



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Study on multilocus sequence analysis of <i>Bacillus cereus</i> isolates from human blood culture to characterize epidemic strains(内容の要旨(Summary))
Author(s)	ZAHNG, Ji Wei
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第863号
Issue Date	2011-05-25
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/42914

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本籍)	張 繼 偉 (中国)
学位の種類	博士 (再生医科学)
学位授与番号	甲第 863 号
学位授与日付	平成 23 年 5 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Study on multilocus sequence analysis of <i>Bacillus cereus</i> isolates from human blood culture to characterize epidemic strains
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 塚 田 敬 義 准教授 竹 村 元 三

論文内容の要旨

Bacillus cereus グループは *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* および *B. weihenstephanensis* の 6 つの種を含み, 人に病気を起こす菌は *B. cereus* と *B. anthracis* の 2 菌種と認識されてきた。一般細菌は 16S rRNA 遺伝子配列で系統的に分類・識別されているが, *Bacillus cereus* グループ内の菌種は同じ 16S rDNA 配列を保有し, この配列情報だけでは鑑別できない。近年, *B. cereus* 菌による感染症患者のなかに重症肺炎や全身感染をおこし死亡する事例があることが報告されている。本研究では *B. cereus* と同定される株の中に高度病原性株が存在すると推測し, 全ゲノム解析情報から多数の候補遺伝子を選択し, 血液培養から分離された *B. cereus* 株と病院環境から分離された株の多型解析を行い, 重症化した症例から分離された *B. cereus* 株に共通な特性の解析を行った。

【対象と方法】

B. cereus, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* および *B. weihenstephanensis* の 6 つの種の基準株および野生株を収集した。また岐阜大学附属病院と自治医科大学附属病院で人の血液培養から分離された 52 株を収集し, 配列の解析を行った。この *Bacillus cereus* グループで最も病原性が高い *B. anthracis* の 20 株のゲノム DNA は帯広畜産大学から収集し, 病原因子の比較に使用した。*B. cereus* で全ゲノム配列解析株の解析から多型情報として有効と判断した遺伝子 (*gIpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, and *tpi*) を選択し, これらの菌株の 16S rRNA 遺伝子と研究室で蓄積した *dnaJ* 多型遺伝子データベースを使い, 多変量解析と系統解析を行った。*B. anthracis* の病原因子としては浮腫因子, 致死因子, カプセル, 防御因子, 機能不明の Ba813 因子を, *B. cereus* 菌では嘔吐因子, 溶血毒, 腸管毒の分布を解析し, 血液培養分離株の特徴を解析した。

【結果】

Bacillus cereus グループすべての株について 16S rRNA および *dnaJ* 遺伝子配列を決定し, 配列の多型を比較した。16S rRNA の類似度は 99.5% であり, 染色体上の複数の遺伝子コピーの多型配列の違いもあり, この情報でこのグループ内の菌種を特徴つけることはできなかった。16SrRNA が高度に類似していたのに対し, *dnaJ* の配列の多型は解析株では 8.5% の範囲に分布していた。この値は他の分類群の菌種内多型と比較して, 同一菌種内多型としては大きく, *B. cereus* は複数の菌種から構

成される種であると推測された。*dnaJ* 遺伝子配列のクラスター分析で 52 株の *B. cereus* 臨床株は大きく 4 グループに分類された。そのうち 6 株は 1 つのグループを構成し、いずれも重症感染を引き起こした患者から分離されていた。さらに *dnaJ* の系統解析でこの 6 株は *B. anthracis* と同一のグループに属していた。これらの 6 株の *B. cereus* は β -溶血陽性であり、形態的には典型的な *B. cereus* 菌の集落を作り、非溶血性の *B. anthracis* とは容易に識別できる特徴を保有していた。病原因子の検索では、浮腫因子、致死因子、カプセル、防御因子は陰性であったが、これらの 6 菌株のすべてが *B. anthracis* に特有とされるシグナルペプチド Ba813 を保有していた。7 種類の遺伝子を使った MultiLocus Sequence Typing (MLST) 解析でもこれら *B. cereus* 6 株は *B. anthracis* と同じグループに帰属した。

【考察】

B. cereus 菌は院内感染症患者からしばしば分離されるが、嘔吐因子のような既存の食中毒の病原因子を保有しないことから、日和見病原体として考えられてきた。しかし、52 株の血液培養から分離された株の中で 11.5% (6 株) は系統的に炭疽菌と同じクラスターに分類され、炭疽菌のシグナルペプチドとされる Ba813 因子を保有していた。この中には従来、昆虫の病原体で人に対する病原性はないと考えられていた *B. thuringiensis* 株 1 株も含まれていた。この株も Ba813 を保有しており、重症肺炎患者から分離されていた。岐阜大学分離株はほぼ一年にわたり散発的に感染を起こした株であるが、自治医科大学分離株は短期間に院内感染を起こし、半数の患者が死亡している。Ba813 ペプチドを保有する *B. cereus* は形態的には β 溶血し、環境常在性の *B. cereus* と同じ形態的特徴を有しているため、遺伝子解析を実施しない現状の微生物検査体制では見逃されている。しかし、血液培養から分離される *B. cereus* の約 11.5% が危険な株であるとの認識を持ち、有効な遺伝子検査体制を構築することが望まれる。

論文審査の結果の要旨

申請者 張 継偉は血液から分離された *Bacillus cereus* グループの臨床分離株 52 株 (高病原性株 6 株を含む) をクラスター分類し、汎用される 16S ribosomal RNA 遺伝子のシーケンスで高病原性株の鑑別は困難であるが、*dnaJ* 遺伝子多型により同定が可能であることを明らかにした。さらにこれら 6 株は系統樹上 *B. anthracis* と同じクラスターに属し、類似したトキシン蛋白発現パターンを示すとともに、とくに Ba813 を共有することを明らかにした。これらの知見は従来、日和見病原体と見做されていた *B. cereus* 中に高病原性株が存在すること、現在の一般的臨床検査体系では鑑別困難であることを明らかにしたもので、微生物学、臨床微生物学の進歩に少なからず寄与するものと考えられる。

[主論文公表誌]

Jiwei Zhang, Pham van Hung, Masahiro Hayashi, Shigeru Yoshida, Kiyofumi Ohkusu, and Takayuki Ezaki: *DnaJ* sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*.

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease 70, 307-315 (2011)