度についても、非感染群および Δ *sagA* Δ *slo* 感染群と比較し、WT 感染群で感染 24 時間後に有意に上昇していた。以上の結果より、壊死性筋膜炎マウスモデルにおいて SLS および SLO がサイトカインストームと横紋筋融解に寄与することが示唆された。また、サイトカインおよび Mb 濃度の上昇は、壊死性筋膜炎マウスモデルにおける初期の段階で上昇する分子であることが示された。

P2-092

Vibrio vulnificus の致死性毒素 MARTX 毒素の機能的ドメインの解析

○倉田 寧々¹, 佐々木 まい¹, 土屋 孝弘^{1,2}, 宮本 勝城¹, 駒野 淳¹, 辻坊 裕¹ (¹大阪医薬大・薬・感染制御, ²大阪医薬大・薬・薬学教育推進センター)

The analysis of functional domain of MARTX toxin produced by *Vibrio vulnificus*

○Nene Kurata¹, Mai Sasaki¹, Takahiro Tsuchiya^{1,2}, Katsushiro Miyamoto¹, Jun Komano¹, Hiroshi Tsujibo¹ (¹Dept. Microbiol. Infect. Cont., Osaka Med. Pharm. Univ., ²Ctr. Advance. Pharm. Educ., Osaka Med. Pharm. Univ.)

【目的】*Vibrio vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して感染するグラム陰性桿菌である。基礎疾患を有するヒトが感染すると、数日のうちに敗血症に陥り死亡する。我々は本菌の臨床分離株は実験動物においても重篤な全身症状を示し死に至らしめることを明らかにしてきた。ビブリオ属細菌の Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) 毒素は複数のドメインを有しており、本毒素が細胞内に侵入した後にシステインプロテアーゼドメインが各ドメインに自己切断することにより機能的に働いていると考えられているが、各ドメインの機能や本毒素の細胞内への侵入経路は明らかとなっていない。そこで、本毒素の機能的ドメインの役割を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】臨床分離株 M2799 株を用いて MARTX 毒素自身が自己切断するドメインの欠損株を作製するために、欠損部位の上流域と下流域の塩基配列を pDM4 に挿入し、組換えプラスミドを作製し、大腸菌 SM10 λ *pir* 株を形質転換した。大腸菌 SM10 λ *pir* 形質転換株から M2799 株に接合伝達し、セレクトションを行い、欠損株を作製した。同様に、機能的ドメインすべての欠損株も作製した。各種細胞に対する本菌および欠損株の細胞傷害活性を測定し、比較検討した。

【結果と考察】本菌の機能的ドメインを順に欠損させた株を作製した。得られた欠損株の DNA 配列を解析し、どれもインフレームで目的遺伝子が欠損していることが確認された。現在、種々の欠損株と野生株の各種細胞に対する細胞傷害活性を測定し、MARTX 毒素の各ドメインの機能を解析している。

P2-093/FL4-02

S. intermedius が保有するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの発現制御機構の解析

○平岡 璃久¹, 田端 厚之^{1,2}, 長宗 秀明², 友安 俊文^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学)

Analysis of the expression control mechanism of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *S. intermedius*.

○Riku Hiraoka¹, Atsushi Tabata^{1,2}, Hideaki Nagamune², Toshifumi Tomoyasu^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【序論】*S. intermedius* (SI) は、日和見的にヒトの深部臓器に重篤な膿瘍を形成する。本菌は、血清などに存在する糖タンパク質の糖鎖を切断して資材することが可能である。この切断には、シアリダーゼ (NanA) と多基質グリコシダーゼ (MsgA) が関わっていることが知られている。また、これらグリコシダーゼによって遊離したガラクトースは SI の主要病原因子であるインターメディリシンの発現を活性化することも報告されており、NanA と MsgA は本菌の病原性にも重要な働きを果たしていると考えられている。我々は、SI がエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を示す Endo D を分泌し、NanA と MsgA によって切断された糖鎖に残るコア糖鎖を切断することを発見した。そこで、Endo D が SI の感染部位での生存や病原性にどのような役割を担うか解析する目的で研究を行った。

【結果と考察】本研究では形質転換が容易な PC574 を用いて研究を行っているが、PC574 は Endo D 活性が SI の中で特異的に低いことが分かった。そこで、研究室保有株の中から高い Endo D 活性を示し、且つ形質転換による遺伝子操作が容易な株の探索を行った。その結果、JICC674 が本研究に最適な株であることが分かった。そこでこの株を用いて解析を行ったところ、Endo D の分泌は炭素源の濃度が低い状態で促進されることがわかった。さらに、この制御がカタボライト制御タンパク質 (CcpA) によるためか否かを確認する目的で *ccpA* 破壊株を作製し、Endo D の分泌量を野生株と比較した。その結果、この制御には CcpA はほとんど関与していないことがわかった。現在、Endo D の分泌がどのような機構により制御されているのかについての解析を進めている。

P2-094/FL4-03

Streptococcus mitis 由来ヒト血小板凝集因子の作用に依存的なヒト血管内皮由来細胞株の応答反応

○古賀 結衣¹, 友安 俊文^{1,2}, 長宗 秀明², 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・院創成科学研究科・生物資源学専攻, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業)

Response of human vascular endothelium-derived cells to the action of Sm-hPAF produced from *S. mitis*

○Yui Koga¹, Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Hideaki Nagamune², Atsushi Tabata^{1,2} (¹Div. Bioresour. Sci., Grad. Sch. Sci. & Tech. for Innov., Tokushima Univ., ²Div. Biow. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】川崎病は小児における全身性の血管炎症を伴う疾患である。川崎病患児から単離された *Streptococcus mitis* (SM) の Nm-65 株は、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) ファミリーに属し 5 ドメイン構造を持つ SM 由来ヒト血小板凝集因子 (Sm-hPAF) を産生する。川崎病の明確な病因は不明だが、ウイルスや細菌の感染を誘因とする免疫反応による炎症性サイトカインの産生により血管炎症が生じる発症メカニズムも考えられている。本研究では、Sm-hPAF の作用に対する細胞応答メカニズムを *in vitro* で解明することを目的とした。【方法】ヒト血管内皮由来細胞株 HUEhT-2 を被検細胞とし、Sm-hPAF 組換え体を用いて作用させ、最初期遺伝子群や炎症性サイトカインの遺伝子発現変動を RT-qPCR で検討した。さらに、IL-8 に関しては、ELISA による転写翻訳産物の定量も行った。【結果・考察】Sm-hPAF 組換え体の 1 時間作用では最初期遺伝子群の発現が、24 時間作用では炎症性サイトカイン遺伝子の発現が、それぞれ有意に亢進していた。また、遺伝子発現の亢進が確認された IL-8 では、ELISA により転写翻訳産物の産生亢進も確認された。以上より、血管内皮細胞は、Sm-hPAF の作用に対する初期段階の応答反応として最初期遺伝子群の発現を亢進させ、その後の応答として炎症性サイトカインの産生を亢進させていることが示唆された。本研究により確認された Sm-hPAF 依存的な IL-8 の産生亢進は、Sm-hPAF と川崎病の病態との関連性を示唆するものであると考えられるため、引き続き Sm-hPAF の膜孔形成抑制変異体等を用いて解析を行い、Sm-hPAF の細胞傷害性に依存して惹起される HUEhT-2 の応答反応の詳細に関して検討を進めている。

P2-095/FL4-04

Recruitment of Rab33B to LCV through Legionella effector for association of LCV with the ER

○菅野 涼, 新崎 恒平 (東葉大・生命・感染制御)

○Ryo Sugano, Kohei Arasaki (Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Legionella pneumophila (L.p.) is a gram-negative bacterium that infects human macrophages and causes a serious pneumonia called Legionnaires' disease. After internalized into the host, L.p. creates specialized infectious niche called Legionella-containing vacuole (LCV) and secretes more than 300 bacterial effectors through type IV secretion system. Although it is known that final destination of LCV is host ER and L.p. utilizes host GTPase such as Rab33B for association of LCV with the ER, molecular machinery in which how L.p. subverts the function of Rab33B has been obscured. Previously, we showed that phosphoribosyl ubiquitination (PR-UBnation) of Rab33B by SidE family Legionella effectors is necessary for recruitment of Rab33B to the LCV. Furthermore, we also identified another Legionella effectors, Lpg2518/Lpg2520 as a master regulator of Rab33B. Because removing of GDI by GDF (GDI-displacement factor) and exchanging of GDP to GTP by GEF (guanine nucleotide exchanging factor) are essential for activation of Rab proteins inside the host, Lpg2518/Lpg2520 might have these functions against RP-UBnated Rab33B. Here, we established *in vitro* PR-UBnation assay of Rab33B using purified recombinant proteins and show that Lpg2518/Lpg2520 preferentially associate with PR-UBnated Rab33B. Furthermore, we revealed that Lpg2518/Lpg2520 are a putative GDF against PR-UBnated Rab33B.

P2-096/FL4-05

Effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* on host defense responses of *Caenorhabditis elegans*

○山村 千夏¹, 谷本 佳彦^{1,2,3}, 野本 竜平⁴, 和田 崇之^{1,5}, 中台 枝里子^{1,2,3} (¹大公大院・生・食栄養・微生物, ²京大院・生命, ³京大・医研, ⁴神戸市・健科研, ⁵大阪公大・国際感染症研究センター)

○Chinatsu Yamamura¹, Yoshihiko Tanimoto^{1,2,3}, Ryohei Nomoto⁴, Takayuki Wada^{1,5}, Eriko Nakadai^{1,2,3} (¹Dept. Microbiol. Grad. Sch. Hum. Life Ecol., Osaka Metro. Univ., ²Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., ³LiMe, Kyoto Univ., ⁴Kobe Inst. Heal., ⁵Osaka Intl. Res. Ctr. Infect. Dis., Osaka Metro. Univ.)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the most common cause of diarrhea in developing countries and in travelers to those areas. We previously reported that ETEC strain ETEC1, a clinical isolate, shortens the lifespan of the model organism *Caenorhabditis elegans*. This study investigated the pathogenetic mechanisms of ETEC1 in *C. elegans*. Expression of the ETEC1 toxin genes, heat-labile enterotoxin *eltAB* (LT1) and heat-stable enterotoxin *estA* (STh), was increased upon infection with *C. elegans*. These gene knockout strains, ETEC1Δ *eltAB* and ETEC1Δ *estA*, were created. Nematodes fed ETEC1Δ *eltAB* had a longer lifespan compared to those fed ETEC1-WT. No significant difference in lifespan was observed between ETEC1Δ *estA* and ETEC1-WT groups. These findings indicate *eltAB* is a part of key pathogenetic factor of ETEC1, though other factors may contribute. RNA sequencing and RT-qPCR of *C. elegans* fed ETEC1 revealed upregulation of insulin-like peptide genes, especially *ins-8* and *ins-20*. *C. elegans* loss-of-function mutants of *ins-8* and *ins-20* were infected with ETEC1 and showed no differences in lifespan compared to wild-type N2 nematodes. Insulin signaling may play a role in *C. elegans* defense against ETEC1, but *ins-8* and *ins-20* were presumed not to be directly involved.

P2-097

A 型ウエルシュ菌感染によるガス壊疽に対する新規治療薬の探索研究

○竹原 正也¹, 本間 悠太¹, 阪口 義彦², 山地 俊之¹, 永浜 政博² (¹順天堂大・薬・微生物免疫学, ²徳島文理大・薬・微生物)

Exploratory study of new drugs for gas gangrene caused by *Clostridium perfringens* type A

○Masaya Takehara¹, Yuta Homma¹, Yoshihiko Sakaguchi², Toshiyuki Yamaji¹, Masahiro Nagahama² (¹Dept. Microbiol. Immunol. Fac. Pharm., Juntendo Univ., ²Dept. Microbiol., Fac. Pharm. Sci., Tokushima Bunri Univ.)

【目的】A 型ウエルシュ菌によるガス壊疽は、筋壊死の進行が非常に早く、重篤な感染症である。これまでに、本菌の産生する α 毒素がガス壊疽の発症に関与することが判明している。今回、我々は、FDA 承認薬ライブラリーから、α 毒素の毒性を阻害する化合物を同定したので報告する。

【方法】1) 精製した α 毒素や候補化合物でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を処理し、細胞の生存率を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

2) 精製した α 毒素や候補化合物を C57BL/6J マウスに腹腔内投与し、マウスの生存を観察した。

3) 培養した A 型ウエルシュ菌を大腿筋に投与して作成したガス壊疽モデルマウスに候補物質を腹腔内投与し、その後の生存率や大腿筋の傷害を測定した。

【結果】はじめに、α 毒素の PLC 活性を 50% 以上阻害する化合物を、FDA 承認薬ライブラリーからスクリーニングし、34 種類の化合物を候補化合物として同定した。2 次スクリーニングでは、抗真菌薬である Micafungin も同様の阻害効果を示した。また、Micafungin は α 毒素の致死活性を強く抑制した。一方、Micafungin は本毒素の致死活性を抑制しなかった。さらに、Micafungin はガス壊疽モデルマウスの生存期間を有意に延長し、菌感染による大腿筋の傷害も抑制した。以上の結果より、Micafungin が本菌によるガス壊疽の有望な治療薬シーズとなると期待される。今後は Micafungin の有効性について検討を続け、本症に対する新規治療法の創出を目指したい。

P2-098

細胞外小胞阻害剤が関与する ADP-リボシル化毒素 Cholix 肝細胞致死亢進機構

○八尋 錦之助¹, 尾崎 和矢^{2,3}, 永原 妃葉¹, 川村 朝香¹ (¹京薬大微生物, ²阪大・産研, ³阪大・薬)

Enhanced Hepatocyte Lethality via Cholix Toxin with Extracellular Vesicle Inhibitors Mechanism

○Kinnosuke Yahiro¹, Kazuya Ozaki^{2,3}, Hiyo Nagahara¹, Asaka Kawamura¹ (¹Lab. Microbiol. and Infect. Cont., Kyoto Pharm. Univ., ²SNAKEN, Osaka Univ., ³Grad. Sch. Pharm., Osaka Univ.)

【目的】Cholix は、コレラ菌が産生する ADP リボシル化毒素であり、宿主のタンパク質合成阻害により肝細胞死を誘導する。我々は、細胞外小胞 (EV) 阻害剤である Desipramine (DP) など存在下 Cholix の細胞致死活性が劇的に亢進することを見出した。これら細胞の RNAseq 解析を行い、DP 存在下における細胞致死亢進メカニズムを明らかにすることを目的とした。【方法】Cholix/DP 処理した正常不死化肝細胞からトータル RNA を精製し、RNAseq 解析を行った。結果、コントロールと比較し、Cholix/DP 処理で劇的に増加する遺伝子を同定し、その発現を RT-qPCR によって確認した。種々の阻害薬、標的タンパク質の siRNA 導入処理した細胞を用いて細胞致死変化を評価した。【結果及び考察】RNAseq の結果、Jun 等の JNK 関連遺伝子の増加が Cholix/DP 処理細胞で認められた。JNK 阻害剤存在下や JNK ノックダウンは、DP による Cholix の細胞致死亢進活性を抑制した。EV 制御タンパク質 Rab27a のノックダウンでも Cholix による細胞致死亢進が認められ、こちらも JNK の阻害により細胞死が抑制された。ミトコンドリア依存性アポトーシスに必要な Apaf-1 の発現抑制細胞では、DP/Cholix の細胞致死活性が増加したことから、DP/Cholix の細胞致死活性の増加はミトコンドリア非依存的経路に関与していると考えられた。以上の結果から、DP 単独では JNK 経路に影響せず、Cholix 共存下、JNK を活性化することで細胞死を亢進することが示唆された。

P2-099

Analysis of factors that regulate transcription of serine protease gene in *Aeromonas sobria*

○高橋 栄造¹, 越智 定幸¹, 西村 莉彩¹, 柏木 優希¹, 村尾 涼¹, 小林 秀文², 清家 総史², 山中 浩泰², 岡本 敬³ (¹横浜薬大・薬, ²広島国際大・薬, ³岡山大院・医歯薬)

○Eizo Takahashi¹, Sadayuki Ochi¹, Risa Nishimura¹, Yuuki Kashiwagi¹, Ryo Murao¹, Hidetomo Kobayashi², Soshi Seike², Hiroyasu Yamanaka², Keinosuke Okamoto³ (¹Fac. Pharm. Sci., Yokohama Univ. Pharm., ²Fac. Pharm. Sci., Hiroshima Int. Univ., ³Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.)

Aeromonas species, which are facultative anaerobic bacteria, inhabit in various aquatic environments. *Aeromonas* species cause diarrhea in both adults and children. *A. sobria* secretes two types of extracellular proteases, serine protease (ASP) and metalloprotease (AMP). Recently, we examined the factors interacting with the promoter region of serine protease gene, and identified the protein with molecular weight of 10kDa, using pull down assay. The analysis of this protein suggested that the protein is a heterodimer composed of two kinds of proteins.

In this study, we constructed the deletion mutant of the genes encoding these proteins by homologous recombination, from *A. sobria* 288 strain. The mutant whose both genes were deleted showed significant decrease of production of ASP, although ASP production was not reduced in the mutant deleting either gene alone. Additionally, this double gene deletion mutant showed lower production of AMP. Subsequently, we examined the transcriptional level of *asp* in these mutants by quantitative RT-PCR. Double gene deletion mutant had significantly reduced transcription of *asp* gene as well as the reduction of production of ASP.

P2-100/FL4-06

Characterization of human antibody against diphtheria toxin

○幸田 知子¹, 富田 媛音¹, 妹尾 充敏², 岩城 正昭² (¹大阪公立大学・獣医・感染症, ²国立感染症研究所・細菌第二部)

○Tomoko Kohda¹, Himena Tomita¹, Mitsutoshi Senoh², Masaaki Iwaki² (¹Grad. Sch. Vet. Sci., Osaka Metropolitan Univ., ²Dept. Bact. II., National Institute of Infectious Diseases)

Diphtheria caused by diphtheria toxin (DT) is a potentially fatal disease. In all clinical cases due to toxigenic strains, a currently available primary therapeutic option is treatment with diphtheria antitoxin produced by hyper-immunization of horses. The usage of horse therapeutic antibodies is problematic, since it raises ethical issues surrounding the use of animals, and effects such as serum sickness. Therefore, there is a strong motivation to develop neutralizing human monoclonal antibodies (hmAbs) against DT. In this study, we produced four recombinant anti-DT hmAbs based on the information of variable regions of hmAbs from previously reported clones with DT neutralization activity in a mammalian cell expression system. The properties of hmAb were analyzed by ELISA and cell-based DT neutralizing assay. Three of four hmAbs with specific binding to DT in ELISA exhibited high DT neutralization activity, while one of the four which had showed the highest DT neutralization as reported in a previous report exhibited little DT neutralization activity. The result suggests that the differences of the parameters for hmAb production in cell line with the transfection reagents occurred. To obtain hmAb has higher DT neutralization activity, modification of the production protocol is now in progress.

P2-101/FL4-07

ヒト特異的な作用特性を示す Intermedilysin に対する口腔由来細胞の応答反応

○田中 愛佳¹, 長宗 秀明², 友安 俊文^{1,2}, 藤本 あい³, 田端 厚之^{1,2} (¹徳島大・生物資源産業・生物資源産業, ²徳島大・院社会産業理工学・生物資源産業学, ³サンスター (株) 研究開発統括部)

Cellular response of human gingival carcinoma cell against human-specific cytolysin, Intermedilysin

○Aika Tanaka¹, Hideaki Nagamune², Toshifumi Tomoyasu^{1,2}, Ai Fujimoto³, Atsushi Tabata^{1,2} (¹Dept. Biosci. & Bioindust., Fac. Biosci. & Bioindust., Tokushima Univ., ²Div. Biosci. & Bioindust., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ., ³Sunstar Inc., R&D)

【目的】*Streptococcus intermedius* (SI) はヒト口腔内の常在菌であり、一般的に日和見病原菌と認識されている。しかし SI は、難治性歯周病だけでなく、脳や肝臓などの深部臓器における重篤な膿瘍形成への関与も報告されている。この SI が産生する代表的な病原因子として、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) である Intermedilysin (ILY) が挙げられる。ILY は、ヒト型 CD59 を受容体としてヒト細胞に特異的な作用特性を示すことから、SI の常在部位における ILY の作用は SI の潜在的な病原性を検討する上で重要である。そこで本研究では、SI の常在部位であるヒト口腔由来の培養細胞株における、ILY の作用依存的な応答反応について検討した。

【方法】本研究の被検細胞として、ヒト歯肉由来扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 を選択した。検討に用いる ILY は、大腸菌発現系を用いて N 末 His タグ化組換え体 (His-ILY) として調製した。His-ILY の作用に伴う細胞傷害性は CCK-8 アッセイにより評価し、His-ILY 作用細胞における遺伝子発現変動は RT-qPCR による相対定量で評価した。

【結果・考察】被検細胞である Ca9-22 は、His-ILY の濃度依存的に細胞傷害を示した。RT-qPCR による遺伝子発現変動の相対定量解析の結果より、準細胞致死濃度の His-ILY を作用させた Ca9-22 では、ケモカインや炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現亢進が確認された。以上の結果より、SI が産生する ILY は、明確な細胞傷害を示さない準細胞致死濃度であっても、その作用に伴って口腔内細胞におけるサイトカイン発現誘導を惹起し、局所的な炎症応答を誘導していると考えられた。この応答反応の詳細を明らかにするために、現在さらに検討を進めている。

P2-102

Exploring the Mechanism of Vacuole Induction by *Escherichia coli*-derived Outer Membrane Vesicles

○Teresia Kimeu, 村瀬 一典, 野澤 敦子, 野澤 孝志, 中川 一路 (京大・医・微生物感染症)

○Teresia Kimeu, Kazunori Murase, Atsuko Nozawa, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Outer membrane vesicles (OMVs) are spherical blebs, size 20 to 300 nm, naturally released by Gram-negative bacteria. OMVs enclose various bacteria-derived molecules, and OMVs themselves or their cargo induce diverse biological effects in host cells. We previously reported that *Escherichia coli*-derived OMVs (eOMVs) induce cytoplasmic vacuole formation in HeLa cells, with the vacuoles appearing at 8 hours post-treatment (hpt) and gradually enlarging up to 24 hpt. Recently, another report demonstrated that eOMVs contribute to inhibit the autophagic flux by impairing autophagosome-lysosome fusion. However, the precise mechanism of vacuole induction and enlargement by eOMVs remains unclear. Therefore, this study aims to explore the molecular mechanism behind eOMVs-induced vacuole formation and enlargement. Immunostaining using the early endosome marker EEA1 and the lysosome marker LAMP1 showed localization of these markers to eOMVs-induced vacuoles. Furthermore, TGN46, a trans-Golgi network (TGN) marker, also localized to the vacuoles, and dispersion of TGN without effect on cis-Golgi was observed in eOMV-treated cells. These results suggest that eOMVs may cause vacuole formation by interfering with the endosomal trafficking pathway. Also, proteome analysis of eOMVs and transfection assay showed that eOMVs-derived outer membrane protein might be involved in the vacuole formation.

P2-103/FL4-08

Engineered Chimeric Botulinum Neurotoxin for Targeted Antibody Delivery to Treat Botulism

○宮下 慎一郎¹, Jie Zhang^{2,3,4}, 金澤 あかね¹, 大野 倫太郎¹, 小島 英恵¹, Min Dong^{2,3,4}, 相根 義昌¹ (¹東京農大・生物産業・食香粧, ²Dept. Urol., Boston Child. Hosp., ³Dept. Surg., Harvard Med. Sch., ⁴Dept. Microbiol., Harvard Med. Sch.)

○Shin-Ichiro Miyashita¹, Jie Zhang^{2,3,4}, Akane Kanazawa¹, Rintaro Ohono¹, Hanae Kojima¹, Min Dong^{2,3,4}, Yoshimasa Sagane¹ (¹Dept. Food Aroma Cosme. Chem., Fac. of Bio-ind., Tokyo NODAI, ²Dept. Urol., Boston Child. Hosp., ³Dept. Surg., Harvard Med. Sch., ⁴Dept. Microbiol., Harvard Med. Sch.)

Botulinum neurotoxin (BoNT) binds to neurons and delivers its catalytic domain to the cytosol. The substrate cleavage induces flaccid muscle paralysis, also known as botulism. Antitoxin antibodies cannot neutralize BoNTs once they enter neurons. We have previously developed an antibody delivery platform comprising inactivated BoNTs and BoNT/X, a BoNT-like toxin, to neutralize BoNTs in the neuronal cytosol. In this study, ciBoNT/EnA and ciBoNT/PmA were created as novel inactivated chimeric toxins composed of BoNT/A and the domains of a BoNT-like toxin, BoNT/En or PMP1. Administration of ciBoNT/EnA or ciBoNT/PmA that linked with a heavy-chain variable-domain antibody (VHH) against BoNT/A shortened the duration of BoNT/A-induced muscle paralysis, although toxicity was observed in mouse bioassays. ciBoNT/XA showed high efficacy in delivering VHH to mice, rats, and guinea pigs. Notably, one molecule of ciBoNT/XA successfully delivered two VHHs to neurons. These findings suggest intracellular antibody delivery using ciBoNT/XA as a promising therapeutic approach against botulism. Further investigations are warranted to determine the potential toxicity associated with BoNTs and BoNT-like toxins to enhance therapeutic strategies.

P2-105

Bordetella 属細菌が産生するタンパク質 BteA と BopN の相互作用領域の解析

○小河 俊伸, 桑江 朝臣, 阿部 章夫 (北里大・院・感染制御科学府)

Interaction between BteA and BopN produced by *Bordetella*

○Toshinobu Ogawa, Asaomi Kuwae, Akio Abe (Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ.)

Bordetella 属細菌は III 型分泌装置と呼ばれる菌体外に突出したニードル複合体を介して病原因子を宿主細胞へと注入する。これらの病原因子はエフェクターと呼ばれ、宿主の生理機能を攪乱することで感染成立において重要な役割を担っている。*Bordetella* 属細菌の産生するエフェクターである BteA は菌体内で BopN と相互作用し複合体を形成して宿主細胞内に移行し細胞膜破壊を起こすと考えられるが、BteA と BopN の相互作用領域や相互作用の意義は不明である。そこで本研究では、BteA の部分欠失変異体及び点変異体を作製し、BteA の BopN との相互作用領域の解析を行った。*Bordetella* 属細菌の一種である気管支敗血症菌に BteA 部分欠失変異体産生用プラスミドを導入し、それらの菌株をラット肺上皮由来の L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べた。その結果、N 末端側 448 アミノ酸を持つ BteA と 249 から 448 番目のアミノ酸領域を欠失させた BteA は BopN 依存的に宿主細胞内へ移行したが、N 末端側 248 アミノ酸を持つ BteA では BopN 依存的な移行は見られなかった。更に BteA 点変異体産生用プラスミドを導入した菌株を L2 細胞に感染させ、BteA の移行量を調べることにより詳細な解析を行った。その結果、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンを変化させた BteA は BopN 存在下であっても宿主細胞内へ移行しなかった。以上の結果から、BteA の 249 から 448 番目のアミノ酸領域と 449 から 658 番目のアミノ酸領域において BopN による宿主細胞移行制御を受けることが示唆された。また、263 番目のアスパラギン酸と 340 番目のフェニルアラニンが BopN の制御を受けるのに重要なアミノ酸である事が示唆された。

P2-106

抗菌薬は大腸菌から細胞外小胞の放出を促してマクロファージを介した炎症を惹起する

○田中 美加¹, 篠原 明莉², 堀口 安彦³, 岡 真優子^{1,2} (¹京都府大院・生命環境・食環境安全性, ²京都府大・農学食料・食環境安全性, ³大阪大・微研・分子細菌)

Antibiotics-induce extracellular vesicles from *E. coli* stimulate macrophages to induce inflammation

○Mika Tanaka¹, Akari Shinohara², Yasuhiko Horiguchi³, Mayuko Oka^{1,2} (¹Food Hyg. and Environ. Health, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²Food Hyg. and Environ. Health, Fac. of Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., ³Dept. Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ.)

グラム陰性細菌の細胞外小胞 (OMV) は、外膜が菌体の外側に芽生して形成される小さな膜小胞で、細胞外小胞に内包されるタンパク質や核酸が炎症反応などの生体反応に関与する。これまでに大腸菌由来 OMV で活性化されたマクロファージ (Mφ) が、OMV 中の CirA タンパク質を介して naive Mφ に炎症因子の発現を誘導することを報告した。一方、大腸菌由来 OMV が最小発育阻止濃度 (MIC) 未満のアムピシリン (Amp) によって過剰に放出されるが、この現象は高麗人参の抽出成分 (RGE) によって抑制されることを見いだした。そこで、本研究では Amp の刺激によって大腸菌から放出される OMV の性状と RGE の作用機序を解析した。大腸菌 K12 株を 6.25 µg/mL (1/16 MIC) Amp 存在下あるいは非存在下で 12 時間培養し、超遠心法で Amp-OMV と none-OMV を精製した。OMV で 24 時間処理したマウス Mφ (RAW264.7) の inducible nitric oxide synthase (iNos) および cyclooxygenase-2 (Cox-2) の mRNA 発現は none-OMV 処理群で未処理群に比べて 1.8 倍および 1.3 倍、Amp-OMV 処理群で 260 倍および 650 倍増大した。一方、RGE 存在下で培養した時の Amp-OMV は RGE 非存在下の Amp-OMV に比べてこれら mRNA 発現を強く抑制した。また、K12 株由来 cirA 欠損株 (Δ cirA) の Amp-OMV cir に感作された Mφ での炎症因子の mRNA 発現は、野生株の Amp-OMV wt と比較して 30 分の 1 に抑制された。以上の結果から、抗菌薬による大腸菌由来 OMV の炎症作用には CirA が関与しており、この炎症は高麗人参の抽出成分によって抑制されることが示唆された。

P2-107

志賀毒素産生性大腸菌毒素 SubAB の宿主因子を介した病原性発現機構

○津々木 博康¹, 張 田力², 八尋 錦之助³, 赤池 孝章⁴, 澤 智裕¹ (¹熊大・院生命科学・微生物, ²秋田大・感染統括制御・疫学・分子病態センター, ³京都薬科大・微生物・感染制御学, ⁴東北大・院医・環境医学)

Host factor-mediated pathogenicity mechanism of SubAB from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

○Hiroyasu Tsutsuki¹, Tianli Zhang², Kinnoyuke Yahiro³, Takaaki Akaike⁴, Tomohiro Sawa¹ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ²Cent. Integr. Cont. Epidemiol. Mol. Pathophysiol. Infect. Dis., Akita Univ., ³Dept. Microbiol. Infect. Cont. Sci., Kyoto Pharm. Univ., ⁴Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

【目的】志賀毒素産生性大腸菌から同定された毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB) は、宿主の小胞体 (ER) タンパク質 BiP を切断し ER ストレスを誘導する。我々は SubAB の ER ストレスを介した細胞毒性や自然免疫抑制作用について解析し、その知見を報告してきた。これまで細菌毒素が宿主因子を介して病原性を発現するという報告があるが、SubAB については不明であった。本研究では、宿主のタンパク質や酸化窒素 (NO) を介したレドックス調節が SubAB の病原性にどのような影響を及ぼすか調べることを目的とした。

【方法】HeLa 細胞に NO ドナー存在下で SubAB を処理し、SubAB の病原性として BiP の切断を評価した。SubAB の病原性に関わる宿主タンパク質、特に NO の標的候補を探索し、ノックアウト (KO) 細胞や組換え酵素を作製した。

【結果】NO は SubAB の病原性を抑制した。NO の標的として宿主タンパク質 Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) を見出した。GSTP1 の KO 細胞や組換え酵素を用いた結果、野生型細胞では NO が SubAB の病原性を阻害したが、GSTP1 の KO 細胞では NO による阻害が消失した。また NO は野生型 GSTP1 組換え酵素の活性を阻害したが、48 番目のシステインをセリンに置換した酵素では NO による阻害が減弱した。

【結論】SubAB は GSTP1 を介して病原性を発現した。このメカニズムとして、NO が GSTP1 の活性を阻害することで SubAB の病原性を阻害することが示唆された。さらに、GSTP1 の 48 番目のシステインが NO の主な標的であることが分かった。現在、SubAB の病原性発現に関わる宿主因子やレドックス調節について、さらに詳細な解析を進めている。

P2-109/FL4-11

The role of PLC and extracellular Ca²⁺ influx in the inflammation induced by *Pg* infection

○中山 真彰^{1,2}, 内藤 真理子³, 土佐 郁恵¹, 大原 直也^{1,2,4} (¹岡山大・院医歯薬・口腔微生物, ²岡山大・歯先端研, ³長崎大・院医歯薬・口腔病原微生物, ⁴岡山大・院医歯薬・腸健康科学研セ)

○Masaaki Nakayama^{1,2}, Mariko Naito³, Ikue Tosa¹, Naoya Ohara^{1,2,4} (¹Dept. Oral Microbiol., Okayama Univ. Fac. Med. Dent. Pharm. Sci., ²ARCOCS, Okayama Univ. Dent. Sch., ³Dept. Microbiol. Oral Infect., Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci., ⁴Res. Ctr. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) is a representative periodontal pathogen. In periodontitis, COX-2 expression and PGE2 production are observed. Previous studies have shown that in monocyte-derived cells, *Pg* produced gingipains induce extracellular Ca²⁺ influx, leading to COX-2 expression and PGE2 production. In this study, we explored the role of phospholipase C (PLC) in gingipain-induced increases in intracellular calcium levels in the THP-1 monocyte cell line, focusing on its involvement in COX-2 expression and PGE2 production. Using the PLC inhibitor U73122, we evaluated its effect on COX-2 expression, PGE2 production, and upstream signaling pathways, ERK/AP-1 and IKK/NF-κB. Our results showed that U73122 treatment reduced COX-2 expression and PGE2 production in *Pg*-infected THP-1 cells in a concentration-dependent manner. Activation of ERK and IKK was also suppressed by U73122. Additionally, c-Fos and c-Jun induction and phosphorylation regulated by ERK were inhibited. These findings demonstrate that PLC activation plays a key role in gingipain-induced COX-2 expression and PGE2 production, likely by mediating extracellular Ca²⁺ influx into the cell.

P2-110

Production and functional characteristics of membrane vesicles in *Streptococcus mitis*

○松本 愛理¹, 大貝 悠一¹, 住友 倫子², 田端 厚之³, 中田 匡宣¹ (¹鹿大・院医歯・口腔微生物, ²徳大・院医歯薬・口腔微生物, ³徳大・院社会産業理工・生物資源産業)

○Airi Matsumoto¹, Yuichi Oogai¹, Tomoko Sumitomo², Atsushi Tabata³, Masanobu Nakata¹ (¹Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Med. & Dent. Sci., Kagoshima Univ., ²Dept. Oral Microbiol., Grad. Sch. Biomed Sci., Tokushima Univ., ³Dept. Bioeng. Div. Biosci. & Bioind., Grad. Sch. Tech., Indust. & Soc. Sci., Tokushima Univ.)

Objective: *Streptococcus mitis* is a commensal bacterium in the human pharynx and oral cavity that can cause various infectious complications, including bacteremia and infective endocarditis. However, details of its pathogenicity and pathogenesis remain unclear. This study aimed to investigate whether *S. mitis* produces membrane vesicles (MVs) and to elucidate the functional characteristics of the MVs. **Method:** Firstly, MVs were isolated by density gradient centrifugation and characterized by LC-MS/MS analysis. Next, the effects of MVs on host cell morphology, cytokine production, and phagocytic activity were analyzed. Finally, we investigated the effects of MVs on the growth and biofilm formation of bacteria associated with periodontal diseases and dental caries.

Result: We confirmed MV production from *S. mitis* strains. The MVs were found to bind to and invade A549 cells, stimulate the production of some cytokines in THP-1 cells, and inhibit phagocytic activity. Enhanced IL-8 production was also observed in HL-60 cells. MVs from *S. pneumoniae* TIGR4 and *S. mitis* Nm-65 strains inhibited biofilm formation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Conclusion: This study demonstrated that *S. mitis* produces MVs, which inhibit Aa biofilm formation and induce inflammatory responses in host cells. These findings suggest that MVs are an important factor in the pathogenicity of *S. mitis*.

P2-111/FL4-12

黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制による紅参エキスの抗炎症作用

○守口 凜子¹, 篠原 明莉², Dendi Krisna Nugraha³, 中川 一路⁴, 堀口 安彦³, 岡 真優子^{1,2} (¹京都府大院・生命環境・食環境安全性, ²京都府大・農学食料・食環境安全性, ³大阪大・微研・分子細菌, ⁴京都大院・医・微生物感染症)

Red ginseng extracts have role of inhibition of toxin production by *Staphylococcus aureus*

○Rinko Moriguchi¹, Akari Shinohara², Dendi Krisna Nugraha³, Ichiro Nakagawa⁴, Yasuhiko Horiguchi³, Mayuko Osada-Oka^{1,2} (¹Food Hyg. and Environ. Health, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²Food Hyg. and Environ. Health, Fac. of Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., ³Dept. Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ., ⁴Dept. Microb., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

皮膚や鼻腔に常在する *Staphylococcus aureus* のヘモリジン毒素は、バリア機能の低下した皮膚で炎症を惹起し、アトピー性皮膚炎 (AD) の悪化因子となるため、抗毒素作用をもつ物質は、既存の AD 治療薬とは作用機序の異なる新たな治療に応用できる。これまで AD モデルマウスを用いて、高麗人参を皮ごと蒸して乾燥させた紅参の抽出エキス (RGE) が、痒みや炎症を抑制することを報告した。そこで、*S. aureus* による AD の増悪化に対する RGE の有効性を検討した。RGE (0-1 mg/mL) 存在下で *S. aureus* USA300 株を培養すると、ヘモリジン遺伝子 (*hly* および *hlgB* mRNA) および α-hemolysin タンパク質の発現が RGE の濃度依存的に抑制された。次に、DNP-ascaris 誘発性 AD モデルマウスの耳介患部に塗布した USA300 株の培養上清 (CM) は耳介組織の炎症因子 *Ccl2* mRNA 発現を増大させたが、RGE 存在下での CM はこれら発現を抑制した。また、CM はマウス骨髄由来マクロファージの *Ccl2* mRNA 発現を増大させたが、RGE 存在下での CM はこれらの発現を抑制した。さらに、RGE は、*S. aureus* の二成分制御系 *SaeS/R* および *AgrC/A* 遺伝子の発現を抑制したことから、これらの遺伝子の欠損株 ($\Delta saeS$ および $\Delta agrC$) を作製した。 $\Delta saeS$ 株では、*agrC/A* mRNA 発現は野生株と差がなかったが、*hly* mRNA 発現は野生株と比べて抑制された。 $\Delta agrC$ 株では、*saeS/R* および *hly* の mRNA 発現は野生株と同じであった。また、RGE は $\Delta agrC$ 株の *saeS/R* と *hly* mRNA 発現を抑制した。以上の結果より、RGE は *AgrC/A* 非依存的に *SaeS/R* を不活化し、ヘモリジン産生を阻害することで AD マウスの炎症を抑制したと考える。

P2-112/FL4-13

The role of T3SS-2 effector, SseF, on macrophage cell death induced by Salmonella infection

○大島 里彩, 羽田 健, 伊藤 雅洋, 三木 剛志, 金 倫基 (北里大・薬・微生物)

○Risa Ohshima, Takeshi Haneda, Masahiro Ito, Tsuyoshi Miki, Yun-Gi Kim (Dept. Microbiol. Sch. Pharm. Kitasato Univ.)

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is a common cause of gastroenteritis and is associated with invasive bloodstream infections in immunocompromised individuals. Two type III secretion systems, T3SS-1 and T3SS-2, play crucial roles in *Salmonella* pathogenesis. T3SS-2 functions after *S. Typhimurium* has been taken up by host cells, such as macrophages, and forms and maintains *Salmonella*-containing vacuoles (SCV), allowing the bacteria to survive in those cells. We recently showed that the T3SS-2 effector, SseF, induces non-canonical pyroptosis by escaping the bacteria from the SCV to the cytoplasm. However, the mechanism is unknown. To elucidate the role of SseF in *Salmonella* infection, we tried to monitor the secretion of SseF into the cytoplasm of macrophages using the HiBiT system. The secretion of SseF gradually increased from 8 to 18 hours. The timeframe when macrophages secreted SseF was almost the same as when the *S. Typhimurium* induces cell death. We also investigated the relationship between macrophage cell death and ACBD3 or Rab1A, which are reported to target the protein of SseF. The cytotoxicity of ACBD3- or Rab1A-deficient cells induced by infection with *S. Typhimurium* was comparable to that of RAW cells. These results suggest that ACBD3 and Rab1A were not involved in the induction of cell death by *S. Typhimurium* infection.

P2-113

異なる栄養・環境条件における黄色ブドウ球菌の増殖・バイオフィルム形成及びエンテロトキシン産生性の解析

○胡 祚¹, 小野 久弥¹, 岡田 佳南子¹, 廣瀬 昌平², 胡 東良¹ (¹北里大・獣医・人獣共通感染症, ²国立医薬品食品衛生研究所)

Growth, Biofilm Formation, and Enterotoxin Production of *S. aureus* in Different Conditions

○Zuo Hu¹, Hisaya Ono¹, Kanako Okada¹, Shouhe Hirose², Dong-Liang Hu¹ (¹Kitasato Univ. School. Vet. Med., ²National Institute of Health Sciences)

ブドウ球菌食中毒は広く世界中で発生している。日本においても2023年青森県で製造した弁当による全国29都県で約550名患者を出す広範囲な食中毒事件、2024年に横浜市でうなぎ弁当による160人食中毒(1人死亡)事件が社会に大きな衝撃を与え、社会的なインパクトの大きさを印象付けた。本菌食中毒を予防するために、各食品や環境条件での本菌の増殖及びエンテロトキシン(SE)の産生性を解明し、適切な食品加工・調理及び厳格な温度・衛生管理を行うことが重要である。本研究では、黄色ブドウ球菌 FRI-S6 株を各濃度の NaCl (2.5, 5, 10%) または Glucose (1, 4, 16%) 添加 BHI-YE 培地に接種し、37°C または 25°C で培養し定時的に細菌増殖 (OD550)、バイオフィルム形成を測定した。37°C の培養では 2.5%NaCl と 1% Glucose は細菌増殖に顕著な影響が見られなかったが、5% NaCl は培養後 8 時間で、10% NaCl は 8 時間から 72 時間まで有意に細菌増殖を抑制した。4% Glucose では培養後 48 時間と 72 時間で、16% Glucose では培養後 24 時間から 72 時間において細菌増殖を有意に抑制した。一方、2.5, 5, 10% の NaCl は濃度依存的にバイオフィルム形成を顕著に抑制したが、Glucose 添加が顕著な抑制が見られなかった。また、同程度の細菌増殖条件での SEA の産生を ELISA により測定した。2.5%NaCl が SEA 産生を有意に抑制したが、1% Glucose は SEA 産生に影響がなかった。また、25°C で培養した際に 2.5%NaCl は SEA 産生を有意に抑制したのに対し、1% Glucose では逆に SEA 産生を顕著に増加させた。これらの結果から、異なる条件下で同様な細菌数が検出されても、SE 産生量が食品環境により大きく異なることを明らかにした。

P2-114

Involvement of Btk in *Listeria monocytogenes*-induced inflammasome activation through Lyn-Syk pathway

○山内 肇, 松田 泰幸, 原 英樹 (旭川医大・医・感染症学微生物学)

○Hajime Yamauchi, Yasuyuki Matsuda, Hideki Hara (Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ.)

The food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* causes severe infections in immunocompromised individuals. During infection, host cells recognize bacterial invasion and cellular damage through inflammasomes, protein complexes activating caspase-1, leading to IL-1 β secretion and pyroptotic cell death. Previous studies have demonstrated that listeriolysin O from *L. monocytogenes* promotes inflammasome activation by inducing phosphorylation of the adaptor protein ASC through Lyn-Syk signaling pathway. However, downstream effectors of this pathway remain to be elucidated. Bruton's tyrosine kinase (Btk) is a tyrosine kinase modulated by Syk. In this study, we investigated a contribution of Btk in the inflammasome activation upon *L. monocytogenes* infection. *L. monocytogenes* induced Btk activation, which was reduced by Syk inhibitor. By inhibition of Btk, inflammasome-dependent IL-1 β secretion and cell death were suppressed in macrophages infected with *L. monocytogenes*. To further investigate the role of Btk in inflammasome activation, we prepared bone marrow-derived macrophages from Btk knockout mice. We examined inflammasome activation in these Btk-deficient cells upon *L. monocytogenes* infection to validate our pharmacological findings. Our study suggests that Btk functions as a downstream molecule of Lyn-Syk pathway in *L. monocytogenes*-induced inflammasome activation.

P2-115

反復性膀胱炎由来大腸菌の抗菌薬抵抗性とバイオフィルム形成能について

○瀬野 聖佳¹, 瀬部 真由¹, 光畑 律子², 石井 亜矢乃², 狩山 玲子³, 村上 圭史¹ (¹川福大・医技・臨床栄養, ²岡大・院・医歯薬総合・泌尿器病態, ³岡山学院大・人間生活・食物栄養)

Antibiotic tolerance and biofilm formation of *E. coli* from recurrent urinary tract infection

○Satoka Senoura¹, Mayu Sebe¹, Ritsuko Mitsuhashi², Ayano Ishii², Reiko Kariyama³, Keiji Murakami¹ (¹Dept. Clin Nutr., Fac. Health Sci. Technol., Kawasaki Univ. Med. Welfare., ²Dept. Urol., Okayama Univ. Graduate Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., ³Dept. Food Nutr., Fac. Hum. Life., Okayama Gakuin Univ.)

【目的】反復性膀胱炎は6ヶ月に2回以上、または1年に3回以上の再発がある膀胱炎で、女性に多く、主な起因菌は大腸菌である。しかし、その病原因子については不明な点も多い。本研究では、反復性膀胱炎患者より分離された大腸菌と、非反復性膀胱炎や河川から分離された大腸菌について、抗菌薬抵抗性及びバイオフィルム形成能に着目し解析を行った。【材料と方法】岡山大学病院泌尿器科で分離された、反復性膀胱炎由来19株、非反復性膀胱炎由来8株、河川由来2株、NBRC3972株の計30株を使用した。抗菌薬はセフォキシチンを使用した。微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度(MIC)と最小殺菌濃度(MBC)を測定した。付着菌では、96ウェル平底プレート底部に遠心操作により菌を付着させ、付着菌での最小発育阻止濃度(MIC^{AD})と最小殺菌濃度(MBC^{AD})を測定した。バイオフィルム形成能は、96ウェルU底プレートを使用し、mAUM培地で30°C24時間培養後、クリスタルバイオレット法により定量した。【結果と考察】浮遊菌のMICは、大半が4または8 μ g/mLであった。抗菌薬抵抗性(MBC/MIC)は、全て2以下であった。一方、付着菌のMIC(MIC^{AD})は浮遊菌とほとんど変わらなかったが、抗菌薬抵抗性(MBC^{AD}/MIC^{AD})は、16以上と高い抵抗性を示す株が、反復性膀胱炎由来株は約58%あり、それ以外では0%であった。バイオフィルム形成能は、菌株による差が大きく、由来による差は認められなかった。これらの結果から、抗菌薬抵抗性は、反復性膀胱炎に関与している可能性が示された。また、抗菌薬抵抗性及びバイオフィルム形成能の間には明らかな相関は認められず、これらは異なったメカニズムで制御されていることが示唆された。

P2-116

マイコプラズマの D-アミノ酸ラセマーゼのバリエーション間における機能的保存性についての検討

○山本 武司¹, 土谷 祐一², 奥野 未来¹, 山本 奈々絵², 今井 有未¹, 内田 まやこ², 小椋 義俊¹ (1久留米大・医・感染医学, 2九大病院・薬学部)

Functional conservation of D-amino acid racemase variants in *Mycoplasma hominis*

○Takeshi Yamamoto¹, Yuichi Tsuchiya², Miki Okuno¹, Nanae Yamamoto², Yumi Imai¹, Mayako Uchida², Yoshitoshi Ogura¹ (1Dept. Infect. Med., Sch. Med., Kurume Univ., 2Dept. Pharmacy, Kyushu Univ. Hosp.)

Mycoplasma hominis は腔常在性のマイコプラズマであるが、産科領域における術後感染症や早産との関連が指摘されており、何らかの病原因子が感染の成立において重要な役割を果たしていることが予想される。最近、我々は本菌が D-アミノ酸ラセマーゼ依存性の D-アルギニンの産生を介して腔常在性のラクトバシラスの増殖を抑制し、腔内に効率的に定着する性質を持つ可能性があることを見出した。この D-アミノ酸ラセマーゼにはデータベース上、12 種類のバリエーションが存在するが、仮に同ラセマーゼが感染において重要な因子であった場合、すべてのバリエーションにおいて D-アルギニンの生成に関与するという性質が保存されていると推測される。そこで本研究では、*M. hominis* が持つ D-アミノ酸ラセマーゼのバリエーション間の機能的保存性を評価するため、同ラセマーゼを持たない *M. pneumoniae* に各バリエーションを異所性発現させ、D-アミノ酸生成活性の測定を行った。その結果、各バリエーションはいずれも D-アミノ酸ラセマーゼとしての活性を有しており、生成される D-アミノ酸の範囲に大きな違いは見られなかった。D-アミノ酸は細胞壁成分として細菌に普遍的に存在するが、細胞壁を持たないマイコプラズマにおける役割については不明な点が多い。しかしながら、*M. hominis* の D-アミノ酸ラセマーゼに機能的な保存性が認められたことから、同ラセマーゼあるいは同ラセマーゼ依存的に生成される D-アルギニンは本菌の生存環境において重要な役割を果たしている可能性が高いことが推測された。

P2-117

胃炎・胃癌患者より分離された硝酸塩還元菌と *H. pylori* の共培養による細胞周期とサイトカイン産生への影響

○桑木 星里香¹, 小松原 万里奈¹, 後藤 和義¹, 内山 淳平², 渡辺 朱理³, 横田 憲治¹ (1岡山大学・保健, 2岡山大学・医歯薬・病原細菌, 3徳島大学・医歯薬・口腔機能管理)

Effects of co-culture of nitrate-reducing bacteria from *H. pylori* associated gastritis and gastric

○Serika Kuwagi¹, Marina Komatsubara¹, Kazuyoshi Gotoh¹, Jumpei Uchiyama², Akari Watanabe³, Kenji Yokota¹ (1Health Science, Okayama Univ., 2Dept. Path. Bacteriol., Grad. Sch. Med. Dent. Pham. Okayama Univ., 3Oral Health Care and Rehabilitation, Inst. Biomed. Sciences, Tokushima Univ.)

【はじめに】前年度までに、胃炎患者の胃粘膜委縮の進行に伴い胃内の硝酸塩還元菌の検出率が高まることと胃癌患者由来の硝酸塩還元菌株の硝酸塩還元能が高いことを報告した。本研究の目的は、胃炎・胃癌患者由来の硝酸塩還元菌が *H. pylori* との共培養下で、細胞周期とサイトカイン産生に与える影響を比較することである。【実験方法】ピロリ菌感染胃炎と診断された患者より、上部消化管内視鏡時にピロリ菌の培養目的で前庭部大弯、胃体部大弯より粘膜生検を行った。うち、19 検体から検出された硝酸塩還元菌 26 菌株について細胞周期とサイトカイン産生を調べた。26 菌株を増殖の早い菌と遅い菌に分けて比較・検討した。細胞周期の測定は、菌を 24 時間培養した培養上清で AGS 細胞を 24 時間刺激し、回収した細胞を固定した。Cell Cycle Assay Solution Deep Red のプロトコルに沿って細胞を染色し、フローサイトメーターで解析を行った。サイトカイン産生量の測定は、生理食塩水に菌株のコロニーを OD₆₀₀=0.5 となるように懸濁し、THP 細胞を菌液で 6 時間刺激した後、培養上清を回収し、ELISA 法で IL-8 と TNF- α の産生量を測定した。【結果】現在、解析の途中であり、14/26 菌株の細胞周期の解析を行なった。胃癌由来株の方が細胞周期が進行している傾向が認められた。また、増殖の早い菌と遅い菌では、増殖の遅い菌の方が細胞周期が進行している傾向が認められた。サイトカインは測定中である。【考察】昨年の研究より、胃癌由来株の硝酸塩還元能が高いことを報告しており、今回は胃癌由来株の細胞周期が進行していることから、ピロリ菌感染胃癌には硝酸塩還元能の関連が考えられる。今後さらに検討していきたい。

P2-118

家禽チフス菌の *ratA* は鶏の致死的全身感染に寄与する

○相川 知宏, 岡村 雅史 (帯広畜産大・獣医学研究部門・獣医微生物)

Salmonella Gallinarum ratA is responsible for a fatal systemic infection in chickens

○Chihiro Aikawa, Masashi Okamura (Lab. Vet. Microbiol., Div. Vet. Sci., Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.)

Salmonella enterica serovar Gallinarum (SG) は、鶏の致死的全身性感染症である家禽チフスの原因菌であり、世界各国でしばしば甚大な経済被害を引き起こす。本症発症に関連する SG の病原性を理解することは、ワクチン等の効果的な感染制御策を講ずる上で重要だが、鶏生体内での SG の感染動態についてはほとんど分かっていない。本研究では、先行研究において鶏生体内で強く発現する SG の抗原遺伝子の 1 つとして同定した *ratA* に着目し、本遺伝子欠損株の鶏接種試験から SG の病原性への寄与を解析した。野生型接種鶏群では、接種 3 日後から嗜眠や食欲低下などの臨床症状が観察され、接種 7 日までに全羽死亡した。これに対して、*ratA* 欠損株接種群は、全個体が何ら臨床症状を呈さず実験期間終了まで生存した。接種 5 日後の盲腸内容からの回収菌数は *ratA* 欠損変異株群で野生型群より顕著に減少した。病理学的解析より、野生型は鶏腸管回盲部の粘膜固有層への侵入が認められた一方で、*ratA* 欠損株の粘膜固有層への侵入は認められず、腸管上皮表層に留まっていた。*ratA* 欠損変異株群では、血液、及び肝臓と脾臓の両臓器から菌が全く回収されなかった。以上より、SG は腸管粘膜固有層への侵入後、血行性に全身に伝播することで鶏の致死的全身感染に強く寄与しており、*ratA* は感染早期の腸管上皮から粘膜固有層への侵入に重要な役割を担っていることが明らかになった。

P2-119

嫌気性細菌 *Fusobacterium nucleatum* が哺乳類細胞に及ぼす影響

○中村 彰宏¹, 堀内 大¹, 市川 朝永¹, 吉田 明弘², 村上 孝¹ (1埼玉医大・医・微生物, 2松本歯科大・歯・微生物)

Effect of *Fusobacterium nucleatum* on mouse mammary epithelial cells

○Akihiro Nakamura¹, Yutaka Horiuchi¹, Tomonaga Ichikawa¹, Akihiro Yoshida², Takashi Murakami¹ (1Dept. Microbiol., Sch. Med., Saitama Medical Univ., 2Dept. Microbiol., Matsumoto Dental Univ.)

臨床病態における細菌叢のメタゲノム解析が進み、細菌叢と疾患の関連が指摘されている。なかでも大腸がん患者のがん組織と糞便から *F. nucleatum* (Fn) が高頻度に検出されている。また大腸がんにおいてはその進行度と検出される Fn 由来 DNA 量が相関することから、大腸がんの進展因子としての役割が示唆されている。その後、大腸がん以外の様々ながん組織から正常組織よりも多くの Fn 由来 DNA が検出されることが報告されているが、がん進展と Fn の因果関係は明らかにされていない。そこで我々は細胞がん化促進と Fn の因果関係を明らかにすることを目指した。まず *in vitro* で Fn と哺乳類細胞株を共培養し、細胞側にどのような影響が生じるかについて形態変化と遺伝子発現変化から解析をはじめた。哺乳類細胞株として NMuMG マウス乳腺上皮細胞を用いた。その結果、Fn は NMuMG 細胞に取り込まれ、細菌を取り込んだ細胞は上皮間葉転換 (EMT) 化が進み細胞形質を大きく変化させていることが示された。Fn を取り込んだ細胞では EMT 化を含むがん関連遺伝子の発現変化も認められ、また NF- κ B 経路に関わる遺伝子群や IL-6 を代表とする炎症性サイトカインの上昇も観察された。これまで Fn による細胞への増殖刺激は細菌側の膜表面タンパク質 FadA と細胞側接着タンパク質 E-cadherin の結合による Wnt/ β -カテンin・シグナル伝達経路の活性化によるものと考えられてきた。今回の我々の結果は Fn の細胞膜表面分子への結合だけではなく、取り込まれた細菌を介した炎症性シグナルの活性化が細胞の形質変化に寄与することが考えられた。

P2-120

肺炎球菌ニューモリシンによる自然免疫活性化メカニズムの解析

○土門久哲^{1,2}, 平山 悟¹, 寺尾 豊^{1,2} (¹新潟大・院医歯・微生物, ²新潟大・院医歯・高口研セ)

Analysis of innate immune activation triggered by pneumococcal pneumolysin

○Hisanori Doman^{1,2}, Satoru Hirayama¹, Yutaka Terao^{1,2} (¹Div. Microbiol. Infect. Dis., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci., ²Cent. for Adv. Oral Sci., Niigata Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Sci.)

【目的】肺炎球菌は膜孔形成毒素ニューモリシンを産生し、宿主細胞を傷害して肺炎を重症化させる。細胞傷害性を示さない低濃度のニューモリシンは、Toll-like receptor 4 (TLR4)を活性化すると報告があるが、統一見解は得られていない。本研究では、ニューモリシンによる自然免疫活性化メカニズムを解析した。

【方法】ヒト TLR4 を強制発現する HEK293 細胞 (HEK-TLR4) 培養系に、組換えニューモリシンを添加した。続いて、転写因子 NF- κ B の活性化に伴い分泌されるアルカリフォスファターゼ (SEAP) の活性を測定した。次に、HEK293 細胞親株、HEK-TLR4、HEK-TLR9 または HEK-NOD2 培養系に、組換えニューモリシンと共に各種自然免疫リガンド [Poly (I:C) (TLR3), LPS (TLR4), ODN2006 (TLR9), C14-Tri-LAN-Gly (NOD1), またはムラミルジペプチド (NOD2)] を添加培養し、SEAP 活性を測定した。さらに、アミノ酸置換により膜孔形成能を低下させた非溶血性組換えニューモリシンを作製し、ムラミルジペプチドとともに HEK-NOD2 に添加して SEAP 活性を測定した。

【結果】組換えニューモリシンの単独添加群は、HEK-TLR4 の SEAP 活性を示さなかった。各種自然免疫リガンドを単独添加した HEK293 細胞と比較して、C14-Tri-LAN-Gly またはムラミルジペプチドと組換えニューモリシンを混合添加した群でのみ、SEAP 活性が有意に高かった。一方、非溶血性組換えニューモリシンをムラミルジペプチドと共に HEK-NOD2 へ添加しても、ムラミルジペプチド単独添加群と比較し、SEAP 活性に有意な変化は認められなかった。

【考察】ニューモリシンは膜孔形成を介し、細胞質受容体 NOD1 および NOD2 シグナルを増幅させることが明らかとなった。

P2-121/FL4-14

Acinetobacter LPS aggravates infection severity through gasdermin D-mediated cell membrane rupture

○松田 泰幸¹, 山内 肇¹, 鴨志田 剛², 白石 宗³, 横田 伸一³, 原 英樹¹ (¹旭川医大・医・感染症, ²明葉大・微生物感染制御, ³札幌医大・医・微生物)

○Yasuyuki Matsuda¹, Hajime Yamauchi¹, Go Kamoshida², Tsukasa Shiraishi³, Shin-ichi Yokota³, Hideki Hara¹ (¹Dept. Infect. Dis., Div. Microbiol. Immunochem., Asahikawa Med. Univ., ²Dept. Infect. Cont. Sci., Meiji Pharm. Univ., ³Dept. Microbiol., Sch. Med., Sapporo Med. Univ.)

The silent pandemic of drug-resistant bacteria continues to spread worldwide, with the WHO designating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRA) infections as an "urgent" global health concern. MDRA infections are primarily associated with pneumonia, septicemia, and meningitis. While innate immune responses play a key role in the pathogenesis of MDRA infections, the mechanisms by which MDRA triggers inflammatory responses remain poorly understood. In this study, we identified lipopolysaccharide (LPS) as a critical factor in inflammasome activation induced by *Acinetobacter* infection. After recognition of intracellular LPS by caspase-11, activated caspase-11 initiated gasdermin D-mediated cell membrane rupture, leading to the release of pro-inflammatory cytokines including IL-1 β and IL-18. Interestingly, *Gsdmd*^{-/-} mice, but not mice deficient in IL-1 β or IL-18, exhibited reduced bacterial burdens in organs following MDRA infection. In addition, treatment with a gasdermin D inhibitor significantly decreased mortality of MDRA-infected mice. Furthermore, *Gsdmd*^{-/-} mice showed less hypercoagulability than wild-type mice in MDRA infection. Collectively, these findings reveal that during MDRA infection, LPS activates caspase-11, driving gasdermin D-dependent cell membrane rupture, which in turn facilitates hypercoagulability and exacerbates disease severity.

P2-122/FL4-15

Genetic diversity of paired receptors and their bacterial ligands suggest host-bacteria co-evolution

○長谷川 玄¹, 平安 恒幸¹, 李 一凡¹, 荒瀬 尚^{2,3,4}, 山口 雅也^{4,5,6,7}, 川端 重忠^{4,7}, 華山 力成¹ (¹金沢大・先進, ²阪大・微研・免疫, ³阪大・免フロ・免疫, ⁴阪大・CiDER, ⁵阪大・院歯・バイオインフォ, ⁶阪大・微研・バイオインフォ, ⁷阪大・院歯・微生物)

○Gen Hasegawa¹, Kouyuki Hirayasu¹, Yifan Li¹, Hisashi Arase^{2,3,4}, Masaya Yamaguchi^{4,5,6,7}, Shigetada Kawabata^{4,7}, Rikinari Hanayama¹ (¹Adv. Prev. Med. Sci. Res. Cen., Kanazawa Univ., ²Dept. Immunochem., RIMD, Osaka Univ., ³Lab. Immunochem., IFReC, Osaka Univ., ⁴CiDER, Osaka Univ., ⁵Bioinform. Res. Unit, Osaka Univ. Grad. Sch. Dent., ⁶Bioinform. Cent., RIMD, Osaka Univ., ⁷Dept. Microbiol., Osaka Univ. Grad. Sch. Dent.)

Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors (LILRs) are paired receptors expressed primarily in immune cells, and transduce activating or inhibitory signals, thereby regulating cellular activity by recognizing diverse ligands. Notably, inhibitory LILRB3 and activating LILRA6 show highly homologous extracellular domains, and share numerous allelic variants. Although the genetic diversity in *LILRB3* and *LILRA6* implies the presence of strong selective pressure, the specific ligands and functional mechanisms underlying such natural selection remain elusive. Through comprehensive screening, Immunoprecipitation and mass spectrometry analyses successfully discovered that certain pathogenic bacteria are specifically recognized by LILRB3 and LILRA6 in an allele specific manner, suggesting that distinct allelic variations influence pathogen recognition. We successfully identified a bacterial surface protein as the functional ligand. Moreover, we observed a significant association between susceptibility to bacterial infection and genetic polymorphisms in *LILRB3* and *LILRA6*. In addition, the bacterial ligands also exhibited genetic diversity, enabling the regulation of their expression levels and modulating biofilm formation. These findings suggest an evolutionary interplay between humans and pathogens mediated by LILRB3 and LILRA6, which drive the generation of genetic diversity in both species.

P2-123

Alendronate augments lipid A-induced interferon beta release via upregulation of RIG-I expression

○玉井 利代子, 清浦 有祐 (奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

○Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura (Dept. Oral Med. Sci., Sch. Dent., Ohu Univ.)

Purpose: Alendronate (ALN) is an anti-bone-resorptive drug that has inflammatory side effects. However, prior use of ALN significantly reduced odds of SARS-CoV-2 testing and COVID-19 diagnosis. The present study examined whether ALN augmented TLR4 ligand-induced release of interferon- β (IFN- β) using mouse macrophage-like J774.1 cells.

Method: J774.1 cells were pretreated with or without ALN, and then incubated with or without lipid A. For inhibition assays, the cells were pretreated with the indicated concentrations of inhibitors for 1 h prior to the addition of ALN. Level of secreted mouse IFN- β in culture supernatants was measured by ELISA. Expression of RIG-I, DOK3, Nur77, a receptor of LPS, interferon regulatory factor (IRF)-5, Histone H3 and β -actin was analyzed by Western blot analysis.

Results: Pretreatment of J774.1 cells with ALN significantly augmented lipid A-induced IFN- β release. ALN also upregulated RIG-I expression and the translocation of IRF-5 to the nuclei in J774.1 cells. Furthermore, pretreatment with the RIG-I inhibitor RIG012 inhibited ALN-augmented IFN- β release by lipid A-treated J774.1 cells.

Discussion: These findings collectively suggest that ALN might augment TLR4 ligand-induced IFN- β release via upregulation of RIG-I expression in J774.1 cells.

P2-124

***Clostridioides difficile* enhances proteolysis and apoptosis under hypoxia**

○日向野 紗希, 岡野 徳壽, 鈴木 敏彦 (科学大・歯・細菌)

○Saki Higano, Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki (Dept. Bact., Sch. Dentistry., Science Tokyo)

Clostridioides difficile (CD)はヒト腸内細菌叢に生息する常在菌であるが、抗菌薬投与により細菌叢の不和共生が引き起こされると薬剤抵抗性を持つ本菌が増殖し、発熱や下痢症等を伴うCD感染症を発症する。本菌は偏性嫌気性グラム陽性桿菌でありながら、先行研究において低酸素環境時における報告は皆無である。そこで、本研究ではCDが低酸素環境下でマウス骨髄由来マクロファージ(BMDMs)に感染した際にどのような影響を与え得るのか検討した。実際にCDをBMDMsへと感染させると、低酸素環境下における炎症性サイトカインIL-1 β やTNF α の放出量は通常酸素環境下に比べて有意に減少していた。また、CDは本菌が持つ毒素TcdA/B非依存的にパイロプトーシスに関連するCaspase-1およびIL-1 β 前駆体を低酸素特異的に分解していることも見出した。この分解は全てのタンパク質について観察されるわけではなく、我々の実験ではCaspase-1, IL-1 β , Gasdermin D, Gasdermin E, およびCaspase-7について観察された。さらにLPS, PolyI:C, Pam3CSK4など異なるTLRリガンド刺激を行ったところ、TRIF経路またはMyD88経路の活性化がタンパク質の減少に関与する可能性が示唆された。また、LDHアッセイの結果よりCDは低酸素特異的に細胞死を誘導していることがわかった。以上の結果から、CDは低酸素環境においてTcdA/B非依存的にBMDMsのアポトーシスとネクロトーシスを誘導することを見出した。結論として、CDは低酸素特異的に炎症性サイトカインなどのタンパク質分解やアポトーシスを含む細胞死を誘導することが示唆された。この成果は本来のCDの棲息する環境における宿主応答を理解する上で大変重要な知見となり得る。

P2-125

Caspase-12 is an innate immune sensor for bacteria-associated molecular patterns

○土屋 晃介, 細島 祥子, Hernandez-Cuellar Eduardo, Shenghui Zhi, 須田 貴司 (金沢大・がん研・免疫炎症)

○Kohsuke Tsuchiya, Shoko Hosojima, Hernandez-Cuellar Eduardo, Shenghui Zhi, Takashi Suda (Div. Immunol., Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ.)

Pyroptosis is an inflammatory form of regulated necrosis involved in host defense against microbial pathogens, inflammatory diseases, and anti-cancer immunity. Inflammatory caspases, such as caspase-1, -4, -5 cleave gasdermin D (GSDMD) to elicit pyroptosis. Caspase-12 is also an inflammatory caspase, but its role remains ambiguous. In humans and mice, caspase-12 activity is limited likely due to mutations in active site residues. Here, we show that cat and dog caspase-12 activate GSDMD to cause pyroptosis. The revertant mouse caspase-12, restored to the conserved form, also activated GSDMD. Caspase-12 proteins cleaved GSDMD at the same site as other inflammatory caspases. Cell lysis and GSDMD cleavage were induced in caspase-12-expressing cells after bacterial infection or transfection with bacterial lysates, suggesting that caspase-12 is activated by bacterial components. Feline caspase-12 was activated in vitro by Pam3CSK4, a synthetic bacterial triacyl lipopeptide, diacylated Pam2CSK4, lipoteichoic acid, or lysyl-phosphatidylglycerol, while dog and the revertant mouse caspase-12 responded to fewer of these bacteria-related molecules. Moreover, caspase-12 directly bound to the bacterial lipopeptides through the prodomain. Collectively, caspase-12 appears to recognize multiple bacterial components for triggering pyroptosis, especially in carnivores.

P2-126/FL4-16

過ヨウ素酸酸化により得られた乳酸菌ペプチドグリカン誘導体のIL-8産生活性

○野口 翔, 尾之上 さくら, 川原 一芳 (関東学院大・理工・生命科学)

IL-8 inducing activity of periodate-oxidized peptidoglycan from lactic acid bacteria

○Sho Noguchi, Sakura Onoue, Kazuyoshi Kawahara (Dept. Biosci., Col. Sci. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

【目的】ペプチドグリカン(PG)の部分構造であるムラミルジペプチド(MDP)や γ -D-グルタミル-*meso*-ジアミノピメリン酸(iE-DAP)は、それぞれ細胞内受容体NOD2とNOD1に認識され、免疫系の活性化へ繋がることから、PGはワクチンアジュバントとして有用であると考えられている。一方で、免疫活性が強すぎると、過剰な炎症反応を引き起こす危険性もある。本研究では、MDPの活性を減弱させる目的で、乳酸菌PGの糖部分を過ヨウ素酸酸化により破壊し、得られたPG誘導体のIL-8産生活性をTHP-1細胞およびNOD1あるいはNOD2発現細胞で測定した。【方法と結果】*Lactiplantibacillus plantarum*の細胞膜画分をSDS及びトリクロロ酢酸で処理した後、リゾチーム処理で得られた可溶性画分を0.1 M NaOHで加熱処理し、サイトカイン産生活性を持つリポペプチドを分解除去した。この画分をNaBH₄で還元して糖を開環した後、NaIO₄で酸化した。さらに塩酸加水分解により糖部分が破壊された誘導体を得た。得られた画分は全て透析操作を経ているため高分子画分と考えられる。分析の結果、NaIO₄処理前と比較して、PGに含まれるアミノ酸(Ala, Glu, DAP)量はほとんど変化がなかったものの、GlcN量は約3.2%に減少したことがわかった。この画分のIL-8産生活性を測定した結果、MDPをリガンドとするNOD2発現細胞では、NaIO₄処理前と比較してIL-8産生量は約1/100に減少し、iE-DAPをリガンドとするNOD1発現細胞では、NaIO₄処理前と同等であった。今後DAPを持たない*Levilactobacillus brevis*のPGについても同様の実験を行い比較検討する予定である。

P2-127

Inhibition of JAK promotes inflammasome activation by oral bacterial infection

○岡野 徳壽, 鈴木 敏彦 (東京科学大・医歯・細菌感染制御)

○Tokuju Okano, Toshihiko Suzuki (Dept. Bact. Path. Host Resp. Inst. Sci. Tokyo)

Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by oral bacterial infection. Some oral bacteria induce inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, and TNF α , release in immune cells. However, the mechanisms of induction of cytokines release are poorly understood. The Janus kinase (JAK) pathway is crucial in triggering the inflammatory signaling involving STAT/IL-6 signaling. JAK/STAT inhibitors are anti-inflammatory drugs that suppress autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease or cancer. However, there are no reports that these inhibitors affect periodontitis. We first tried to detect the inflammasome activation caused by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a periodontitis-associated bacteria, infection in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) treated with JAK inhibitors. JAK inhibitors enhanced inflammasome activation in *P. gingivalis* infection. We also checked other periodontitis-associated bacteria and found that *Tannerella forsythia* induces the progression of inflammasome activation in BMDMs such as *P. gingivalis* infection. However, STAT inhibitors, the downstream pathway of JAK, did not enhance the inflammasome activation by *P. gingivalis* infection. These data suggest that the JAK pathway inhibits the inflammasome activation by oral bacterial infection in a STAT pathway-independent manner.

P2-128/FL4-17

Supersulfides enhance neutrophil-mediated bacterial killing

○澤 智裕¹, Azizur Rahman¹, 豊元 柊弥¹, 津々木 博康¹, 赤池 孝章² (熊本大・院生命科学・微生物, ²東北大・院医・環境医学)

○Tomohiro Sawa¹, Azizur Rahman¹, Touya Toyomoto¹, Hiroyasu Tsutsuki¹, Takaaki Akaiki² (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ²Dept. Environ. Sci. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

Neutrophils consist almost 50% of circulating white blood cells and play important roles as first line defense against invading pathogens including bacteria and fungi. Supersulfides are endogenously occurring molecular species that have catenated sulfur chains in their structures, such as persulfides and polysulfides of cysteine, GHS, proteins, and inorganic forms. It has been demonstrated that supersulfides act as strong antioxidants than parental thiols. However, roles of supersulfides in regulation of neutrophil activation and function remained unknown. We observed that infections of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* caused reduction of intracellular GSH and its persulfide (GSSH). Specific supplementation of supersulfides in cells by supersulfide donor N-acetylcysteine tetrasulfide (NAC-S2) resulted in marked reduction of bacterial numbers in neutrophils. Administration of NAC-S2 protected mice from lethal infections by *S. aureus* and *S. pneumoniae*. These data suggest that cellular status of supersulfides may implicate in regulation of neutrophil function. Further understanding how supersulfides activate neutrophil function is warranted for developing new treatment strategy for bacterial and fungal infection control.

P2-129/FL4-18

大腸菌 BL21 株とその Lipid A 変異株が産生する外膜小胞の特性解析

○富永 龍之介^{1,2}, 安部 公博¹, 中村 知世^{2,3}, 西野 智彦^{2,3}, 山口 雄大¹, 明田 幸宏¹, 中尾 龍馬¹ (¹感染研・細菌1, ²工科大・バイオニクス, ³工科大・応生)

Characterization of outer membrane vesicles of *E. coli* BL21 and the isogenic lipid A mutant strains

○Ryunosuke Tominaga^{1,2}, Kimihiro Abe¹, Tomoyo Nakamura^{2,3}, Tomohiko Nishino^{2,3}, Takehiro Yamaguchi¹, Yukihiko Akeda¹, Ryoma Nakao¹ (¹Dept. Bacteriol. I, Natl. Inst. Infect. Dis., ²Grad. Sch. Bionics, Tokyo Univ. Technol., ³Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

【背景】外膜小胞(OMVs)は薬剤輸送担体およびアジュバントとして、医療・ヘルスケア分野での応用が見込まれるが、人体への使用に先立ち安全面の配慮が欠かせない。本研究では、Lipid A が無毒化テトラシル型 Lipid IVa に置換された大腸菌変異株から OMVs を得て、その性状と免疫学的機能について調査した。

【方法】BL21 株 (WT) と Lipid A 変異株 ClearColi (CC)由来 OMVs は、培養上清の超遠心後の沈渣として回収し、SDS-PAGE, SEM, リムラス法等に供試した。アジュバント活性は、OMVs とオポアルブミン抗原をマウスに投与後、抗原特異的抗体のクラス分布や量を ELISA で評価した。また、MBP 融合タンパク質として抗原 X をベリプラズム発現するベクターを構築し、それぞれの形質転換体の培養上清から得た OMVs に内封された MBP-X を定量した。

【結果】両者の OMVs の形態に差は認められなかったが、WT と比べて CC は OMVs 構成タンパク質の多様性、および内毒素活性が低下した。また CC の OMVs のアジュバント活性に関しては、WT と比べ、皮下投与の場合は、総 IgG 量に変化はないものの IgG2a と 2b 産生誘導能が著減、経鼻投与の場合は、さらに口腔および鼻腔内の分泌型 IgA 産生量が著減した。一方で、CC の OMVs は、WT の OMVs と比べて約 10 倍の MBP-X を内封することができた。

【結語】Lipid A の変異は、OMVs の様々な特性に影響を与えることが明らかとなった。本知見に基づき、CC 由来 OMVs が、安全で合理的な抗体作製法や、ワクチン開発に活用できる可能性が示唆された。

P2-130/FL4-19

抗菌ペプチド LL-37 は老化した A549 肺胞上皮細胞に細胞死を誘導する

○三田 一樹¹, 鈴木 香², 熊谷 由美², 射場 敏明¹, 長岡 功¹ (¹順天堂大・医療科学, ²順天堂大・医・生化学・生体システム医科)

Antimicrobial peptide LL-37 induces apoptosis in senescent alveolar epithelial A549 cells

○Kazuki Sanata¹, Kaori Suzuki², Yumi Kumagai², Toshiaki Iba¹, Isao Nagaoka¹ (¹Fac. Med. Sci., Juntendo Univ., ²Dept. Biochem. Syst. Biomed., Juntendo Univ. Grad. Sch. Med.)

敗血症などにおいて炎症反応の増強に老化細胞の SASP (senescence-associated secretory phenotype) が関与すること、そして老化細胞を除去すると炎症反応が減弱することが報告されている。一方、抗菌ペプチドは抗菌作用だけでなく、免疫担当細胞を含むさまざまな宿主細胞に作用することから、多機能性の生体防御ペプチドとして注目されている。我々は、抗菌ペプチド LL-37 がマウス敗血症モデルにおいて致死率を改善することを明らかにしている。そこで、本研究では、LL-37 の敗血症に対する防御機構の一端を明らかにするために、LL-37 の老化細胞に対する細胞死誘導作用について検討した。

まず、A549 II 型肺胞上皮細胞をエトポシド処理 (2μM) したところ、老化細胞の形態を示し、SASP マーカーである β-ガラクトシダーゼ染色と p21 の発現の増加し、細胞老化が誘導されることが確認された。そこで、老化 A549 細胞に抗菌ペプチド LL-37 (2~10μg/mL) を作用させて、アポトーシスについては Caspase-3/7 の特異的阻害剤 FAM-DEVD-FMK を用いて、ネクロトーシスについては Propidium Iodide (PI) を用いて細胞死を蛍光染色で評価した。その結果、LL-37 の濃度に依存して、非老化細胞に比べて老化細胞において FAM-DEVD-FMK で染色される細胞が増加したが、PI で核染色される細胞はほとんど観察されなかった。

以上の結果から、抗菌ペプチド LL-37 は老化細胞にアポトーシスを誘導することによって炎症反応を和らげる可能性が示唆された。

P2-131

Anti-inflammatory Effects of Supersulfides on Influenza A Virus Infection in Mice

○Foyals Hossen¹, 津々木 博康¹, 幸脇 貴久², 張 田力³, 藤原 章雄⁴, 押海 裕之², 赤池 孝章⁵, 澤 智裕¹ (¹熊本大・院生命科学・微生物, ²熊本大・院生命科学・免疫, ³秋田大・感染統括制御・疫学・分子病態研究センター, ⁴熊本大・院生命科学・細胞病理, ⁵東北大・院医・環境医学)

○Foyals Hossen¹, Hiroyasu Tsutsuki¹, Takahisa Kouwaki², Tianli Zhang³, Yukio Fujiwara⁴, Hiroyuki Oshiumi², Takaaki Akaiki⁵, Tomohiro Sawa¹ (¹Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ²Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ³Cent. Integr. Cont. Epidemiol. Mol. Pathophysiol. Infect. Dis., Akita Univ., ⁴Dept. Cell Pathol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ⁵Dept. Environ. Med. Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

Background: Influenza A virus (IAV) remains a significant global health threat and causes respiratory infections in humans. Excessive production of cytokines exacerbates IAV infection. Our previous studies showed that supersulfide donor N-acetyl-L-cysteine polysulfide (NAC-S2) has anti-inflammatory effects. In this study, we aimed to investigate whether NAC-S2 suppresses inflammation in IAV-infected mice and reduces the severity of IAV.

Method: Mice were infected intranasally with IAV (4.0 × 10⁶ pfu/head), administered subcutaneously with NAC-S2 and monitored for survival. Lung cytokines in infected mice were analyzed by ELISA and RT-qPCR. Supersulfide metabolomics in the lung was performed by LC-MS/MS. Lung histopathological changes were observed by hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Result: NAC-S2 improved the survival of IAV-infected mice. Cytokine production was induced in lung of IAV-infected mice. The levels of IL-1β, IL-6, and IL-18 were significantly reduced in mice treated with NAC-S2. Higher levels of supersulfides were detected in lung of mice treated with NAC-S2 compared to those of untreated mice. Histopathological analysis showed that NAC-S2 ameliorated infection-induced lung tissue damage.

Conclusion: NAC-S2 treatment may be a promising therapeutic strategy against IAV infection by producing supersulfides and effectively reducing pro-inflammatory cytokines.

P2-132

マクロファージにおける Rab32-LRO による殺菌機構の解析

Yangjie Li, ○Shiou-Ling, Sally Lu, 野田 健司 (大阪大・歯・口腔科学フロンティアセンター・口腔細胞生物)

Study the antibiotic mechanism of Rab32-LRO in macrophages

Yangjie Li, ○Shiou-Ling, Sally Lu, Takeshi Noda (Dept. Oral Cellular Biology, Center for Frontier Oral Science, Grad. Sch. Dentistry, Osaka Univ.)

日本はじめ世界的に化膿レンサ球菌 (GAS) 感染症は深刻となっており、その対応の重要性が増加している。私達は GAS 感染防御において、マクロファージにおける Rab32 陽性 LRO (リソソーム関連オルガネラ) がどのような役割を担っているかを解明することを目指している。LAP (LC3 関連ファゴサイトーシス) 形成にはオートファジータンパク質 ATG16L1 の V-ATPase 複合体への結合が必要であることが知られている。我々は最近 Rab32 が V-ATPase の a3 サブユニットの Rab32 陽性 LRO への輸送に関与していることを見出した (JBC 2023)。そこで、はじめにファゴサイトーシス過程における Rab32-LRO と LAP の関係性について調べた。pH センサーコートビーズを用いて Rab32 のリクルートメントとファゴソームの酸性化の順序を観察した結果、Rab32 がファゴソームの酸性化に必須であることが明らかとなった。また Rab32 は LC3 のリクルートメントに先立ってリクルートメントされた。さらに Rab32 欠損細胞では LAP 形成が抑制された。Rab32 およびそのパラログである Rab38 を欠損したマクロファージでは、GAS の殺菌効率が低下していた。これらの結果から、Rab32 は LAP 形成に関与し、GAS に対する殺菌作用に重要な役割を果たすと考えられる。

P2-133

Macrophages respond to lipopolysaccharide by modulating NLRP3 supersulfidation

○張 田力¹, 西村 明幸², 津々木 博康³, 門出 和精³, 松永 哲郎¹, 西田 基宏^{2,4}, 赤池 孝章⁵, 澤 智裕³ (1秋田大・感染統括制御・疫学・分子病態センター, ²熊本大・生命科学・微生物学, ³生理学研究所・心循環シグナル, ⁴九州大・薬・生理学, ⁵東北大・医・環境医学)

○Tianli Zhang¹, Akiyuki Nishimura², Hiroyasu Tsutsuki³, Kazuaki Monde³, Tetsuro Matsunaga¹, Motohiro Nishida^{2,4}, Takaaki Akaike⁵, Tomohiro Sawa³ (1Cent. Integr. Cont. Epidemiol. Mol. Pathophysiol. Infect. Dis., Akita Univ., ²Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto Univ., ³Div. Card Signal., Natl. Inst. Physiol. Sci., ⁴Dept. Physiol., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ., ⁵Dept. Environ. Med. and Mol. Toxicol., Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

Background and aim: Supersulfides, such as cysteine persulfide (CysSSH), are molecular species characterized by catenated sulfur moieties and are abundantly present across organisms. Previous study has suggested that these species play important role in Toll-like receptors-mediated innate immune and inflammatory responses. Here we examined the effect of supersulfides on NLRP3 inflammasome in response to lipopolysaccharide (LPS).

Materials and methods: N-Acetyl-L-cysteine connecting with polysulfur chains were synthesized as supersulfide donors (NAC-S₂). To activate the NLRP3 inflammasome, macrophages were primed with LPS, followed by challenging with activators for inflammasome (e.g. ATP, nigericin).

Results: We demonstrated that supersulfidation, a reversible post-translational modification of protein cysteine residues to persulfides or polysulfides, occurs endogenously to modulate NLRP3. Furthermore, this modification plays a crucial role in the NLRP3 inflammasome activation throughout whole processes. More importantly, Treatment of macrophages with NAC-S₂ significantly halts NLRP3 inflammasome activation both in vitro and in vivo by regulating NLRP3 supersulfidation.

Conclusion: Our findings provide new insights into the endogenous mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and constitute a potential therapeutic strategy for bacterial infection.

P2-134

カイコを用いた自然免疫応答評価系による食品素材由来活性物質の探索

○三上 雄大^{1,2}, 中島 弘人², 田淵 史晃², 石井 雅樹³, 宮下 惇嗣² (1帝京大院・医療技術・臨床検査, ²帝京大・医真菌・抗真菌免疫生物, ³武蔵野大・薬・分子細胞生物)

Exploration of food-derived bioactive compounds using the silkworm immune priming assay

○Kazuhiro Mikami^{1,2}, Hiroto Nakajima², Fumiaki Tabuchi², Masaki Ishii³, Atsushi Miyashita² (1Dept. Med. Tech., Grad. Sch. Clinical Lab Sci., Teikyo Univ., ²Lab. Antifungal Immunobiol., Inst. Med. Mycol., Teikyo Univ., ³Lab. Mol. Cell. Biol., Sch. Pharm., Musashino Univ.)

カイコは、病原体の死菌やペプチドグリカンに暴露されることで自然免疫応答を誘導し、大腸菌や緑膿菌による感染死から逃れることを、我々はこれまでに報告してきた。しかし、これら菌体成分以外の物質によって感染抵抗性が誘導されるかについては、検討を行っていなかった。そこで我々は、ペプチドグリカンの主要構成糖である N-アセチルグルコサミンに着目し、その重合体として天然に存在する六量体キトヘキサオース (GN6) やキチンの活性を検討した。実際、マウスや植物において GN6 やキチンに暴露することで、病原体感染に対する抵抗性が誘導されるという報告がある。まず、RAW264.7 細胞を用いて GN6 の自然免疫活性化能を評価した結果、炎症性サイトカインの産生が確認された。一方で、hTLR2 及び hTLR4 を発現させた HEK293 細胞では、GN6 による NF-κB 誘導は認められなかった。次に、動物であるカイコへの免疫活性化能を検討した。カイコに、キチン及び GN6 を投与すると、カイコの体液中に抗菌ペプチドが誘導され、個体レベルでの緑膿菌に対する感染抵抗性が認められた。さらに、食品素材のスkimミルクも同様にカイコの緑膿菌感染抵抗性を誘導した。当該生理活性を指標に skim ミルク中の自然免疫活性化物質の精製を進め、これまでに比活性が 2300 倍、収率は 83% となる画分を得ており、現在さらなる精製を行っている。以上の結果は、カイコの感染抵抗性獲得を指標に、GN6、キチン、並びに skim ミルク中の未同定物質といった非菌体成分による自然免疫活性化能を評価できることを示唆している。

P2-135

The E3 ubiquitin ligase SIAH1 targets a bacterial pore-forming toxin to facilitate xenophagy

○Min Wu, Xin Hu, 野澤 孝志, 中川 一路 (京都大・医・微生物)

○Min Wu, Xin Hu, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa (Dept. Microbiol., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Xenophagy, one of selective autophagy, recognizes and eliminates the invading pathogen through ubiquitination of bacterial surface components. Xenophagy is initiated by the damage of bacteria-surrounding endosomes by bacterial toxins; however, whether the host targets these xenophagy-inducible secretory factors to recognize bacteria remains unclear. Here, we report that the E3 ligase SIAH1 plays a pivotal role in recognizing and ubiquitinating streptolysin O (SLO), a toxin secreted by group A Streptococcus (GAS), ultimately promoting the formation and maturation of autophagosomes. Super-resolution microscopy and ubiquitination assay revealed that SLO is ubiquitinated around intracellular bacteria during GAS infection. We screened and identified E3 ligase SIAH1 that is recruited to intracellular GAS and colocalizes with SLO. SIAH1 is required for ubiquitin-labeling of GAS and autophagosome formation, and suppresses bacterial proliferation through recognition of the PSVP motif in SLO. Our findings highlight the crucial role of SIAH1-mediated ubiquitination of bacterial toxin in the xenophagic response to GAS.

P2-136

抗菌効果と抗バイオフィーム形成効果を併せもつ抗菌シートの開発

○山田 陽一¹, 加藤 久登¹, 吉井 圭介¹, 山西 健斗², 柴川 敏之³, 島田 憲一¹, 林 秀樹², 上田 剛慈⁴, 鈴木 宗⁵, 小川 和加野¹ (¹就実大・薬, ²就実大・心理, ³就実短期大, ⁴(株) エナジーフロント, ⁵品川ゼネラル (株))

The Development and Demonstration of the Antibacterial Sheet by filling dehydroabietic acid

○Yoichi Yamada¹, Hisato Kato¹, Keisuke Yoshii¹, Kento Yamanishi², Toshiyuki Shibakawa³, Kenichi Shimada¹, Hideki Hayashi², Takeji Ueda⁴, Hajime Suzuki⁵, Wakano Ogawa¹ (¹Sch. Pharm., Shujitsu Univ., ²Fac. Psych., Shujitsu Univ., ³Shujitu J.C., ⁴ENERGYFRONT INC., ⁵Shinagawa General Co.,Ltd.)

【目的】抗菌シートを高頻度接触面に用いることは、細菌による接触感染の予防に有効と考えられる。そこで、殺菌効果・抗バイオフィーム (BF) 形成効果を併せもつデヒドロアビエチン酸 (DAA) を多孔質のアロフェン膜に含浸させることで、抗菌シート (アビエシート®) を開発した。本研究では、DAA や本シートの抗菌効果を明らかにすること及び本シートを大学や薬局に実際に貼付した際の使用者への心理的効果などを解析することを目的とした。【方法】DAA の最小生育阻止濃度 (MIC) を測定した。菌液に抗菌シートを浸して培養し、培養液の変化を観察した。DAA や抗菌シート存在下で菌を培養し、BF 量を測定した。大学構内に抗菌シートを貼付し、アンケートを実施して心理的解析を行った。【結果・考察】測定したグラム陽性菌に対して DAA の MIC は 8 から 64 µg/mL であり、一定の抗菌効果を示した。DAA を 250 µg/cm² 含浸させた抗菌シートを黄色ブドウ球菌の菌液に浸したところ菌は生育しなかった。さらに、DAA を 25 µg/cm² 含浸させた抗菌シートの表面への黄色ブドウ球菌の BF 形成量を測定したところ、BF 形成は強力に阻害されていた。アンケートの心理学的解析により、大学の研究シーズを社会実装することは、大学の評価向上につながると考えられた。調理場、病院、老人保健施設など、接触感染リスクの高い施設内に本シートを貼付することにより、感染リスク低減に効果が期待できると考えている。

P2-137/FL4-20

Polygonum tinctorium extract reduces MRSA virulence via extracellular vesicle disruption

○渡部 菜穂子¹, Phawinee Subsomwong¹, 山根 亨介², 浅野 クリスナ^{1,3}, 中根 明夫³ (¹弘前大・院医・感染生体防御学, ²ウシオ電機株式会社, ³弘前大・院医・生体高分子健康科学)

○Naoko Watabe¹, Phawinee Subsomwong¹, Kyosuke Yamane², Krisana Asano^{1,3}, Akio Nakane³ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med., ²Ushio Inc., ³Dept. Biopolym. Health Sci., Hirosaki Univ. Grad. Sch. Med.)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a global health concern, responsible for both hospital- and community-acquired infections. Extracellular vesicles released by *S. aureus* (SaEVs) contain factors essential for bacterial survival and pathogenicity. *Polygonum tinctorium* is traditionally used as a natural dye and a disinfectant. In this study, we investigated the effects of *P. tinctorium* preparation (Indigo Ex), which was extracted by *d*-limonene, on MRSA-derived SaEVs. The morphology of Indigo EX-treated SaEVs was observed under electron microscope. The murine macrophage cell line, RAW 264.7, was used to evaluate the cytotoxicity and cytokine response induced by Indigo Ex-treated SaEVs. Our results showed that SaEVs particles were disrupted when treated with undiluted Indigo Ex. The WST-1 assay showed a reduction in RAW 264.7 cell viability by over 50% at a 1,000-fold dilution, but cytotoxicity was not observed at a 25,000-fold dilution of Indigo Ex. Indigo Ex-treated SaEVs induced lower levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-6) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) compared to untreated SaEVs. In conclusion, a low concentration of Indigo Ex can reduce the virulence of MRSA and its ability to regulate the immune response, without causing cytotoxicity to host cells. Our findings suggest that Indigo Ex has the potential to control MRSA infections.

P2-138

Effect of β2-microglobulin to dental plaque biofilm

○森 大気, 堂前 英資, 花岡 麻里子, 引頭 毅 (朝日大・歯・口腔微生物)

○Taiki Mori, Eisuke Domae, Mariko Hanaoka, Takeshi Into (Dept. Oral Microbiol., Div. Oral Infect. Health Sci., Asahi Univ. Sch. Dent.)

β2-microglobulin (β2M), a protein produced by nucleated cells, associates with MHC class I molecules. Once transported to the cell surface, β2M dissociates and enters blood and extracellular fluids, including saliva, to act as an antimicrobial factor. β2M exhibits dual antimicrobial mechanisms: bacteriostatic effects through membrane potential disruption and bactericidal activity via membrane damage under acidic conditions. In acidic conditions, β2M undergoes C-terminal β-sheet polymerization to form amyloid fibrils (AF), which is believed to be important for its antibacterial capacity. In this study, we explored the role of β2M, which is abundantly produced in saliva and gingival crevicular fluid, in dental plaque biofilm formation. Immunostaining of dental plaque specimens using anti-β2M and anti-β2M AF antibodies revealed diverse β2M AF morphologies. *In vitro* analyses with purified β2M showed that the presence of phosphate and Ca²⁺ promoted β2M AF formation. When *Streptococcus mutans* was cultured with monomeric β2M and phosphate and/or Ca²⁺, β2M AF accumulated within adherent biofilms. Pre-formed β2M AF increased total biofilm mass but reduced surface adhesion, generating floating biofilms. β2M AF formed fibrillar matrices encasing *S. mutans* cells, significantly altering biofilm structures. Thus, β2M AF modify the structural and adhesive properties of dental plaque biofilms.

P2-139/FL4-21

Campylobacter jejuni に対し抗菌活性を持つ納豆菌のプロバイオティクス効果

○門屋 亨介¹, 中谷 百花¹, 川嶋 琴音¹, 安田 侑加¹, 鈴木 かおり², 鶴木 暉², 福田 紗弓², 西川 宗伸² (¹椋山女学園大・生活科学・管理栄養, ²タカノフーズ株式会社・納豆研究開発)

Probiotic effect of *Bacillus natto* with antibacterial activity

○Ryosuke Kadoya¹, Momoka Nakatani¹, Kotone Kawashima¹, Yuuka Yasuda¹, Kaori Suzuki², Hikaru Ikarugi², Sayumi Fukuda², Takanobu Nishikawa² (¹Dept. Food and Nutrition, Sch. Life Stud., Sugiyama Jogakuen Univ., ²Dept. Natto Research and Development, Takanofoods Co.,Ltd)

Campylobacter jejuni による食中毒は世界各国で発生している食中毒であり、下痢や嘔吐などを引き起こし社会問題になっている。食卓の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は緊急の課題である。市販鶏肉が高確率に汚染していることから、加熱処理しか有効な防御策はない。本研究では、納豆菌が持つ抗菌活性機能に着目し、飼料に配合しカンピロバクター食中毒の拡大を防止することを目的とした。しかしながら、納豆菌には多くの株が存在するため、どの株が *C. jejuni* 増殖抑制に効果があるかは未知である。そこで、TTCC903 などの食用納豆菌株及び研究用納豆菌株を用い *C. jejuni* に対する抗菌効果、及び動物生体内でのプロバイオティクス効果を検討した。各納豆菌株の *C. jejuni* に対する抗菌効果測定は Well diffusion assay (WDA) 法で測定した。興味深いことに、全ての納豆菌株で抗菌活性があるわけではないことが示された。液体培地を用いた *C. jejuni* と納豆菌の共培養実験では WDA で抗菌効果を示した株では *C. jejuni* 生菌数の著しい減少が確認された。TTCC903 を始めとする *C. jejuni* に対して抗菌効果を示した株をマウスに摂取し、腸内への定着、抗菌効果、腸内細菌叢への影響を観察した。抗菌効果を示した納豆菌株では、*C. jejuni* のマウス腸内からの駆逐が観察された。この効果は納豆菌生菌摂取時に測定され、芽胞摂取時には見られなかった。また、納豆菌摂取により腸内細菌叢の多様性増加が確認された。さらに、*Lactobacillus* 属の存在率は増加していた。実験室内で示された納豆菌抗菌効果は生体腸内でも効果があることを示した本研究の結果は、動物生菌剤やプロバイオティクス分野に貢献すると考える。

P2-140/FL4-22

好熱菌 *Aeribacillus composti* が産生する抗菌物質の性状解析と同定の試み

○井上 笑花¹, 加藤 陽二¹, 米山 茉那¹, 林 将大¹, 有満 秀幸¹ (¹兵庫県大・環境人間, ²岐阜大・糖鎖生命コア研・嫌気性菌)

Characterization and identification of antibacterial substances produced by *Aeribacillus composti*

○Emika Inoue¹, Yoji Kato¹, Mana Yoneyama¹, Masahiro Hayashi¹, Hideyuki Arimitsu¹ (¹Dept. Microbiol., Sch. Human Sci. Env., Univ. of Hyogo, ²Div. Anaerobe Res., Inst. for Glyco-core Res., Gifu Univ.)

【目的】好熱菌は 55°C 以上の温度で増殖し、高い耐熱性と芽胞を形成することから高温保存食品の変敗起因菌となっている。以前、我々は *Aeribacillus pallidus* が耐熱性の異なる 2 種類の抗菌物質を産生することを報告したが、その後 16SrDNA に基づく系統解析より、本菌を *Aeribacillus composti* と改めて同定した。今回、本菌が産生する抗菌物質の精製を進め、その本態について更に解析した結果を報告したい。

【方法】2×YT 培地で 55°C, 24 時間培養した *A. composti* の遠心上清を硫酸塩析で濃縮後、DEAE Sepharose FF 未吸着画分を回収した。さらにこれを酸性条件下で SP Sepharose FF に吸着させ、NaCl 濃度での Stepwise 溶出で分画した。試料の抗菌活性は *Geobacillus stearothermophilus* を被検菌として塗抹し、寒天拡散法による阻止円形成の有無を確認した。さらに SDS-PAGE で精製試料を展開したゲルをシャーレに静置し、被検菌を混和した普通寒天培地を重層した。これを 55°C で一晚培養後に生じる阻止円の位置を、CBB-R250 染色によるバンドの位置と比較することで、抗菌物質の分子量を推定した。

【結果と考察】DEAE Sepharose の未吸着試料は pH4-11 条件下で安定していたため、SP Sepharose での分画を進めた。分画試料の活性はペプシン処理後も残存していた。SDS-PAGE 後のゲル上における抗菌試験では 6.5 kDa のマーカー以下の位置に活性が見られたが、CBB-R250 染色では当該位置にバンドを視認できず、銀染色レベルで僅かに認める程度であった。以上より本抗菌物質は比活性の高い低分子物質である可能性が示唆された。今後は DEAE Sepharose 吸着画分にも存在する抗菌物質を含め、更なる性状解析・同定を進めていく予定である。

P2-141

フィットネス・トレードオフで紐解くファージ療法：感染制御と細菌叢編集

○藤木 純平^{1,2}, 中村 暢宏^{1,2,3,4}, Derrick E. Fouts⁵, Bernd Schnabl^{2,6}, 岩野 英知^{1,4} (¹酪農大・獣医, ²カリフォルニア大サンディエゴ・医, ³国立感染研・治ワク, ⁴早大・総研・ファージ研, ⁵J.クレイグ・ベンター研・ヒトゲノム, ⁶VAサンディエゴ・医)

Phage Therapy via Fitness Trade-offs: Infection Control and Microbiota Editing

○Jumpei Fujiki^{1,2}, Tomohiro Nakamura^{1,2,3,4}, Derrick E. Fouts⁵, Bernd Schnabl^{2,6}, Hidetomo Iwano^{1,4} (¹Sch. Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., ²Dept. Med., UCSD., ³Res. Cent. Drug Vaccine Dev., Natl. Inst. Infect. Dis., ⁴Res. Cent. Phage., Comp. Res. Org., Waseda Univ., ⁵Dept. Human Gen Med., JCVI., ⁶Dept. Med, VASDHS)

何十年もの間、西洋諸国でファージ療法は抗菌薬の影に隠れていた。しかし現在では、薬剤耐性菌を制圧する強力なアプローチとして見直されてきている。一方で、腸内細菌叢が消化器疾患の進行と深く関連していることから、ファージの選択的殺菌作用による腸内細菌叢の精密編集が、ファージ療法への新たな関心を促している。しかしながら、臨床試験ではファージ耐性菌の発生も報告されておりその制御が鍵である。そこで本研究では、ファージ耐性菌に生じるフィットネス・コストに焦点を当て解析を展開した。

キノロン耐性緑膿菌を用いた解析では、LPS を受容体とするファージに対する耐性化に際し、*galU* (LPS 合成遺伝子) を含む大規模な染色体欠失を持つファージ耐性株が分離された。この様な変異体では薬剤排出ポンプ遺伝子 (*mexX* および *mexY*) も同時に欠失すること、およびキノロン系抗菌薬に対する感受性が回復することが分かった。また、ファージ耐性に寄与するゲノム構造 (Bacteriophage-induced *galU* Deficiency Region) は多くの緑膿菌株で保存されていた。加えて、腸内細菌叢でアルコール性肝炎の進行に寄与することが知られる腸球菌を用いた解析では、表面糖鎖構造を規定する遺伝子の変異がファージ耐性株に検出された。この様な変異体はマウス腸管に対する定着性が著しく減少することが観察された。これらの結果は、ファージ療法においてたとえファージ耐性菌が発生しても、治療にとって有利にその方向性を誘導できる可能性を示唆している。今後の基礎解析やファージ療法臨床試験を通し、ファージ耐性菌のフィットネスまでを含めた複合的観点からファージ療法の更なる発展・普及へ貢献したい。

P2-142/FL4-23

YaiX の大量発現は大腸菌の病原性と薬剤耐性を増強する

○本宮 絹華¹, 石川 一也¹, 小崎 智己¹, 三好 伸一^{2,3}, 古田 和幸¹, 垣内 力¹ (¹岡山大・院医歯薬・分子生物, ²岡山大・院医歯薬・環境生物薬学, ³岡山大・腸健康科学研究センター)

Overexpression of YaiX confers drug resistance and increases virulence in *Escherichia coli*

○Kinuka Hongu¹, Kazuya Ishikawa¹, Tomoki Kosaki¹, Shin-Ichi Miyoshi^{2,3}, Kazuyuki Furuta¹, Chikara Kaito¹ (¹Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Sch. Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Res. Cent. Intest. Health Sci., Okayama Univ.)

【目的】細菌の病原性の分子基盤を理解する為には、細菌の病原性に影響を与える遺伝子を同定する必要がある。本研究では、細菌の病原性を簡便に評価できるカイコ感染モデルを用いて、大量発現により大腸菌の病原性を上昇させる遺伝子の同定を試みた。【方法】大腸菌 W3110 株の全 ORF 大量発現株ライブラリー (ASKA ライブラリー) を 1 プレートごとに培養・混合し、カイコに注射した。感染死したカイコの体液から大腸菌株を分離し、カイコ体内での生存・増殖能の高い株を同定した。【結果】機能未知タンパク質 YaiX の大量発現株は空ベクター導入株 (EV 株) に比べて、カイコ体内での生存、増殖能が高かった。また、YaiX 大量発現株は EV 株に比べてカイコに対する高い殺傷活性を示した。YaiX の機能を知るために、様々な薬剤に対する耐性試験を行った。その結果、YaiX 大量発現株は EV 株に比べて、陽イオン界面活性剤、βラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、過酸化水素に耐性を示した。データベース検索により、YaiX がアシル基転移酵素にアミノ酸配列の類似性を示すこと、ならびに *Escherichia*, *Citrobacter*, *Shigella* の細菌種が多様な配列長の YaiX ホモログを有することが判明した。【考察】本研究の結果から、大腸菌において YaiX の大量発現が様々な抗菌物質に対する耐性化、ならびにカイコに対する病原性の増強を引き起こすことが示唆された。今後は、YaiX による病原性と薬剤耐性の増強メカニズムを解明するとともに、分子系統解析を行うことで多様な YaiX 配列長が生じた過程を明らかにしていきたい。

P2-143/FL4-24

Isolation and antibacterial evaluation of bacteriophages targeting *Enterococci*

○宋 冰心^{1,2}, 松尾 (川田) 美樹¹, 柴 秀樹², 小松澤 均¹ (¹広島大・医系科学・細菌, ²広島大・医系科学・菌叢生物)

○Bingxin Song^{1,2}, Miki Kawada-Matsuo¹, Hideki Shiba², Hitoshi Komatsuzawa¹ (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Biological Endodont., Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

Background: *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are known to cause opportunistic infections. Furthermore, these species can exhibit multidrug-resistance, particularly vancomycin-resistant enterococci (VRE) have become a problem in recent years. This indicates the urgent need for new antibacterial agents.

Objectives: In this study, we focus on bacteriophage as new antibacterial agents against multidrug-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*.

Methods: Sewage was used to isolate the bacteriophage against *E. faecalis* and *E. faecium*. Bacteriophage was isolated using soft agar overlay assay by forming a plaque against the prepared indicator strains. Then, purified bacteriophage activity against VRE and 55 *E. faecalis* and 52 *E. faecium* clinical isolates were evaluated.

Results: We isolated several types of bacteriophages active against *E. faecalis* and *E. faecium* clinical strains from sewage. Some bacteriophages had a broad host range against *E. faecalis* and *E. faecium* clinical isolates and over species activity. Moreover, some bacteriophages demonstrated efficacy against VRE strains.

Conclusion: The isolated bacteriophages showed antimicrobial activity against two *Enterococcus spp.* Therefore, the isolated bacteriophages had the potential to be developed as therapeutic agents to treat infections related to multiple antimicrobial-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*.

P2-144

組換えエンドライシンを用いた *Rhodococcus equi* 殺菌効果の検討

○鈴木 康規, 加地 寧々佳, 角田 勤 (北里大・獣医・獣医衛生学)

Evaluation of *Rhodococcus equi* bactericidal effects using recombinant endolysin

○Yasunori Suzuki, Neneka Kaji, Tsutomu Kakuda (Lab. Animal Hygiene, Sch. Vet., Kitasato Univ.)

マクロファージ内感染を引き起こす *Rhodococcus equi* はグラム陽性球桿菌であり, 子馬における化膿性肺炎の起因菌である。エンドライシン (Ely) はバクテリオファージ由来の細胞壁分解酵素の総称であり, ペプチドグリカン (PG) 層を開裂して菌体を破壊する。PG 層を細胞壁の最外殻に持つグラム陽性菌に対しては, 本タンパク質を添加することでも溶菌活性を示すとされる。本研究では *R. equi* に感染するファージにコードされる Ely に着目してその溶菌活性の検証し, 本タンパク質の抗菌薬としての可能性を検討した。分離したファージのゲノム解析の結果, 8 種類の Ely 様遺伝子が同定された。続いて, ProS2 融合 Ely の作出を試みたところ 7 種類の融合 Ely の精製に成功した。しかし, いずれの融合タンパク質においても <5µg/spot では, 解析した全菌株に対して明確なスポットの形成が認められなかった。続いて融合タンパク質から, ProS2 タグの除去を試みたところ, Ely-T1 のみ可溶化し, 純度の高い成熟型 Ely が精製できた。Ely-T1 は 0.5~5 µg/spot の範囲において解析した全 VapA 陽性株に対して明確なスポットを形成した。また, 培養マクロファージ内に感染した VapA 陽性株に対して, Ely-T1 は <5µg/ml において殺菌効果を示した。この結果は *in vivo* でも一致しており, Ely-T1 投与群では VapA 陽性株のマウス体内における増殖抑制効果が認められた。抗生物質にかわる抗菌剤の開発が求められる現況下において, Enzybiotics である Ely はこの要求を完全に満たすものである。本研究で精製した Ely-T1 が, 細胞内に感染している *R. equi* に殺菌効果を示したことから, タンパク質製剤としての有用性が高いことを示唆している。

P2-145

Antibacterial activity of *Dillenia indica* Linn. fruit extracts

○Pimwan Thongdee¹, Teerapat Phueakphong², Kirana Kaewpanphai², Nilnate Assavasinirijinda², Passara Wongthai¹, Nitchatorn Sungsirin¹, Pongthorn Narongroeknawin¹, Tanit Boonsiri¹ (¹Dept. Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, ²Dept. Biology, Sch. Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang)

The elephant apple (*Dillenia indica* Linn.) is a medicinal plant known for its diverse pharmacological properties, including bioactive compounds with antibacterial potential. This study evaluates the antibacterial activity of *Dillenia indica* Linn. fruit extracts obtained via maceration with ethanol at concentrations of 20%, 40%, and 95%. Using the disc diffusion method, the crude extract prepared with 40% ethanol at a concentration of 200 mg/mL demonstrated the highest inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, both Gram-positive bacteria. In contrast, none of the extracts exhibited inhibitory effects against the tested Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Further analysis of the 40% ethanol crude extract revealed minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of 15.63 mg/mL against Gram-positive bacteria, indicating superior antibacterial efficacy compared to other extracts. These findings highlight the potential of *Dillenia indica* Linn. fruit extracts, particularly the 40% ethanol preparation, as an effective antibacterial agent against pathogenic Gram-positive bacteria, supporting their potential use in developing alternative antimicrobial treatments.

P2-146/FL4-25

Establishing a library of Cas13a phage capsids for the elimination of CRC-associated *E. coli*

○Ola Alessa¹, 相羽 由詞¹, Kanate Thitiananpakorn¹, 氣駕 恒太郎^{1,2}, 渡邊 真弥¹, 宮永 一彦¹, Tan XinEe¹, 笹原 鉄平¹, 崔 龍洙¹ (¹自治医科大・医・細菌学, ²国立感染症研究所創薬・ワクチン開発研究センター)

○Ola Alessa¹, Yoshifumi Aiba¹, Kanate Thitiananpakorn¹, Kotaro Kiga^{1,2}, Shinya Watanabe¹, Kazuhiko Miyanaga¹, Tan XinEe¹, Teppei Sasahara¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Research Center for Drug and Vaccine Development, NIID)

Colorectal cancer (CRC) is a serious global health issue and the second cause of mortality in the world. The gut microbial composition, particularly the abundance of a specific *E. coli* group (toxin-X producing *E. coli*), play a critical role in CRC development. Early and precise eradication of these bacteria from the gut flora without disrupting gut flora balance is a vital step for CRC prevention. In this study, we aim to utilize the selective targeting mechanism of CRISPR-Cas13a system to develop an antimicrobial agent for effectively eliminating toxin X-producing *E. coli*. This is achieved by incorporating the Cas13a plasmid into phage capsids. Target bacterial strains were collected and sequenced, enabling the design of 40 Cas13a-guided RNAs (spacers) targeting conserved regions within the gene encoding toxin X. Infection ranges of eight candidate phages were tested and validated against target bacteria, resulting in the identification of three phages with distinct infection patterns. The current capsid library achieves coverage of approximately 40% of target bacteria, utilizing three distinct spacers. Ongoing efforts aim to expand this library of capsids and spacers to enhance targeting coverage. This research offers a promising solution for combating CRC progression by precisely targeting pathogenic *E. coli* while preserving gut flora equilibrium.

P2-147

Koetjapic acid の ClpP 活性化能と抗菌作用の乖離

瀬川 卓弥¹, 杉本 佳祐¹, 江口 佳奈¹, 〇高屋 明子^{1,2} (¹千葉大・院薬・感染制御, ²千葉大・真菌セ)

Dissociation between ClpP activation ability and antibacterial activity of koetjapic acid

Takumi Segawa¹, Keisuke Sugimoto¹, Kana Eguchi¹, 〇Akiko Takaya^{1,2} (¹Dep. Infect. Cont. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., ²MMRC, Chiba Univ.)

細菌の ClpP ペプチダーゼは, ClpX などの ATPase アンフォールダーゼと複合体を形成し, プロテアーゼとして細胞内恒常性の維持に関与する。ClpP は 7 量体のリング構造を形成し, 14 量体のバレル構造として機能するが, この安定化には Clp-ATPase が関与する。一方, 抗生物質 ADEPs は ClpP に直接結合し, Clp-ATPase 非依存的に複合体形成および異常なタンパク質分解を促進することで, グラム陽性菌に抗菌活性を示す。本研究では, 天然物 Koetjapic acid (KA) が MRSA および肺炎球菌の増殖を阻害すること, さらにサルモネラ ClpP の *in vitro* カゼイン分解活性を Clp-ATPase 非依存的に促進することを見出した。KA の抗菌活性が ClpP 活性化を介するかを検討するため, 肺炎球菌の野生株および ClpP 欠損株を用いた増殖阻害試験を実施した。その結果, ClpP 欠損株でも野生株と同様に増殖が阻害され, KA の抗菌作用が ClpP に依存しないことが示唆された。さらに, 肺炎球菌 ClpP を精製し, カゼイン分解活性を測定したところ, 活性は観察されなかった。ADEP1 を添加した場合には 7 量体以上の複合体形成が確認されたが, KA 添加では複合体形成が認められなかった。一方, サルモネラ ClpP では KA 添加によりカゼイン分解活性が促進されたものの, 複合体形成促進能は弱かった。これらの結果から, KA は特定の細菌種で Clp-ATPase 非依存的に ClpP の分解能を活性化するが, 肺炎球菌に対する抗菌作用は ClpP 非依存的であることが示唆された。

P2-148

Analysis of the diversity of sensitivity of *Streptococcus mutans*-specific bacteriophage ϕ KSM96

○山内 悠実^{1,2}, 西濱 早紀^{1,2}, 松尾 美樹^{2,3}, 久恒 順三⁴, 菅原 庸⁴, 菅井 基行^{3,4}, 柴 秀樹¹, 小松澤 均^{2,3} (¹広島大・医系科学・歯髄生物学, ²広島大・医系科学・細菌学, ³広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, ⁴国立感染症研究所薬剤耐性研究センター)

○Yumi Yamauchi^{1,2}, Saki Nishihama^{1,2}, Miki Matsuo^{2,3}, Junzo Hisatsune⁴, Yo Sugawara⁴, Motoyuki Sugai^{3,4}, Hideki Shiba¹, Hitoshi Komatsuzawa^{2,3} (¹Dept. Biol. Endod., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., ⁴Res. Cent for AMR, NIID.)

Objective: *Streptococcus mutans* (*Sm*), a cariogenic bacterium, is associated with systemic diseases such as cerebrovascular disease by collagen-binding protein, Cnm, positive strain. Up to date, no methods exist to selectively eliminate *Sm*. We've previously isolated the temperate bacteriophage (phage) ϕ KSM96, which exhibits specific antibacterial activity against *Sm*. This study aims to analyze the relation of ϕ KSM96 activity to *Sm* isolates with their genomic information. **Method:** Clinical 144 *Sm* isolates (Hiroshima University Hospital Research Ethics: E2021-2581) were used. The phage particles were purified by a method using polyethylene glycol 6000. We used soft-agar overlay assay to evaluate phage activity against *Sm*. Using genomic information, we analyzed the association of phage activity with virulence genes including Cnm and antigen serotypes. **Result:** The antibacterial activity of ϕ KSM96 was varied among strains. Genomic analysis showed an association between phage activity and antigen serotype. ϕ KSM96 also showed the activity against Cnm-positive strains, but its activity was not correlated with Cnm genes or virulence genes. **Conclusion:** This study showed that ϕ KSM96 has broad antibacterial activity against *Sm*, including Cnm-positive strains. Its activity was diverse and associated with antigen serotype. Further studies will explore the relevance of ϕ KSM96 to the immune system.

P2-149/FL4-26

薬剤耐性菌に対し抗菌活性を持つ *S.capitis* 株の解析

○大段 慶十郎^{1,2}, 鈴木 優仁¹, 松尾 美樹^{1,3}, 久恒 順三^{3,4}, 相川 友直², 菅井 基行^{3,4}, 小松澤 均^{1,3} (¹広島大・医系科学・細菌学, ²広島大・医系科学・口腔外科学, ³広島大・院内感染症プロジェクト研究センター, ⁴国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

Analysis of *S.capitis* strain with antibacterial activity against antimicrobial resistant bacteria

○Keijuro Ohdan^{1,2}, Yujin Suzuki¹, Miki Matsuo^{1,3}, Junzo Hisatsune^{3,4}, Tomonao Aikawa², Motoyuki Sugai^{3,4}, Hitoshi Komatsuzawa^{1,3} (¹Dept. Bacteriol., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ²Dept. Oral and Maxillofacial Surgery., Grad. Sch. Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ., ³Proj. Res. Ctr. for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima Univ., ⁴Antimicrobial Resistance Res. Ctr., National Institute of Infectious Diseases)

薬剤耐性菌は、世界中で深刻な問題となっており、薬剤耐性菌に対する新規抗菌剤の開発が求められている。本研究では、MRSA および VRE を含むグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を持つ *Staphylococcus capitis* が産生する 2 つの抗菌物質を明らかにした。鼻腔から分離した 18 株の *S. capitis* を用いて、MRSA である MW2 株に対する抗菌活性を soft agar overlay 法にて評価した。その結果、MW2 に対し強い抗菌活性を持つ *S. capitis* を見出した。本菌株を用いて VRE, *Clostridium difficile*, *Bacillus coagulans* 等についても検証した結果、強い活性を認めた。本菌株の全ゲノム塩基配列を決定し、抗菌性ペプチド遺伝子の探索を行った結果、プラスミド上に Thiopeptide である Micrococin P1 (MP1) および Capidermicin をコードする遺伝子を認めた。次に *S. capitis* 培養上清から弱陽イオン交換体を用いて活性画分を粗精製した後、HPLC にてさらに精製し、質量解析の結果から 2 つのペプチドであることを確認した。2 つの抗菌ペプチドは同一のプラスミド上に認めたことから、プラスミド脱落株を作成し、親株との抗菌活性を比較した結果、プラスミド脱落株は抗菌活性を示さず、HPLC 解析でも抗菌ペプチドは検出されなかった。MP1 の精製標品は Capidermicin 精製標品に比べて、MW2 株や *B.coagulans* に対して強い活性を示した。これらの結果より MP1 は幅広くグラム陽性細菌に対し抗菌活性を認め、臨床応用の可能性が示唆された。今後は細菌叢に及ぼす影響等について検証していきたい。

P2-150

デフィシル菌特異的溶菌酵素 CD33800 の触媒ドメインの生化学的構造学的解析

○玉井 栄治¹, 関谷 洋志¹, 中矢 紅美¹, 大垣 陽香¹, 可部 裕真¹, 野中 康宏², 神鳥 成弘³ (¹松山大・薬・感染症学, ²香川大・医・薬理学, ³香川大・医・研基セ)

Biochemical and structural analysis of the Catalytic Domain of *C. difficile*-specific autolysin

○Eiji Tamai¹, Hiroshi Sekiya¹, Kumi Nakaya¹, Haruka Ogaki¹, Yuma Kabe¹, Yasuhiro Nonaka², Shigehiro Kamitori³ (¹Dept. Infec. Dis., Col. Pharm. Sci., Matsuyama Univ., ²Dept. Pharmacol., Fac. Med., Kagawa Univ., ³Res. Faci. Cent. Sci. & Tec. Facul. Med., Kagawa Univ.)

【目的】デフィシル菌は、偽膜性大腸炎や抗菌薬関連下痢症の主な原因菌である。溶菌酵素は、ペプチドグリカン分解し溶菌させる酵素である。これは既存の抗菌薬に耐性を示す菌にも有効な抗菌薬として期待されている。本研究では、デフィシル菌 630 株のゲノムにコードされている溶菌酵素 (Gene ID : CD33800) についてその生化学的性状とペプチドグリカン分解メカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法】デフィシル菌 630 株のゲノム DNA を鋳型とし、PCR にて CD33800 遺伝子のシグナルペプチドを除く全領域及び触媒ドメイン (CD) の DNA を増幅し、大腸菌発現ベクター (pColdII) にクローニングした。また、PCR により触媒ドメインの変異遺伝子を構築し、同様にクローニングした。大腸菌を用いて大量発現を行い精製を行った。溶菌活性は濁度低下法により測定した。また、X 線結晶構造解析及びドッキングシミュレーションを行った。

【結果と考察】CD33800 の全領域および CD の溶菌活性を測定した結果、前者は溶菌活性を示さなかったが、後者は強い活性を示した。また、その活性は、pH7 付近で最大となり、アルカリ性及び NaCl 添加で活性が低下した。また、CD の溶菌活性は、デフィシル菌に対して特異的であった。さらに、CD の X 線結晶構造解析によりその構造を明らかにすることができた。CD と基質のドッキングシミュレーションを行い、活性中心を構成しているアミノ酸を推定した。これらのアミノ酸を変異させた CD の溶菌活性を測定した。その結果、ほぼ全ての変異体で溶菌活性が低下していたことから、シミュレーションは正しいと考えられる。

P2-151

Candida albicans に対する抗菌ペプチドの抗真菌活性と作用メカニズム

○日吉 美咲¹, 小泉 大輔², 外川 理絵², 河原崎 正貴², 本田 みちよ¹ (¹明大院・理工研・応用化学, ²マルハニチロ株式会社)

Antifungal activity and mechanism of action of antimicrobial peptides against *Candida albicans*

○Misaki Hiyoshi¹, Daisuke Koizumi², Rie Togawa², Masataka Kawarasaki², Michiyo Honda¹ (¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ., ²Maruha Nichiro Corporation)

【緒言】*Candida albicans* (*C. albicans*) はヒトの日見感染症の主要な病原体であり、通常は抗真菌剤を用いた単剤療法が行われるが、薬剤に対する耐性を示す株が多数報告されている。そこで我々は、複数の作用機序を有することで薬剤耐性が獲得されにくいとされる抗菌ペプチド (AMP) に着目した。本研究では、*C. albicans* に対し単一のアミノ酸から構成される AMP と膜透過性配列を有する AMP を単独または併用で処理し、これらの抗真菌活性の発現メカニズムを調査することを目的とした。【実験】はじめに、*C. albicans* に対する AMP の単独・併用処理時の抗真菌感受性試験を行った。次に、作用機序を調査するために、蛍光標識した AMP を単独または併用で処理し、それらの局在を顕微鏡により観察した。【結果】単独処理時において、各 AMP は濃度依存的な抗真菌活性を示した。また、いずれの AMP も主として細胞膜及び液胞に局在した。これは、AMP が細胞膜へ付着し、膜透過または膜損傷を引き起こすことによって内在化が進行したと考えられる。一方、併用処理時は、AMP の顕著な抗真菌活性の向上は認められなかったが、顕微鏡観察の結果から、各 AMP が細胞膜を透過するまでの時間に差異があることが明らかになった。また、細胞内に侵入した AMP は液胞に局在するだけでなく、その他の異なる箇所にも局在することが確認された。これらの結果は、AMP の種類によって細胞膜透過性や内在化経路が異なる可能性を示唆している。【結論】濃度依存的な抗真菌活性を示す AMP は、その種類により様々な作用機序が存在する可能性が示され、AMP の併用療法が薬剤耐性菌に対する効果的な治療戦略となる可能性がある。

P2-152

Mycobacteriophages isolated from soils and sewages in Japan

○酒井 純, Aa Haeruman Azam, 小島 新二郎, 氣駕 恒太郎 (国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Jun Sakai, Aa Haeruman Azam, Shinjiro Ojima, Kotaro Kiga (Dept. Reser. Cent. Drug Vaccl. Develop., Nat. Insti. Infect. Disea.)

Purpose: Non-tuberculosis mycobacterial (NTM) infections have been increasing worldwide. In Japan, *Mycobacterium avium* is a major species among NTM infections. We focused on bacteriophages as a potential novel treatment for NTM. In this study, we aimed to isolate various bacteriophages from natural samples and sewage in Japan and analyze their lytic activity against *M. avium* and *M. smegmatis* (a model mycobacterium). **Methods:** Sixty-two natural samples and seven sewage samples were collected and processed to extract and concentrate bacteriophages. After purification and isolation of bacteriophages capable of infecting *M. smegmatis* ATCC strains, we assessed the lytic activity of these phages against five clinical isolates of *M. avium*. **Results:** A total of 27 mycobacteriophages were isolated from the samples (21 from natural sources and 6 from sewage). Among these, seven phages exhibited lytic activity against three *M. avium* isolates. Sewage-originated mycobacteriophages infected *M. avium* isolates with comparable efficiency to *M. smegmatis*. Survival assays demonstrated that sewage-originated mycobacteriophages exhibited more efficient killing of *M. avium* strains compared to natural-originated mycobacteriophages. **Conclusion:** These findings demonstrate the potential effectiveness of these mycobacteriophages against both *M. smegmatis* and clinical isolates of *M. avium*.

P2-153/FL4-27

サルモネラを用いた菌増殖の可視化・銅鉄合金の抗菌性とその可視化

○翠川 裕 (三重大・院・生物資源)

Visualization of bacterial growth using Salmonella, antibacterial properties of copper-iron alloys

○Yutaka Midorikawa (Fac. Bioresources, Mie Univ.)

【はじめに】食中毒菌サルモネラが産生する硫化水素が形成する硫化鉄で菌の増殖を可視化する研究を行っている。本研究の結果可視化に成功した点を大別する。大別とは、菌を増殖する場合および菌増殖を阻害する場合の相反することとなる。柑橘由来の有機酸菌由来の有機酸が菌増殖を促進する場合と阻害する場合があることをこの手法で可能としている。嫌気条件下で抗菌性物質を証明するメカニズムも開発している。この度、本手法の成果を報告する。数千年に及ぶ人類の文明の中でも、決して混ざることができないと言われてきた合金が不可能とされた2つの金属が、鉄と銅である。特に、その合金である銅含有ステンレスが2023年に誕生したので、銅ステンレスとその波及品の抗菌性有無を判定したので結果を示す。【方法】抗菌性の可視化を実現するために、食中毒菌サルモネラが産生する硫化水素が形成する演者の特許技術である硫化鉄の黒色変化を用いた(特許 6406875)。今回は、サルモネラよりも病原性の弱いエドワードシエラを用いた。銅ステンレスは、通常のステンレスに10%の銅が含有された合金を用いた。銅含有ステンレスとステンレスをエドワードシエラが接種されたDHL培地上に被検体を載せ、24時間37°Cで培養した。【結果】培養後、ステンレス直下では、エドワードシエラ菌が産生する硫化水素が形成する硫化鉄が黒色を呈した。銅ステンレス製品を載せた場合、黒色を認めなかった。【考察】銅ステンレス合金及びその派生品からは、黒色変化を認めないので抗菌性が証明される。

P2-154/FL4-28

Development of a Neonatal Mouse Model for Evaluating MRSA Infection and Phage Therapy

○Yeo Syin Lian Adeline, XinEe Tan, 相羽 由詞, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Yeo Syin Lian Adeline, XinEe Tan, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyana, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Div. Bacteriol. Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

A bactericidal agent combining bacteriophages and CRISPR-Cas13a is being developed to specifically target the *mecA* gene in MRSA. However, adult mice, commonly used to evaluate bactericidal activity, are non-natural hosts for MRSA and require high bacterial doses to establish infections, complicating *in vivo* modeling. To address this challenge, we developed a neonatal mouse model to exploit the susceptibility of their immature immune systems, allowing infection with lower bacterial doses.

In this study, 2 days old C57BL/6J neonatal mice were infected intracranially with 10^5 - 10^7 CFU/pup of MRSA to determine the lethal dose. Bacterial counts in the brain were analyzed from day 1 to day 3 post-infection to identify the peak infection period and optimal therapeutic window. Phage therapy was then evaluated using engineered phage equipped with CRISPR-Cas13a system targeting *mecA*.

The lethal dose for intracranial MRSA infection was 10^6 CFU/pup, with the peak infection and therapeutic window occurring 12-36 hours post-infection. The phage therapy showed effective outcomes with lower bacterial cell count than the control group without the treatment. This neonatal MRSA model provides a robust and versatile preclinical platform for studying phage therapy and other antimicrobial strategies. It is currently being used to evaluate phage-based treatment for a range of AMR pathogens.

P2-155/FL4-29

Development of an effective antibiofilm therapy based on phage-gold nanorod conjugates

○Sarangi Jayathilake, 川口 智史, Srivani Veerananarayanan, Palaninathan Vivekanandan, Hossain Razib, Kanate Thitiananpakorn, 渡邊 真弥, Longzhu Cui (自治医科大・医・細菌学)

○Sarangi Jayathilake, Tomofumi Kawaguchi, Srivani Veerananarayanan, Palaninathan Vivekanandan, Hossain Razib, Kanate Thitiananpakorn, Shinya Watanabe, Longzhu Cui (Dept. Bacteriol., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Biofilm associated bacterial infections are notoriously difficult to treat due to their intrinsic nature of antimicrobial resistance and tolerance. Here, we present a new antibacterial approach utilizing bacteriophage-gold nanorod (AuNR) conjugates for targeted antibiofilm therapy. Phages were engineered with a short gold-binding peptide via phage display, enabling surfactant-cleared AuNRs to bind on to the phage capsids. The conjugation of AuNR to phages was confirmed by TEM imaging, and the biocompatibility of phage-AuNR conjugates was validated using a metabolic activity measurement assay. The therapeutic potential of the conjugates was evaluated under near-infrared (NIR) irradiation by treating mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Efficient conjugation of AuNRs to phage capsids was confirmed, and a simple washing step during the conjugate preparation effectively eliminated the toxic effects of AuNR on cell viability. Following therapy, complete eradication of biofilm cells was achieved compared to controls. Currently, the efficacy of Phage-AuNRs conjugates is being assessed in an *in vivo* skin infection animal model. This study highlights the successful development of a promising antibiofilm therapy that combines the bacteria-targeting capabilities of phages with the photothermal properties of AuNRs.

P2-156

Surfactin inhibits lactic acid production by cariogenic bacteria

○若松 信博^{1,2}, 山崎 亮太², 吉岡 香絵², 土生 学¹, 有吉 渉² (¹九歯大・顎顔面外科, ²九歯大・感染分子生物)

○Nobuhiro Wakamatsu^{1,2}, Ryota Yamasaki², Yoshie Yoshioka², Manabu Habu¹, Wataru Ariyoshi² (¹Div. Oral and Maxillofacial Surgery, Kyushu Dental Univ., ²Div. Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental Univ.)

Background: Dental caries is a common disease among a wide range of generations. Fluoridated toothpastes and mouthwashes are used as caries-preventive agents, but sometimes cause disturbances in the oral flora and allergies. Therefore, we focused on Surfactin, a natural surfactant produced by *Bacillus subtilis*, as a safer drug. In this study, we examined the inhibitory effect of Surfactin on lactic acid production by caries-pathogenic bacteria.

Methods: The strains used were *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 and *Streptococcus mutans* UA 159. For inhibition of lactic acid production, BHI+Surfactin+1% sucrose solution was added to the bacterial solution with OD₆₀₀ = 0.4 and incubated for 1 hour (37°C, 5% CO₂ conditions). After incubation, lactate concentration was measured using absorbance with a Lactate Assay Kit-WST(Dojindo). The bactericidal effect of Surfactin was determined by measuring CFU/ml by spot plate.

Results: Surfactin at concentrations ranging from 100 to 1000 µg/ml was reduced lactate production in against *S. sobrinus* and *S. mutans*, although its bactericidal and growth inhibitory effects were poor.

Conclusion: Because of its low bactericidal effect and high lactic acid inhibition, Surfactin is expected to reduce the virulence of plaque without unnecessarily transitioning the bacterial flora.

P2-157

Development of a potent CRISPR-Cas13a-based antibacterial agent through crRNA sequence optimization

○ホセシ サラー, タン シンイー, 氣賀 恒太郎, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 (自治医大・医・細菌学)

○Sarah Hossain, XinEe Tan, Kotaro Kiga, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Teppei Sasahara, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immunity, Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

Antimicrobial resistance (AMR) is becoming a major public health threat worldwide. Among resistant pathogens, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is particularly notorious for its prevalence and resistance to most available antibiotics. To address this issue, our laboratory has previously developed an antibacterial capsid (AB-capsids), phage capsids loaded with mecA-targeting CRISPR-Cas13a, for gene-specific killing of MRSA. However, the killing efficiency is yet to be improved as implicated by its ineffectiveness against certain clinical strains. This study aims to enhance the killing efficacy of AB-capsids via optimization of crRNA sequences targeting a staphylococcal gene. A total of 35 crRNAs of different GC content were custom-synthesized and cloned onto plasmids carrying CRISPR-Cas13a. Two model systems were established to evaluate the killing efficiencies of those crRNAs: *E. coli* by double plasmid transformation, and *S. aureus* by direct electroporation. Among the 35 crRNA studied, Sp10 demonstrated the highest killing efficiency, resulting in a marked reduction in colony counts compared to the control group, in both *E. coli* and *S. aureus* systems. These results suggest that incorporating Sp10 into AB-capsids could significantly enhance their killing efficacy. We anticipate that this advancement will pave the way for developing a potent alternative treatment for MRSA.

P2-158

Induction of β -defensin mRNAs in human cell line TR146 by the natural antifungal agent holotoxin A1

○矢野 明, 白石 朗子, 結城 彩花 (岩手生工研・生物資源)

○Akira Yano, Akiko Shiraishi, Sayaka Yuki (Dept. Bioresour. Sci., Iwate Biotech. Res. Ctr.)

Introduction: Sea cucumber, *Apostichopus armata*, is known as a traditional Japanese sea food, which can be eaten raw and have anti-fungal activities. Active ingredients are anti-fungal saponins, holotoxins, work as chemopreventive agents from their enemies such as fish. Holotoxins are used as agents for athlete's foot that are effective against fungi, *Trichophyton* or *Candida* etc. Holotoxins have several types of carbohydrate chains, then we tried to isolate single ingredient for evaluating the activities. **Methods:** The holotoxin mixture was extracted and fractionated by a resin column chromatography from sea cucumbers, then holotoxin A1 was purified by recycle-HPLC. The minimum inhibitory concentration of holotoxin A1 against *C. albicans* was determined by a microdilution method, and the cytotoxic activity was evaluated using the human buccal cell line TR146. Its defensin induction activity was also determined by RT-qPCR methods. **Results:** Holotoxin A1 inhibited the growth of *C. albicans* at 2 µg/mL, without remarkable cytotoxic activity on TR146 cells. It induced hBD-2 and hBD-3 mRNAs from TR146 cells at 0.5 µg/mL more than a typical defensin inducer LPS.

P2-159

Colistin-conjugated silver nanoparticle as a new type of animal drug

○Poowadon Muenraya^{1,2}, Thamonwan Wanganuttara^{1,2}, Iyo Takemura-Uchiyama¹, Kenji Yokota¹, Jumpei Uchiyama¹, Osamu Matsushita¹ (¹Okayama Univ., ²Walailak Univ.)

Introduction: Colistin is used as the 2nd line of antibiotic in animals. The use of colistin should be limited because of the rise of resistant bacteria. Silver nanoparticles (AgNPs) are potential antimicrobial agents. The conjugation of AgNPs with colistin is hypothesized to reduce the colistin dosage in animals. This study focused on preparation and evaluation of colistin-conjugated AgNPs (Col-AgNPs).

Methods: AgNPs (17.6 nm in diameter) were synthesized by reducing silver nitrate solution with sodium borohydride. Colistin was added to AgNPs to produce Col-AgNPs by electrostatic conjugation. Charge and morphology of particles, antimicrobial activity, and cytotoxicity were examined.

Results and discussion: Col-AgNPs were negatively-charged spherical particles with 25.9 nm in diameter. Col-AgNPs exhibited synergistic effect against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* when compared with colistin or AgNPs alone. This was probably because Col-AgNPs delivered the concentrated colistin to bacterial surface. Cytotoxicity results showed that Col-AgNPs were 12.5% less toxic than colistin alone. Col-AgNPs demonstrated not only a 52% decrease in colistin amount but also a 27% reduction in cost at the same level of antimicrobial activity as colistin alone. Therefore, Col-AgNPs is a potential seed for the veterinary setting.

P2-160

A novel antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus* derived from *Brevibacillus* sp. WUL10

○Thamonwan Wanganuttara^{1,2}, Poowadon Muenraya^{1,2}, Iyo Takemura-Uchiyama¹, Kenji Yokota¹, Jumpei Uchiyama¹, Osamu Matsushita¹
(¹Okayama Univ., ²Walailak Univ.)

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium causing intractable infections such as pneumonia and bacteremia. Soil bacteria are a valuable source for drug discovery. We aim to isolate and characterize the new antimicrobial agent against *S. aureus* from spore-forming bacteria in soil.

Methods and materials: Soil samples were collected from Nakhon Si Thammarat, Thailand. After heating the soil samples, bacteria were isolated. Antimicrobial activity was screened against *S. aureus*. The antimicrobial agent was purified and analyzed by LC-MS/MS. Stability was examined.

Results and discussion: We isolated 967 strains. After antimicrobial activity screening, 9 strains showing positive antimicrobial activity against *S. aureus* were selected. Among 9 strains, we focused on the strain WUL10, which was identified as *Brevibacillus* sp. We then purified the antimicrobial agent, WPep, which was predicted to be a linear peptide made of a single α -helix with a net charge +3 at pH 7.4. WPep showed a minimal inhibitory concentration of 1 μ g/mL against *S. aureus* strains, which we examined, including 1 methicillin-susceptible and 3 methicillin-resistant strains. WPep was stable at high temperatures up to 121°C, in a pH range of 2 - 12, and in the presence of proteases. In conclusion, WPep is a potential antimicrobial agent against *S. aureus*.

P2-161

Development of a System to Evaluate Phage Effectiveness against Intracellular Mycobacteria

○Orawee Kaewprasert, 渡邊 真弥, 島守 祐月, Sharmin Sultana, 齋藤 明美, Srivani Veerananarayanan, 宮永 一彦, 相羽 由詞, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医科大・医・細菌学)

○Orawee Kaewprasert, Shinya Watanabe, Yuzuki Shimamori, Sharmin Sultana, Akemi Saito, Srivani Veerananarayanan, Kazuhiko Miyana, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Dept. Infection and Immunity, Sch. Medicine, Jichi Medical Univ.)

Mycobacteria, including *M. tuberculosis*, can infect and persist within host cells such as macrophages, posing a significant challenge to effective treatment. Bacteriophage therapy has recently emerged as a promising alternative for targeting intracellular mycobacteria. However, evaluating the effectiveness of phages in accessing and infecting intracellular bacteria is critical for their selection and optimization. In this study, we developed a new method to assess the intracellular translocation and infectivity of phages. Using TM4, a model phage for mycobacteria, we incorporated the mScarlet fluorescent protein gene into its genome. Following the infection of THP-1 macrophages cells with BCG, we applied the mScarlet-tagged TM4 phage, and observed red fluorescence emitted by BCG as early as two hours post-phage administration. This approach successfully demonstrates a method to evaluate the infectivity of phages against intracellular mycobacteria and provides a framework for advancing phage-based therapies.

P2-162

海綿および海藻由来のフェノール性臭素化合物の MRSA, VRE に対する抗菌活性測定

○小川 和加野¹, 山田 陽一¹, 藤井 由希子², 原田 浩一² (¹就実大・薬, ²第一薬科大・薬)

Antimicrobial properties of phenolic brominated compounds from marine sponges and seaweed

○Wakano Ogawa¹, Yoichi Yamada¹, Yukiko Fujii², Koichi Harada² (¹Sch. Pharm., Shujitsu Univ., ²Sch. Pharm., Daiichi Univ. Pharm.)

【背景】海洋生物からは様々な臭素化合物が分離報告されている。私達は海綿や海藻からフェノール性臭素含有化合物を分離・同定した。これらは消毒薬トリクロサン (TrCS) と類似構造を有していたが、その抗菌活性は明らかではない。そこで、海綿・海藻由来化合物の抗菌活性の検討を行った。【方法】パラオ産の海綿 (*Callyspongia* sp. No. 319 及び *Lamellodysidea* sp. No. 321) からフェノール性臭素化合物を抽出した (sp-319 抽出物及び sp-321 抽出物)。また、海藻由来成分 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromobiphenyl (2,2'-diOH-BB80) 及び 2,2'-dimethoxy-3,3',5,5'-tetrabromobiphenyl (2,2'-diMeO-BB80) を合成した。これら化合物の最少生育阻止濃度を腸球菌 JCM5803, 黄色ブドウ球菌 209P 及び JCM8702 を用いて測定した。【結果】sp-319 抽出物及び sp-321 抽出物, 2,2'-diOH-BB80 と 2,2'-diMeO-BB80, これに藻類から報告されている tetrabromocatechol (TeBC), tetrabromohydroquinone (TeBHQ), 及び TrCS の MIC を測定した。sp-321 抽出物は単一化合物ではないが、非常に強い抗菌活性を示した。一方で、過去の成分研究から、sp-319 抽出物にも sp-321 抽出物と類似した水酸化ポリ臭化ジフェニルエーテル誘導体が含まれることが分かっているが、sp-319 抽出物はほとんど抗菌活性を示さなかった。2,2'-diOH-BB80 と 2,2'-diMeO-BB80 はポリ臭化ビフェニルを共通構造として持っているが、フェノール基を持つ 2,2'-diOH-BB80 が強い抗菌活性を示したのに対し、メトキシ基の 2,2'-diMeO-BB80 は抗菌活性を示さなかった。TeBC と TeBHQ は構造異性体であるが、TeBC が抗菌活性を示した一方で TeBHQ は抗菌活性を示さなかった。

P2-163

国内の鶏肉検体におけるサルモネラ属菌の汚染実態と薬剤耐性について

○山本 詩織^{1,2}, 岡田 由美子², 山崎 栄樹², 上間 匡² (¹鎌倉女子大・家政・管理栄養, ²国衛研・食品衛生管理)

Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. in chicken meat in Japan

○Shiori Yamamoto^{1,2}, Yumiko Okada², Eiki Yamasaki², Masashi Uema²
(¹Dept. Nutr. Diet., Kamakura Women's Univ., ²Div. Biomedical Food Res., Nat. Inst. Health Sci.)

サルモネラ属菌は急性胃腸炎を呈する細菌性食中毒起因菌の一つであり、鶏肉や鶏卵が主な原因食品とされる。本菌は薬剤耐性を獲得しやすく、近年では多剤耐性化が問題視されており、その対策が必要とされている。そこで、本研究では国内の鶏肉及び内臓におけるサルモネラ属菌の汚染実態を明らかにすると共に、その分離株の薬剤耐性状況について調査したので報告する。

2019 年度から 2022 年度の間に食鳥処理場から入手した鶏と体 (首皮部位) 及び市販流通している鶏肉 (皮部位)・レバーの計 802 検体を供試検体とした。サルモネラ属菌の分離は、検体 25 g を緩衝ペプトン水で増菌培養後、クロモアガーサルモネラ寒天培地を用いて行った。得られた分離菌株は血清型を同定した後、薬剤感受性試験に供した。サルモネラ属菌は 802 検体中 261 検体 (32.5%) より検出され、計 280 菌株が得られた。分離菌株の血清型は、*Salmonella* Schwarzengrund が最も多く認められた。薬剤感受性試験の結果、薬剤耐性株が 230 株 (82.1%)、そのうち 27 株 (9.6%) が単剤耐性、203 株 (72.5%) が二剤以上に耐性を示した。薬剤別の耐性率では、テトラサイクリン (68.2%) への耐性率が最も高く、次いでカナマイシン (63.6%)、ストレプトマイシン (36.4%) であった。一方、臨床重要なニューキノロン系であるシプロフロキサシン耐性株が 2 株 (0.7%) 認められた。

以上より、国内で流通する鶏肉及び内臓におけるサルモネラ属菌の汚染状況が比較的高く、その多くが *S. Schwarzengrund* であることが分かった。また、分離菌株の大部分が多剤耐性を示したことから、今後食品由来サルモネラ属菌の薬剤耐性モニタリングの必要性が示唆された。

P2-164/FL4-30

マクロファージに感染する多剤耐性黄色ブドウ球菌に対する紅参ジンセンノシドの抗菌薬感受性増強作用

○三竿 菜摘¹, 篠原 明莉², Dendi Krisna Nugraha³, 中川 一路⁴, 堀口 安彦³, 岡 真優子^{1,2} (¹京都府大院・生命環境・食環境安全性, ²京都府大・農学食科・食環境安全性, ³大阪大・微研・分子細菌, ⁴京都大院・医・微生物感染症)

Red ginseng increases antibiotic sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

○Natsumi Misao¹, Akari Shinohara², Dendi Krisna Nugraha³, Ichiro Nakagawa⁴, Yasuhiko Horiguchi³, Mayuko Osada-Oka^{1,2} (¹Food Hyg. and Environ Health, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., ²Food Hyg. and Environ. Health, Fac. Agr. and Food Sci., Kyoto Pref. Univ., ³Dept. Mol. Bac., Res. Inst. for Microb. Dis., Osaka Univ., ⁴Dept. Microb., Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

国境を越えて拡散している多剤耐性菌の代表的な 6 菌種の 1 つにメチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が含まれる。MRSA は、最も耐性菌検出率が高い多剤耐性菌で、耐性化を起こさない新たな MRSA 薬の開発が課題である。我々は、高麗人参を蒸して乾燥した紅参の抽出エキス (RGE) が MRSA の抗菌薬に対する感受性を増強する作用を見出した。さらに、この活性物質は紅参に含まれるジンセンノシド Rg3 (Rg3) と同定した。そこで本研究では、マクロファージ (Mφ) に感染する MRSA に対する RGE の作用を検討し、その作用機序解明を試みた。ヒト THP-1 細胞由来 Mφ の培養液に multiplicity of infection が 0.1 で緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現 MRSA USA300 株を加えて 1 時間後、細胞外の細菌をすべて取り除いた。最小発育阻止濃度 (MIC) の 1/4 濃度の gentamicin (Gm) と RGE (100 μg/mL) または Rg3 (10 μg/mL) を含む培地で 0-16 時間培養後、Mφ 内の GFP 強度および細菌のコロニー数を測定した。16 時間培養後に Gm 単独は GFP 強度およびコロニー数を増大したが、Gm と RGE または Rg3 はこれらを抑制した。RGE が二成分制御系因子の *saeS/R* および *agrC/A* の遺伝子発現を抑制したこと、RGE の抗菌薬感受性増強作用におけるこれらの関与を検討した。USA300 株由来 *agrC* 遺伝子欠損株では野生株と同様に kanamycin (Km) および Gm の MIC は RGE により低下した。一方で、*saeS* 遺伝子欠損株では野生株と比較し、RGE による Km および Gm の MIC の低下が抑制された。以上の結果から、Mφ に感染する MRSA に対して Rg3 は抗菌薬のアジュバント作用を有しており、この作用には *SaeS/R* の関与が示唆された。

P2-165

Cas13a-loaded Capsids Restore Drug Susceptibility in Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

○川口 智史¹, 渡邊 真弥¹, 劉 怡¹, 氣 駕 恒太郎^{1,2}, XinEe Tan¹, 崔 龍洙¹ (¹自治医科大・医・細菌学, ²感染研・治療薬・ワクチン開発研究センター)

○Tomofumi Kawaguchi¹, Shinya Watanabe¹, Yi Liu¹, Kotaro Kiga^{1,2}, XinEe Tan¹, Longzhu Cui¹ (¹Div. Bacteriol, Sch. Med., Jichi Med. Univ., ²Drug and Vaccine Development, NIID)

In this study, we constructed antimicrobial capsids (AB-Capsids), bacteriophages-derived capsids engineered to carry the CRISPR-Cas13a system targeting the carbapenem gene *bla_{IMP-1}* and evaluated their therapeutic efficacy against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. To construct the *cas13a*-loading phagemids, a codon-optimized *cas13aPA* for *P. aeruginosa* was assembled into a phagemid carrying the packaging initiation site (*pac* site) required for capsid packaging. These phagemids were transformed into a host *P. aeruginosa* strain containing an integrated phage genome with a deleted *pac* site. Phage capsid induction was triggered by mitomycin C exposure, allowing the packaging of *cas13a*-loading phagemids into capsids, resulting in AB-Capsid production. AB-Capsids successfully inhibited the growth of *bla_{IMP-1}*-expressing *P. aeruginosa*. Additionally, imipenem susceptibility was restored when of AB-Capsids were used in combination with beta-lactam antibiotic imipenem. This gene-specific approach offers a promising strategy to reverse antibiotic resistance, enhance the efficacy of existing antibiotics, and address the global AMR challenge.

P2-166

Screening of plant extracts inhibiting biofilm formation in *Staphylococcus aureus*

○天谷 杏奈, 竹入 雅敏, 新井 啓子, 木村 吉秀 (株式会社アイビー化粧品)

○Anna Amagai, Masatoshi Takeiri, Keiko Arai, Yoshihide Kimura (IVY Cosme. Corp.)

皮膚細菌叢は、免疫の制御等を介して皮膚の恒常性を維持している。皮膚細菌叢の乱れは、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患、荒れ肌やニキビ等の肌症の原因となる。皮膚細菌叢を構成する細菌の一つである黄色ブドウ球菌は、過剰に増殖することでアトピー性皮膚炎の増悪や創部感染の原因となる。黄色ブドウ球菌は、菌体外マトリクスを分泌することでバイオフィームを形成する特徴を持つ。バイオフィームは菌叢由来の皮膚バリアとして重要である一方、不適切な形成は、薬物抵抗性や免疫機能の阻害を介し、上記疾患及び肌症の増悪に加え、治療・改善をさらに困難とする。また、アトピー性皮膚炎の重症度と黄色ブドウ球菌のバイオフィームの形成量に高い相関性があることや、アトピー性皮膚炎の患部から単離した黄色ブドウ球菌はバイオフィームの形成能が高いことも報告されている。本研究では、黄色ブドウ球菌の過剰なバイオフィーム形成を阻害する植物抽出物の同定を目指し研究を行った。クリスタルバイオレット染色法によって、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成阻害を行う植物抽出物のスクリーニングを行った結果、バイオフィーム形成阻害を行う複数の植物抽出物を同定した。同定した植物抽出物の皮膚細菌叢に対する効果を検証するに当たり、額と頬の皮膚細菌叢解析を行い、*Propionibacterium acnes* や *Staphylococcus* 属や *Corynebacterium* 属の存在比率が大きいことを確認した。現在、当該細菌に対する植物抽出物の効果性を検証中である。

P2-167

抗グラム陰性桿菌抗菌酵素 27DS の基礎的検討

○内山 伊代, 内山 淳平, 横田 憲治, 松下 治 (岡山大)

Study on antimicrobial enzyme 27DS against gram negative bacilli

○Iyo Uchiyama, Jumpei Uchiyama, Kenji Yokota, Osamu Matsushita (Okayama Univ.)

【背景と目的】多剤耐性緑膿菌による感染症は治療が極めて困難となるため、新規の治療薬開発が急務である。抗菌酵素は、ペプチドグリカン分解酵素であり、迅速な対応が必要とされる多剤耐性菌感染症の治療薬として期待されている。しかしながら、抗菌酵素には、外膜がある緑膿菌を殺菌できないという技術的課題があった。我々は、データサイエンスを用いて緑膿菌を殺菌可能な抗菌酵素 27DS を創出した (特願 2023-108915; PCT/JP2024/23622)。本研究では、抗菌酵素創薬に向けて 27DS の基礎的な抗菌活性を解析した。【方法と材料】臨床分離株を供試した。抗菌スペクトルの測定は濁度変化、生菌数を測定した。抗生物質との併用効果はチェッカーボード法で検討した。微量液体希釈法を用いて耐性菌出現頻度を検討した。【結果と考察】「27DS」の抗菌スペクトルの測定を行った。その結果、多剤耐性株を含む緑膿菌臨床分離株、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌、アシネトバクター菌へ抗菌活性を示した。一方、腸球菌、黄色ブドウ球菌に対しては抗菌活性を示さなかった。加えて、同様の試験を外膜透過剤である EDTA 存在下で試験したところ、上記のグラム陰性菌に対して著しく高い抗菌活性が得られた。次に、抗生物質との併用効果を検討した。その結果、レボフロキサシン、コリスチン、トブラマイシンが相加効果を示した。最後に、耐性菌出現頻度を検討したところ、60 回の 27DS 暴露でも耐性菌は出現しなかった。今後も抗菌薬シーズとしての 27DS の改良と解析を継続する。

P2-168

ペプチドのアミノ酸の種類が細菌細胞膜や抗菌性に与える影響

○廣澤 賢太郎, 本田 みちよ (明大院・理工研・応用化学)

Effect of amino acid type of peptides on bacterial cell membranes and antimicrobial activity

○Kentaro Hirose, Michiyo Honda (Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech., Meiji Univ.)

薬剤耐性菌への新規アプローチとして抗菌ペプチド (AMP) の利用に注目が集まっている。まず, AMP は負電荷を有する細菌の細胞膜と静電的な相互作用を行う。その後, 直接的に膜を損傷したり, 膜透過後に種々の細胞内標的へ作用し, 主要な細胞プロセスを阻害したりすることにより抗菌性を発現する。これら作用の寄与の大きさは AMP の種類や濃度に依存しており, 本研究では AMP を構成するアミノ酸の種類に注目した。そこで, 異なるアミノ酸からなるペプチドの膜に対する作用と抗菌性発現の関係を調査することを目的とした。本研究では正電荷を有するポリペプチドであるポリアルギニン (PA) とポリリジン (PL) を用いて, グラム陽性菌 (*S. aureus*, *E. faecalis*), グラム陰性菌 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) を対象とした。全ての菌に対しても, 二つのペプチドは抗菌性を発現したが, 最小発育阻止濃度 (MIC) は PL の方が低く, 高い抗菌性を示した。この時, ペプチド処理による膜損傷菌数は時間・濃度依存的に増加したが, PL の方が強い膜損傷を引き起こすことが分かった。さらに, 全ての細菌に対しても処理時における DNA 漏出量は PL の方が多く, その量は時間経過によって増加し, 菌種による違いが認められた。このように, AMP を構成するアミノ酸によって膜に対する作用に差が生じ, 抗菌性に変化が現れた。また, 処理時の挙動の傾向はグラム陽性菌・陰性菌内においても違いが生じており, 細胞膜の組成やストレス応答との関連が示唆される。AMP の特性の差の一因には側鎖の構造による立体障害が挙げられ, これらの知見によって細菌細胞膜を作用標的とした効率的な AMP の設計が可能となる。

P2-169/FL3-30

Isolation of hexavalent chromium-reducing *Staphylococcus sciuri* 3W100 strain from tannery effluent

○Tanjina Afrin Hira^{1,2}, Samiul Alam Rajib^{2,3}, Mahia Ferdushi² (¹Dept. Microbiology, Sch. Medicine, Shimane Univ., Japan, ²Dept. Pharmacy, BRAC Univ., Dhaka, Bangladesh, ³Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto Univ.)

Purpose: Hexavalent chromium is a highly toxic metal, and its concentration in nature is increasing enormously. This study aimed to identify a bacterial strain capable of reducing hexavalent chromium to the neutral trivalent chromium. **Methods:** A water sample was collected from the Buriganga river in Dhaka, Bangladesh near the Hazaribag tannery industry area, and the isolated strain was named 3W100. 3W100 was exposed to chromium (VI) to measure its ability of conversion to chromium (III). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test was done to evaluate chromium resistance. 3W100's genome was sequenced, and a phylogenetic tree was constructed to determine its classification. **Results:** 3W100 showed chromium-reducing activity and the optimized condition was 37°C and pH 5.5. 3W100 tolerated chromium concentrations up to 5 mM, as confirmed by MIC. Phylogenetic analysis identified 3W100 as closely related to *Staphylococcus sciuri*. **Discussion:** 3W100 shows promising capacity in reducing toxic Chromium (VI) from contaminated environments.

P2-170

Effectiveness of extraoral suction in controlling aerosol dispersion in dentistry

○齋藤 真規¹, 小嶋 康世², 鈴木 到³, 庫川 幸利⁴, 今村 亮哉², 内山 敏一⁴, 泉福 英信¹ (¹日大・松戸歯・感染免疫, ²日大・院・松戸歯, ³日大・松戸歯・衛生, ⁴日大・松戸歯・保存修復)

○Masanori Saito¹, Yasutoshi Ojima², Itaru Suzuki³, Yukitoshi Kurakawa⁴, Ryoya Imamura², Toshikazu Uchiyama⁴, Hidenobu Senpuku¹ (¹Dept. Microbiol. Immunol., Sch. Dent. Matsudo, Nihon Univ., ²Dent. Matsudo, Nihon Univ. Grad. Sch., ³Dept. Community Oral Health., Sch. Dent. Matsudo, Nihon Univ., ⁴Dept. Oper. Dent., Sch. Dent. Matsudo, Nihon Univ.)

The dental clinic environment poses unique challenges due to the generation of aerosols, which carry various infection risks. Therefore, implementing effective aerosol countermeasures is crucial. To evaluate the effectiveness of extraoral suction in reducing aerosol dispersion, a simulated dental procedure was performed on a carious lesion located on the labial surface of the maxillary anterior teeth. During the procedure, the subject was positioned horizontally on the dental chair, while the dentist operated from the 12 o'clock position without the assistance of a vacuum assistant. BHI and R2A agar plates were placed around the subject to monitor aerosol spread. Additionally, BHI agar was attached to the dentist's mask using double-sided tape. The lids of the agar plates were opened at the start of the 10-minute simulated treatment and promptly closed upon its completion. Afterward, the BHI plates were incubated in 5% CO₂, and the R2A plates were incubated aerobically at 37°C for 48 hours. The CFUs on each plate were then counted. The highest CFU count was observed on the subject's chest, followed by the floor on their left side. The use of extraoral suction significantly reduced CFU counts across all test locations. These findings indicate that extraoral suction is highly effective in limiting the spread of aerosols during dental procedures.

P2-171/FL3-31

Engineering Bacteriophages for Enhanced Intracellular Delivery Against *Mycobacterium tuberculosis*

○島守 祐月, 渡邊 真弥, Orawee Kaewprasert, Sharmin Sultana, 齋藤 明美, Srivani Veerananarayanan, 宮永 一彦, 相羽 由詞, XinEe Tan, 崔 龍洙 (自治医大・医・感染免疫・細菌学)

○Yuzuki Shimamori, Shinya Watanabe, Orawee Kaewprasert, Sharmin Sultana, Akemi Saito, Srivani Veerananarayanan, Kazuhiko Miyanaaga, Yoshifumi Aiba, XinEe Tan, Longzhu Cui (Div. Bacteriology, Dept. Infection and Immunity, Jichi Med. Univ.)

The rapid spread of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) has significantly compromised the effectiveness of traditional anti-tuberculosis treatments, posing a major global public health threat. As a result, the developing new, effective, and safe treatments for tuberculosis has become a critical international priority. In response to these challenges, bacteriophage-based therapy (phage therapy) has gained attention as a promising approach for treating drug-resistant bacterial infections, with several clinical trials underway worldwide. However, the intracellular survival of *M. tuberculosis* within host cells presents a significant barrier to phages to effectiveness, as phages struggle to reach and infect these bacteria. To overcome this problem, we developed engineered mycobacteriophages using TM4 phage as a model. The modification involved inserting peptides into the phage capsid, which significantly enhancing the ability of the modified TM4 phage to be delivered into host cells, compared to the wild-type phage. This study aims to apply this technology to develop novel phage-based therapies for tuberculosis.

P2-172

抗がん剤誘発神経障害性疼痛モデルに対する A1, A2 型ボツリヌス毒素の効果

○鳥居 恭司¹, 平田 彩祐望¹, 鶴巻 知奈¹, 幸田 知子² (¹東京農業大学・農・動物, ²大阪公立大・獣医)

Comparison of analgesic effect between botulinum toxin A1 and A2 on neuropathic pain

○Yasushi Torii¹, Sayumi Hirata¹, China Tsurumaki¹, Tomoko Kohda² (¹Dept. Animal Sci., Tokyo Univ. of Agriculture, ²Grad. Sch., Osaka Metropolitan Univ.)

【目的】近年、日本では高齢化に伴いがん患者数が増加しており、抗がん剤を用いた治療が行われている。大腸がん治療においてオキサリプラチン (L-OHP) は中心的な薬剤として用いられている。しかし、L-OHP は多くの有害事象が報告されており、特に末梢神経障害が重篤な事象となっている。末梢神経障害は異痛症や痛覚過敏といった症状が発症し、軽い接触でも非常に強い痛みを感じるようになる。近年の研究により、難治性神経疼痛に対してボツリヌス毒素の有効性が認められるようになってきた。本研究では、A1 型および A2 型ボツリヌス毒素の有効性について評価した。

【方法】マウスに L-OHP を 0.4μg×8 回腹腔内投与することにより、抗がん剤誘発神経障害性疼痛モデルを作製した。毒素投与群はマウスの足裏に A1 型および A2 型毒素をそれぞれ 0.15, 0.3 および 0.6U を投与した。L-OHP 投与前、毒素投与後 1~25 日に von frey test で評価を行った。

【結果・考察】A1, A2 型毒素投与群はともに毒素を投与しなかったマウスと比較して経時的に回復が認められ、両毒素ともに L-OHP による末梢神経障害の疼痛に有効であることが示唆された。

P2-174

Investigation of gene expression levels to pH changes in *Tannerella forsythia*

○桑原 紀子¹, 齋藤 真規², 田中 陽子³, 田口 千恵子⁴, 矢口 学⁵, 野村 宇捻⁵, 竹内 麗理¹, 平塚 浩一¹ (¹日大・松戸歯・生化学・分子生物学, ²日大・松戸歯・感染免疫学, ³日大・松戸歯・有病者歯科検査医学, ⁴日大・松戸歯・衛生学, ⁵日大・松戸歯・障害者歯科学)

○Noriko Shinozaki-Kuwahara¹, Masanori Saito², Yoko Tanaka³, Chieko Taguchi⁴, Manabu Yaguchi⁵, Takatoshi Nomura⁵, Reiri Takeuchi¹, Koichi Hiratsuka¹ (¹Dept. Biochem. Mol. Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ²Dept. Microbiol. Immunol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ³Dept. Lab. Med. Dent. Compromised Patient, Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ⁴Dept. Community Oral Health., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ⁵Dept. Special Needs Dent., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

It would be known that the various conditions of the oral cavity are constantly changing. In these, it has been reported that pH changes in the gingival sulcus are related to progression of periodontitis. In this study, we comprehensively searched for gene expressions which were responded to pH changes in a periodontal pathogen, *Tannerella forsythia*.

Method: *T. forsythia* JCM 10827^T was used in this study. *T. forsythia* was cultured, collected, and suspended in buffers adjusted to pH7.5 and pH5.0 at 37°C for 30 min. Total RNA was extracted from bacterial cells and then mRNA was purified. Gene expression levels were examined using microarray. Gene expression levels changed more than two-fold compared to the control were examined.

Results: When pH7.5 was used as control, 515 genes showed more than two-fold in expression at pH5.0, with 103 genes increasing and 412 genes decreasing. Search for genes encoding the virulence factors of proteases, PrtH and PrtG, were not changed gene expression levels in this condition. In this study, TonB-related genes were noticed. TonB is a component protein of Ton complex that functions to deliver energy to the outer membrane. It would be suggested that an acidic environment in the gingival sulcus affects the metabolism of the *T. forsythia*, which may affect its virulence.

P2-173

Isolation and Characterization of a Broad-Host-Range Temperate Phage Infecting *Staphylococcus aureus*

○XinEe Tan, Feng-Yu Li, 氣賀 恒太朗, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 宮永 一彦, Srivani Veerananarayanan, 崔 龍洙 (自治医大・医・感染免疫)

○XinEe Tan, Feng-Yu Li, Kotaro Kiga, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kazuhiko Miyana, Srivani Veerananarayanan, Longzhu Cui (Div. Bacteriol., Dept. Infect. Immun., Sch. Med., Jichi Med. Univ.)

The growing prevalence of antimicrobial resistance (AMR) poses a critical global health threat, undermining the effective treatment of infectious diseases. With renewed interest in phage therapy as a potential alternative to combat AMR, the discovery of novel phages is of importance to expand the pool of viable therapeutic candidates. Here, we reported the isolation of a lysogenic staphylococcal phage, vB_SaS-JC18T2, which exhibits lytic activity against a broad range of *S. aureus* strains, achieving a lysis rate of 99.6% (523/525). Phage vB_SaS-JC18T2 exhibits stability across temperatures from 4°C to 37°C, tolerance to pH 3-10, and is resilience to organic solvents. It is characterized by a short latency period (15 min) and a modest burst size (37 particles per bacterium), coupled with high adsorption efficiency. It carries a 42,451 bp double-stranded genome arranged in mosaic structure, encoding 72 putative open reading frames that are categorized into four functional modules: DNA replication/recombination/metabolism, structure/morphogenesis, DNA packaging, and host lysis. This study indicates that phage vB_SaS-JC18T2 holds significant potential in clinical application, given its ability to infect a wide range of *S. aureus* strains. Additionally, insights into its genomic characteristics could contribute to the engineering of this phage into a potent therapeutic agent.

LS1

PET ボトル飲料向けアセプ充填システムへの EB 滅菌技術の活用事例と今後の展望

○西 富久雄（澁谷工業株式会社 開発本部EB技術部）

Application of EB Sterilization Technology to Aseptic Filling System for PET Bottled Beverages and Future Prospects

○Tokuo Nishi (Shibuya Corporation)

電子線を利用した殺菌技術は 50 年以上の歴史があり医薬・医療器具などの資材滅菌などに広く利用されてきた。本日は、PET 飲料の生産ラインである無菌充填システムへの EB 滅菌技術の活用事例をご紹介します。PET 飲料の生産ラインで使用するシステムのため、滅菌性能はもとより、製品品質や安全性など必要な項目に対して十分な評価・検証を経て実用化したものである。また高い生産能力で長時間連続生産するため、製品品質に対する安全性・信頼性と同時に、機械システムとしての安定性、耐久性も必要となる。初号機の生産開始から 14 年以上が経過し、納入実績累計としては 13 ラインを越え、それらが順調に稼働していることを踏まえると、EB 滅菌技術の信頼性と実ラインでの耐久性が実証できたと考える。

今後、少子高齢化や人口減少に伴い国内市場の縮小が予想され、海外展開が必要となる。そのための EB 方式での FDA 認証に向けた金沢大学藤永研究室での試験事例もご紹介する。また近年の市場ニーズはカーボンニュートラル等の環境への配慮が求められ、それに対応したサステナブルなシステムをつくる重要性が高くなってきている。EB 方式は、滅菌後の水リンスが不要で、効率がよく、そのニーズに適していると言える。しかし PET 飲料製品の生産設備としては、製品の製造コストが重要な要素となっており、EB 方式ではイニシャルコストが課題である。そのためランニング、メンテナンスコストも含めたコスト削減に取り組んでいる。

最後に試験に際し多大なご協力いただいた藤永教授ならび研究室の皆様 に心より感謝申し上げます。

LS2

微生物検査としての臨床メタゲノム解析の現状と課題

○堀場 千尋（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）

The Challenges of Clinical Metagenomic Analysis in Microbiological Diagnosis

○Kazuhiro Horiba (Laboratory of Bacterial Genomics, Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases)

次世代シーケンシング技術（NGS: next-generation sequencing）は、医学領域に大きな影響を与えており、感染症分野においても、微生物のゲノム解析への利用のみならず、免疫応答を解明するための遺伝子発現解析、microbiota/microbiome の構成を明らかにするメタゲノム解析、集団感染に対する分子疫学的解析など、幅広い用途で活用されている。

近年、微生物検査としての臨床メタゲノム解析（clinical metagenomic NGS: mNGS）が注目されている。これは、感染症患者の臨床検体に対してメタゲノム解析を行い、原因微生物を特定しようとする試みである。米国やヨーロッパでは、すでに商業ベースの検査法として導入が進んでおり、日本においても今後、臨床現場への導入が期待される。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行に伴い、医療機関や各種検査機関では NGS を含む核酸検査法に対する理解が進み、mNGS の受容に向けた技術的な体制は整いつつある。一方で、mNGS を微生物検査として実用化するためには、臨床検体の処理、データ解析手法、データの解釈などについて十分な理解が求められる。本発表では、mNGS の現状と臨床応用に向けた課題について、自験例を交えながら共有する。

LS3

腸内マイクロバイームと細菌感染症：食事-腸内細菌が細菌感染病態に与える影響

○金 倫基（北里大学薬学部 微生物学教室）

Gut microbiome and bacterial infection: The impact of diet and gut bacteria on the pathogenesis of bacterial infection

○Yun-Gi Kim (Department of Microbiology, School of Pharmacy, Kitasato University)

正常な腸内細菌叢は、外来の病原性細菌が生体内に侵入・定着するのを防ぐ。この作用は、コロナイゼーションレジスタンス（Colonization Resistance; CR）と呼ばれている。抗菌薬の投与などにより、腸内細菌叢の構成異常（ディスバイオーシス）が起こると、CR が低下し、腸管病原性大腸菌や *Salmonella* などの病原細菌（Pathogens）、および *Clostridioides difficile* などの病原性常在細菌（Pathobionts）の定着や増殖を許してしまう。そのため、腸内細菌叢による CR は、細菌感染症の発症や病態に深く関わっている。私たちは、腸内細菌叢の主要構成メンバーである *Clostridium* cluster IV & XIVa に属する腸内細菌が、*Salmonella* などの腸管病原細菌に対して強い CR を発揮することを明らかにした。さらに、これらのクラスターに属する複数種の腸内細菌コンソーシアムが、*C. difficile* 感染（*C. difficile* infection; CDI）のマウスモデルにおいて生存率を大きく向上させ、再発性 CDI 患者にも効果を示すことが確認されている。また、食事成分は感染症の病態に影響を与える重要な因子であると同時に、腸内細菌叢の構成や代謝にも変化をもたらす。実際に、摂取する食事成分の違いが腸内細菌叢を介して CR に影響を与え、*C. difficile* などの腸管病原細菌の定着や感染病態を変化させることを示してきた。そこで本講演では、腸内細菌による CR に関するこれまでの研究成果についてお話ししたい。

LS4

ペットの健康データを活用した健康寿命延伸への取り組み

○小森 伸昭（アニコム ホールディングス株式会社）

Approaches to Extending Healthy Lifespan through Pet Health Data Utilization

○Nobuaki Komori (Anicom Holdings, Inc.)

【要旨】当社グループは、ペット保険契約件数 100 万件超・保険金支払件数年間 400 万件超の日本最大の保険・医療データを有している。ペットは大規模介入試験モデルに適していると考えられることから、これらのデータを活用した、がんをはじめとする疾患発症メカニズムの解明の推進は、獣医療だけでなく、ヒト医療にも貢献する可能性がある。

【研究の概要】当社グループの調査では、犬の腸内および口腔内環境が、がんを含めたほぼ全ての疾患の有病率に関与していることが明らかになった。免疫のパロメーターの一つが腸内環境である。当社グループの調査を通じて、犬において腸内細菌叢の多様性が低下するほど疾患の有病率が上昇することを確認した。これは、免疫力の評価指標としての可能性を示すとともに、免疫機能の数値化に成功したと考える。さらに、「歯周病は万病のもと」という概念が広く認識されているが、そのメカニズムは完全には解明されていない。当社グループの調査では、犬の腸内細菌叢を調べた結果、12%の犬の腸内から 1 種類以上の歯周病関連菌が検出された。腸内に入り込んだ歯周病関連菌等が炎症を惹起し、消化管の細胞を障害することによってリーキーガットを生じさせ、血中に腸内細菌等が入り込むことで他の臓器を障害している可能性が考えられる。免疫の数値化を通じた免疫そのものへの理解を深めることや口腔内環境の改善が疾患発症リスクの低減につながる可能性を示唆している。

【結論】これからの医療は「予防」がますます重要になると考える。口腔内・腸内環境とがんをはじめとする疾患発症の関連性を明らかにすることで、病気の原因を可視化し、ヒト医療および獣医療における予防医学の発展を目指している。

LS5

高齢者における肺炎球菌感染症と予防ワクチンの現況

○大石 智洋（川崎医科大学臨床感染症学）

The current trend in pneumococcal infections and pneumococcal vaccine among elderly people

○Tomohiro Oishi (Department of Clinical Infectious Diseases, Kawasaki Medical School)

肺炎球菌は文字通り主に肺炎を起こす病原体であるが、特に高齢者において、肺炎のみならず、血液や髄液など無菌部位にも感染し菌血症や髄膜炎を起こす侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）を起こすこともあり、致死的な経過を取ることも少なくない。

そこで、高齢者に対しては、肺炎球菌ワクチンが開発され、2014年より定期接種（B類疾病）が導入された。肺炎球菌における23種類の血清型に対する効果が期待できる23価肺炎球菌ポリリカライドワクチン（PPSV23）の他、小児では7種類の血清型への効果が期待できる沈降7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）が開発され、その後小児で問題となるIPD（髄膜炎や菌血症）が著明に減少した。

しかしながら一方で、これらのワクチンに含まれない肺炎球菌に対する血清型（非ワクチン血清型）によるIPDが相対的に増加し、非ワクチン血清型に対する対応が課題となる中で、肺炎球菌結合型ワクチンの価数が13価に増加された沈降13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）が2014年に承認され（小児は2013年に承認）た。

しかし、さらにPCV13に含まれない血清型に対するIPDも次第に増加した。

このような状況下で、2023年に沈降15価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV15）、2024年に沈降20価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV20）が発売された。

新たなワクチンが発売になり期待される一方で、高齢者における肺炎球菌ワクチンの接種率は伸び悩んでおり、こちらも課題といえる。

本講演では、これらの状況や課題について、さらに踏み込んで概説する。

LS6

細菌学の歴史～プロバイオティクスの歴史を含めて

○神谷 茂^{1,2}（¹杏林大学、²ミヤリサン製薬（株））

History of bacteriology - including history of probiotics

○Shigeru Kamiya^{1,2}（¹Kyorin University、²Miyarisan Pharmaceutical Company）

医聖 Hippocrates（BC 460-377）の時代、地震、洪水時に疫病が多発するのは、空気が汚されて不良となることが原因であり、この不良な空気はミヤズマ（miasma）と呼ばれた。19世紀までこのミヤズマ説が信じられていた。16世紀、イタリアの Girolamo Fracastoro（1478-1553）はコンタギオン（伝染）とコンタギオン病（伝染病）を提唱したが、伝染を介在する微生物の存在は考えられなかった。オランダの Antonie van Leeuwenhoek（1632-1723）は自作の顕微鏡を用いて1683年、歯垢中の口腔内細菌を初めて観察し、そのスケッチを英国の Philosophical Transactions of The Royal Society に letter として投稿した。その優れた研究成果から彼は原虫学・細菌学の父（The father of Protozoology and Bacteriology）とよばれている。しかし、観察された極微動物 animalcules は非生命体の物質より発生するとされた（ミヤズマ説に基づく自然発生説）。

細菌学の魁はフランスの Louis Pasteur（1822-1895）によって1861年に白鳥の首フラスコを用いて肉汁の腐敗の自然発生説を否定したことに求められる。Pasteur はその他、低温殺菌法、狂犬病ワクチン・炭疽菌ワクチンなどの開発を行った。その後、ドイツの Heinrich Hermann Robert Koch（1843-1910）は結核の原因が結核菌の感染であることを示すとともに、コレラ菌の発見、固形培地の開発、感染に関するコッホの原則の提唱などの重要な研究業績を残した。その他、Ignaz Philipp Semmelweis（1818-1865）、Joseph Lister（1827-1912）、Theodor Escherich（1857-1911）などの研究業績を紹介する。加えて北里柴三郎（1852-1931）、志賀 潔（1871-1957）、秦 佐八郎（1873-1938）、野口英世（1876-1928）などの日本人細菌学者の業績を紹介する。

現在、Probiotics は「十分な量が投与された場合、宿主に健康上の利益をもたらす生きた微生物」と定義されているが、当初、絨毛虫増殖促進物質、感染防止物質、腫瘍細胞増殖抑制物質などが probiotics とよばれた。Probiotics の歴史とともに Victor Babes（1854-1926）、Arnoldo Cantani（1837-1893）、Rudolph Emmerich（1856-1914）などが行った細菌間干渉作用に関する研究内容についても紹介する。