

20100400/A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業(国際医学協力研究事業)

多様化・ボーダーレス化する細菌性下痢症を阻止するための  
フロンティア研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西淵 光昭

平成 23(2011)年 3月

# 目次

## 厚生労働科学研究費補助金

### 地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

#### 1. 平成 22 年度総括研究報告書

- 多様化・ボーダーレス化する細菌性下痢症を阻止するためのフロンティア研究・・・1  
代表研究者 西瀧 光昭 京都大学東南アジア研究所教授

#### 2. 平成 22 年度分担研究報告書

##### I. 疫学・生態学に関する研究成果

- (1) アジアで重要な食中毒原因細菌の生態および疫学に関する研究・・・23  
研究分担者 西瀧 光昭 京都大学東南アジア研究所教授
- (2) 日本とタイにおけるカンピロバクター関連細菌の疫学に関する研究・・・36  
研究分担者 山崎 伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授

##### II. 検査法に関する研究成果

- (1) 下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な遺伝子検査法の作成に関する研究・・・41  
研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学教授
- (2) 食品からの *Vibrio cholerae* 検出法に関する研究・・・46  
研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
- (3) サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析と迅速同定法の開発・・・53  
研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学 教授
- (4) EPEC および EHEC における LEE 関連 III 型分泌系のバリエーションの解明と  
タイピング等への応用・・・59  
研究分担者 林 哲也 宮崎大学 教授

##### III. 病原性メカニズムに関する研究成果

- (1) 赤痢菌の病原性遺伝子 Type III 分泌装置の発現調節機構の解析・・・68  
研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所・所長

(2) 腸管出血性大腸菌の AB サブユニット毒素の作用機構の解明と  
その阻止法の研究 . . . . . 75  
研究分担者 野田 公俊 千葉大学教授

(3) ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用に関する研究 . . . . . 80  
研究分担者 神谷 茂 杏林大学教授

(4) 鶏株、ヒト腸炎株、ヒト Guillan-Barre syndrome (GBS) 株に関する  
比較プロテオーム解析および比較ゲノム解析 -高運動性関連構造の解析- . . . 86  
研究分担者 山本 達男 新潟大学大学院教授

#### IV. 治療法に関する研究成果

(1) 腸炎ビブリオ 3 型分泌装置の発現制御機構の解明と予防・治療への応用 . . . 95  
研究分担者 飯田 哲也 大阪大学特任教授

(2) 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究 . . . . . 100  
研究分担者 藤井 潤 九州大学准教授

#### V. 予防法に関する研究成果

(1) 新規コレラワクチン開発に資する疑似腸管内環境培養下での毒素産生性コレラ菌の  
表層抗原性の変化に関する研究 . . . . . 111  
研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

(2) 毒素原性大腸菌における新規病原因子の探索及び粘膜ワクチンへの応用 . . . . 118  
研究分担者 辻 孝雄 藤田保険衛生大学教授

(3) カンピロバクター菌による食中毒の予防に関する研究 . . . . . 124  
研究分担者 三澤 尚明 宮崎大学教授

3. 研究発表一覧 . . . . . 130

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）  
多様化・ボーダーレス化する細菌性下痢症を阻止するためのフロンティア研究  
（H22-国医-指定-001）

平成 22 年度 総括研究報告書

代表研究者： 西淵光昭 京都大学東南アジア研究所教授

平成 23 年 3 月

研究要旨：

アジアで重要な腸管感染症原因細菌について、様々な専門分野のエキスパートが、感染症が多発する地域の最前線で現地の研究者とも協力して、多様化かつボーダーレス化する細菌性下痢症のそれぞれについて、現状と問題点を掌握し（疫学・生態学に関する研究）、環境・食品などの衛生規範の策定および輸入食品の安全性確保のために役立つ検査法の開発を行った（検査法に関する研究）。さらにこれらの感染症に対応できる最も効果的な治療法・予防法の確立に資する基礎研究（病原性メカニズムに関する研究）を実施しつつ、基礎から応用へ向かう研究（治療法に関する研究；予防法に関する研究）も展開した[フロンティア研究]。

分担研究者：

飯田 哲也：大阪大学微生物病研究所 特任教授	山崎 伸二：大阪府立大学大学院生命
江崎 孝行：岐阜大学教授	環境科学研究科教授
甲斐 明美：東京都健康安全研究セン ター部長	藤井 潤：九州大学大学院医学研究 院准教授
大澤 朗：神戸大学教授	山本 達男：新潟大学大学院教授
渡邊 治雄：国立感染症研究所所長	林 哲也：宮崎大学教授
野田 公俊：千葉大学大学院医学研究 院教授	神谷 茂：杏林大学教授
倉園 久生：帯広畜産大学教授	辻 孝雄：藤田保健衛生大学教授
	三澤尚明：宮崎大学農学部教授

## A. 研究目的：

アジアの熱帯地域の発展途上国では、細菌性下痢症は非常に重要な疾患である。特に子供の重要な死亡原因である。このような地域での細菌性下痢症は完全に地域に特異的なものではなく、原因菌や感染症の発生様式は常時変化している。これは、単なるグローバル化の影響による画一的な変化ではなく、ローカルな地域特有な変化とのせめぎ合いの結果としてもたらされるものである（グローカル化）。申請者らが報告した新型腸炎ビブリオによる感染症の世界的大流行は1996年頃アジアで発生し、まだ世界的に猛威を振るっている。また、先進国ではカンピロバクター下痢症が上位を占めるようになったが、途上国ではほとんど研究報告がなく、正確な状況が掌握できていない。興味あることに、先進国では腸管出血性大腸菌による感染症が多発しているが、途上国ではほとんど報告がない。一方、水系感染症によるアウトブレイクが深刻な問題となるコレラは多発地帯がベンガル湾沿岸からアフリカへシフトしてきている。

ほとんどの細菌性下痢症の原因菌の生息場所は、ヒト以外の自然環境（動物体を含む）である。それらは全地球規模で日々変化している。さらに細菌が感染する宿主（ヒト）は、社会・経済・文化活動等によって、自分を含めて細菌の分布する環境を様々な様式で人為的に変化させている（例えば、原始林の開発や新薬剤の使用など）。

細菌は、このような様々な環境の変化に対応して、急激に変化を遂げる【多様化】。特に現在、アジアの熱帯地域の発展途上国ではこのような変化が顕著である。このような地域では、国家の政策が行き届かず、衛生管理が不十分であるので下痢症が多発している。また検疫制度があまり機能しておらず、保菌者の国際的な移動（労働者の移動、旅行など）、汚染した食料品の輸出入などにもなって、細菌性下痢症原因菌の地理的移動が頻繁におこっている【ボーダーレス化】。このようにして変化する病原菌は従来とは違った速度・規模・様式で感染症を発生させ、それが伝播する可能性がある。したがって、アジアで重要な腸管感染症原因細菌について、様々な専門分野のエキスパートが、感染症が多発する地域の最前線で現地の研究者とも協力して、多様化かつボーダーレス化する細菌性下痢症のそれぞれについて、現状と問題点の掌握（疫学・生態学に関する研究）と環境・食品などの衛生規範の策定および輸入食品の安全性確保のために役立つ検査法の開発を目指した（検査法に関する研究）。さらにこれらの感染症に対応できる最も効果的な治療法・予防法の確立に資する基礎研究（病原性メカニズムに関する研究）を実施しつつ、基礎から応用へ向かう研究（治療法に関する研究；予防法に関する研究）も展開することを目標にした【フロンティア研究】。

## B. 研究方法：

それぞれの研究分担者がそれぞれの研究目的および内容に合致した成果を得るために専門性を生かして、(分子遺伝学、分子疫学、細胞化学、免疫学、環境生態学、生理学、病理学などの技術を適宜組み合わせ)あるいは研究協力者と役割を分担して、研究が遂行された。病原性細菌はそれぞれのセーフティーレベルに合致した実験施設で取り扱われ、菌の移動や分与は規則に従って行われた。動物実験は、動物に不要な苦痛を与えないように配慮し、それぞれの研究者の所属する機関の倫理規定を遵守した。人体に由来するサンプルを取り扱う場合は、所属機関の倫理委員会の承認を得て、規定に従って実験を実施した。組換えDNA実験を含む遺伝子解析は、指針に従って遂行した。

## C. 研究結果：

### 1) 疫学・生態学に関する研究成果

[感染症が多発する地域の最前線で現地の研究者とも協力して、多様化かつボーダーレス化する細菌性下痢症のそれぞれについて、現状と問題点を掌握]

(1)アジアで重要な食中毒原因細菌の生態および疫学に関する研究(研究分担者：西渕光昭)

アジアの多くの国々では、伝統的な食習慣が維持されているが、グローバル化により、生活や食事内容の一部が欧米化しつつある。これにともなって、

腸管感染症の発生状況や原因菌による食材の汚染状況が変化していることが予想されるが、これを詳細にモニターリングする制度を確立している国はないため、情報が乏しい。研究分担者らは、日本や米国で過去10年間に特に重視された腸管感染症原因菌4種類(腸炎ビブリオ、サルモネラ菌、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌O157)および感染症の発生率は低い致死率が高いため世界的に注目されているリステリア菌について、日本以外のアジア諸国の現地の研究者と共同研究を実施した。

腸炎ビブリオに関しては、東南アジアで腸炎ビブリオ感染症が多発するのは、フィルターフィーダーである二枚貝に汽水環境中の菌が濃縮されることおよび、これらの二枚貝を十分加熱しないで喫食する食文化が広く東南アジアおよび東アジアに広がっていることが原因であるという仮説を支持する結果が得られた。インドネシアでは魚介類を十分加熱して喫食するイスラム教徒が主流を占めるため535検体の下痢患者の臨床サンプルのうち、1検体からのみ腸炎ビブリオ病原性株が分離できた。一方、ドイモイ以後急速な経済成長を続け、二枚貝を含む魚介類の生産および国内消費と輸出が増加し続けており、二枚貝の調理法は、タイと同様に(下記)十分な加熱がなされているとは言えないベトナムの首都ハノイにおいて、2回の調査で、131検体と581検体の下痢患者のサンプルでは、それぞれ26%お

よび 9%の検体から腸炎ビブリオ（病原毒素遺伝子陽性）が分離された。

タイ南部ハジャイ市のプリンス・オブ・ソクラ大学とは 11 年間の共同研究において分離した 1895 株の臨床分離株の O:K 抗原型が多様化していることを明らかにし、代表株の 118 kb の O:K 抗原遺伝子領域を比較解析し、この領域内の 4 カ所に相同領域（9 kb ～ 35 kb）を共有し相同領域での組み換えを介して遺伝子群のカセットの入れ替えのようなメカニズムで O:K 血清型を変化させる可能性を指摘できた。さらにタイの分離株を含めて、15 年間にアジア諸国で分離されたパンデミック・クローンに属する 2116 菌株をアジアの国別地図に分離年情報も含めてマッピング・解析したところパンデミック・クローンの出現と O3:K6 型から他の血清型が派生しつつ国境を越えて伝播した様式に関する仮説が提唱できた。この伝播の様子とハイガイ（アカガイに似る二枚貝で死ぬときに赤い血液状の液体を流出することから bloody clam と呼ばれる。*Anadara granosa*）の貿易ルートに共通点が見いだされた。ハイガイをあまり加熱しないで喫食する食習慣は中華系住民を中心として強精剤的作用を持つと信じられているからであることも、各地での聞き取り調査の結果確認できた。感染予防策の検討に役立つかも知れない。

タイ南部で市販牛肉から分離されたかなりの大腸菌 **O157:H7** (*stx<sub>2</sub><sup>+</sup>*, *eae<sup>+</sup>*) については、DNA フィンガープリ

ント比較解析の結果、マレーシアからタイへの輸入牛肉を介して持ち込まれたという説を支持する結果が得られた。

サルモネラ菌、カンピロバクター、リステリア菌については、マレーシアとの共同研究により、菌を定量的に検出できる MPN-PCR 法を確立し、現地で食品を解析したところ、特に食品の生産現場や市場・露天などの衛生状態がこれらの病原菌の食品汚染に関係していることが明らかになった。野菜やカット果物に交差汚染が起こっていることが示唆されたので、生で喫食する場合、注意が必要である。また輸出入食品（二枚貝や牛肉）の汚染も確認されたので、要注意である。

(2)日本とタイにおけるカンピロバクター関連細菌の疫学に関する研究（研究分担者：山崎伸二）

カンピロバクターによる下痢症は、欧米のみならずアジアの国々でも大きな問題となっているが、まだ実態が掌握されていない。特に感染の原因となる食肉の汚染状況を明らかにすることは感染予防のために重要である。本研究では、日本とタイで主として、*C. jejuni* および *C. jejuniga* の 2 菌種の汚染実態を把握することを目的として研究を実施したが、関連菌種も検出できるように考慮して、実験を実施した。その結果、両国で食肉はカンピロバクターによってかなり汚染しているが、両国間で、菌種の分布が異なること、および菌の分離・検査法によって結果に影響があることが明らか

かとなった。すなわち、一般によく用いられる抗菌薬を含んだ選択培地を用いると、これら2菌種以外の菌を培養し検出することは困難である。そこで本研究では、抗菌薬を含まないフィルター法も併用することにより、我が国及びタイの食肉からカンピロバクター属やアルコバクター属(*Arcobacter*)菌の分離・同定を試みた。またカンピロバクター属菌種特有の *cdt* 毒素遺伝子を検出する multiplex PCR 法も併用した。さらに菌の濃度の違いのために培養時間を調節する必要があることも明らかになった。これらの方法を組み合わせることにより、タイの家禽肉 24 検体中 15 検体で *C. jejuni/C. coli* が、豚肉 17 検体中 5 検体で *C. jejuni/C. coli/C. hyointestinalis* が陽性となったが、牛肉では全て陰性であった。一方、我が国の鶏肉 20 検体中 14 検体、豚肉 17 検体中 2 検体から *C. jejuni/C. coli* が、牛肉 34 検体中 5 検体で *C. coli/C. fetus* が陽性となった。本研究の結果は、我々にカンピロバクターの分離・同定法の確立の難しさを認識させるとともに、今後アジア諸国で食肉のカンピロバクターの分布を検査する場合は、分離・検査法に注意する必要があることを示唆する重要な発見を含んでいる。

## 2) 検査法に関する研究成果

[環境・食品などの衛生規範の策定および輸入食品の安全性確保のために役立つ検査法の開発]

(1) 下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な遺伝子検査法の作成に関する研

究 (研究分担者：江崎孝行)

研究分担者らは、主要な食中毒原因細菌を対象に遺伝子検査によって食材から網羅的に対象菌を検出するシステムを開発している。そのためには、最初に増菌培養ステップが不可欠である。検査方法を単純化するため対象菌すべてを増菌できる単一の増幅培地 (Food Pathogen Enrichment Culture [FPEC] ブイヨンと命名) を作成できたので、個々の細菌種を対象とした詳細かつ具体的な増幅培地の適用法の検討を実施した。

まず、本研究では食中毒菌としてもっとも検出頻度が高い *Campylobacter* に焦点を合わせて検討した。特に *Campylobacter* は発育に炭酸ガスと溶血した血液を必要とするため検査方法が煩雑でコストがかかるという問題点がある。*Campylobacter jejuni* は溶血液の添加、無添加にかかわらず、FPEC ブイヨンと一般に使用されている Bolton ブイヨンでは振とう培養で同等の増殖を示したが、増殖は 6 時間で数倍、18 時間で数百倍の増幅が得られた。これに対して他の対象細菌 (*Salmonella enteric* var. *Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*) は *L. monocytogenes* を除いては、数千倍～一万倍以上に増殖した。次に実際に *C.jejuni* 汚染した食材の検査 (鶏肉 25g を 225ml の FPEC ブイヨンに添加) や鶏の糞便汚染の調査も想定してスパイク実験を実施した。その結果、



25g サンプル中に一個の *C.jejuni* 菌体を遺伝子検査によって検出するには、他の細菌の増殖を抑制する抗菌剤を FPEC に添加し、18 時間の培養を行う必要があることが明らかになった。  
**(2) 食品からの *Vibrio cholerae* 検出法に関する研究**（研究分担者：甲斐明美）

現在海外旅行が認められないコレラの国内事例が年間 10~20 事例程度発生しており、輸入魚介類の喫食が感染原因として推定されている。しかし、推定原因食品からコレラ菌が検出された事例はほとんど無い。その原因として、食品からコレラ菌を検出することが非常に困難であることがあげられる。その理由の一つは、コレラ菌を特異的に増殖させる増菌培地が無く、食品に存在する様々な夾雑菌の影響でコレラ菌の増殖が抑えられてしまう、あるいはコレラ菌の増殖以上に夾雑菌が発育してしまうことが考えられる。

本研究では、食品からコレラ菌を効果的に検出するための方法を開発した。そのために、アルカリ性ペプトン水での増菌培養時の培養温度および NaCl 濃度の影響について、単独培養、混合培養、上海ガニへのコレラ菌接種実験などにより検討した。その結果、アルカリペプトン水の NaCl 濃度が 1~2% (1%)、培養温度は 42°C、分離培養温度 (TCBS 寒天培地) 42°C の場合が最も有効であった。

魚介類の種類によっては付着している細菌叢に多少の差があると考え

られるので、今後食品の種類を変えてさらに検討する必要がある。

現在、国内でコレラが発生した時の食品の検査法（厚生労働省からの通知）では、培養温度が 36°C±1°C となっているが、検討の余地がある。

**(3) サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析と迅速同定法の開発**（研究分担者：倉園久生）

サルモネラ属菌は 2500 種以上の膨大な血清型に分類されている菌群であるが、この中でヒトの下痢症（非チフス性サルモネラ症）を起こすものはごく一部である。非チフス性サルモネラ症はアジア地域を含む途上国のみならず先進諸国においてもしばしば大きな問題となるが、主症状である下痢症状と直接的な関連性を示す病原性機構は確立されていない。研究分担者は、コレラ毒素や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシンの A サブユニットをコードする遺伝子と一部ホモロジーのある遺伝子 (*Salmonella enterotoxin; stn*) がサルモネラ属菌に存在することに着目し、これまでにサルモネラエンテロトキシン (Stn) のサルモネラ属菌における特異性、培養細胞に対する障害活性について研究してきたが、その詳細な細胞障害機構及びサルモネラ属菌がもつ下痢原性への Stn の関与は未だ不明である。

本研究では、タイ国で分離された 4 つの血清型を含む 31 の臨床及び環境分離株の *stn* 遺伝子配列を解析し、本遺伝子配列がサルモネラ属菌内で高く保存されている事を明らかにし、本

遺伝子がサルモネラ属菌にとって不可欠な遺伝子である可能性を示唆した。しかし、研究分担者らは、これまでの研究において、Stn タンパク質の発現性には菌株間で差が認められる事を報告している。そして、本研究においては、これまで困難とされてきた組換え Stn タンパク質の精製に成功した。現在、本精製タンパク質を抗原として高感度の抗 Stn 抗体を作製中である。今後、得られる抗体を用いて Stn の分子活性に関する詳細な研究を行うとともに、Stn を指標としたサルモネラ属菌に対する免疫学的迅速同定法の構築を行う予定である。

#### (4) EPEC および EHEC における LEE 関連 III 型分泌系のバリエーションの解明とタイピング等への応用 (研究分担者： 林哲也)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) および腸管病原性大腸菌 (EPEC) の重要な病原遺伝子として知られる *eae* 遺伝子は、菌の腸管粘膜への定着に必須な intimin をコード、attaching and effacing lesion (A/E 病変) と呼ばれる特徴的な形態変化を宿主細胞に誘導することに関係し、下痢などの臨床病態を引き起こす。A/E 病変を形成する病原菌としては、他に *Citrobacter rodentium*、*Escherichia albertii* が知られている。*eae* 遺伝子は、EHEC および EPEC の病原遺伝子マーカーとして、PCR 法による検査対象遺伝子となっている。一方で、*eae* 遺伝子には、これまでに 29 種類のサブタイプが報告され、他にも新規サブタイプが存在すると考えら

れる。*eae* 遺伝子にコードされる intimin タイプの違いはヒト腸管付着部位の組織指向性に関連することが示唆されており、また、LEE 保有菌の疫学マーカーとして利用できる可能性もある。

本研究では、ヒト及び動物から *eae* 遺伝子陽性 (LEE 保有) の大腸菌として分離された 272 株について、*eae* 遺伝子の配列決定を行い、新規 5 種類を含む 30 種類の intimin サブタイプを同定した。また、各 intimin サブタイプにつき 1~数株ずつ計 173 株を選定し、Multilocus sequence (MLS) 解析を用いた進化系統解析を行った。その結果、*Escherichia albertii* に分類される株が 20 株同定された。また、5 種類の新規 intimin サブタイプは、全て *E. albertii* 株由来であった。これらの結果は、EHEC や EPEC として分離されている大腸株の中には、潜在的に相当数の *E. albertii* が含まれることを示唆する。*E. albertii* は、バングラデシュやアフリカでヒトの下痢患者から分離されているが、ヒトに対する病原性についても不明な点が多い。今後、LEE 関連 III 型分泌系の多様性を明らかにし、LEE のタイピング法を確立するためには、*E. albertii* 株のさらなる解析が必要であり、ヒト病原菌としての *E. albertii* の病原性及び性状についても検討が必要である。

#### 3) 病原性メカニズムに関する研究成果

[感染症に対応できる最も効果的な治療法・予防法の確立に資する基礎研

究]

**(1) 赤痢菌の病原性遺伝子 Type III 分泌装置の発現調節機構の解析 (研究分担者: 渡邊治雄)**

赤痢菌による感染症は、アジアの発展途上国で多発し重要な疾病の1つである。これは重篤な疾病であるにもかかわらず、的確な治療法が確立されていないために、感染予防に重点を置いた対策に頼らざるを得ないのが現状である。したがって、特に赤痢菌の病原性発現機構を理解する研究には、疾患の予防、創薬の開発の礎を築く役割が期待されている。現在、赤痢菌の病原性研究は菌による環境変化認識と病原性発現のコントロールの関係が主流となっている。本研究では、主要な病原因子である Type III secretion system (TTSS)に関する新しい発見があった。TTSS は発現が厳密に制御され、環境中での生育には不要な発現を抑えることで、生存に有利に働いている。赤痢菌の場合、病原性を規定する TTSS 遺伝子群は外部環境である温度と浸透圧を感受することで発現が厳密に制御されている。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時には極めて分子量の大きな構造体である TTSS の発現を抑えることで、環境中での生存に貢献しているものと考えられる。かつて、TTSS の発現制御はレギュレータ遺伝子 *virF*, *invE* の転写レベルでの調節とされていたが、制御の本態は長らく不明であった。分担者は TTSS 遺伝子群の発現が、そのレギュレータである *InvE* の転写後調節で制御されるこ

とを証明し、*invE* の発現調節に関わる因子として桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白として同定されている RodZ を見出した。さらに遺伝学的、生化学的な解析から RodZ の細胞骨格としての機能と、*invE* 遺伝子の転写後調節に関わる RNA 結合蛋白質としての機能が分離可能であることを証明した。

**(2) 腸管出血性大腸菌の AB サブユニット毒素の作用機構の解明とその阻止法の研究 (研究分担者: 野田公俊)**

下痢症の原因細菌の1種である志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) のうちの一部の株は、志賀毒素とは全く異なる細胞障害毒素 (サブチラーゼサイトトキシン、SubAB) も産生する。SubAB の病原因子としての重要性を査定することにより、これを分離菌の病原性検査対象マーカーに含めるか否か、あるいは疾患の予防策あるいは、創薬の開発の対象因子となる程重要か否かが判定できる。そのためには、この毒素の作用メカニズムを明らかにする必要がある。

本研究では、HeLa 細胞を用いて、ヒト培養細胞における SubAB による細胞致死経路の解析、及び宿主受容体を明らかにした。SubAB の細胞致死経路において、Bcl ファミリーの Bax/Bak の構造変化、会合体の形成がミトコンドリアからのチトクローム c の放出がカスパーゼの活性化に重要な役割を果たし、アポトーシスの原因となった。HeLa 細胞上の SubAB の受容体として NG2.L1CAM, integrin  $\alpha$

$\alpha 2\beta 1$ , Met を同定し、インテグリンを介したシグナル伝達経路が細胞致死の増強に関与していることを明らかにした。

(3) ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用に関する研究 (研究分担者: 神谷茂)

*Helicobacter pylori* は急性および慢性胃炎を惹起するとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃癌のリスクファクターである。*H. pylori* の感染とこれらの疾病は、日本以外のアジア諸国でも重要であることは間違いのないであろうが、まだ十分な情報が得られていない。本菌は、胃粘膜にバイオフィルム様構造体を形成して存在しているので、不明な点が多く、疾病の診断・予防・治療には菌の生態や病原性メカニズムなどに関する多様な情報が必要である。*H. pylori* は様々な病原因子を産生するが、ウレアーゼはその1つである。*H. pylori* は、ウレアーゼを産生し、ヒトの胃内において胃上皮細胞由来の尿素を利用してアンモニアを作りだし、胃酸を中和することで胃内での強酸下において定着を可能としている。本菌は経口感染することは、現在、ほとんどすべての研究者の一致した考えである。

本研究において、研究分担者は、本菌が経口感染してから、ウレアーゼを産生し、胃内で定着するプロセスに関して、口腔内細菌との相互関係に関する実験データに基づく仮説を提唱した。すなわち：*H. pylori* は口腔内細菌である *S. mutans* や *S. sanguinis*、*S.*

*salivarius* といった細菌と強い凝集性を持つ；*S. mutans* と *H. pylori* の共凝集状態においては、*H. pylori* 単独培養と比較してウレアーゼの発現が上昇していた。；*S. mutans* と *H. pylori* の共凝集状態においてマウス胃内へ投与することは、*H. pylori* 単独投与と比較して *H. pylori* の定着性が上昇した。これらから、*H. pylori* の経口感染時、口腔を通過する際に口腔内細菌と出会い、これらと凝集塊を形成し、そこでウレアーゼ発現上昇が起き、結果として胃内定着性が上昇しているというモデルが考えられる。

(4) 鶏株、ヒト腸炎株、ヒト Guillan-Barre syndrome (GBS) 株に関する比較プロテオーム解析および比較ゲノム解析 - 高運動性関連構造の解析- (研究分担者: 山本達男)

*Campylobacter* 感染症は、件数で細菌性食中毒のトップを占め、重要な感染症であるが病原性に関してはあまり明らかになってない。唯一提唱されている病原因子は、極性鞭毛による活発な運動性である。研究分担者は、*Campylobacter* の運動性および定着の阻害薬の発見・開発は、新規のカンピロバクター感染症治療薬の開発につながる可能性があると考え、菌の運動性に関わる細胞の構造や遺伝子および運動性メカニズムを明らかにする研究を開始した。

先行研究において、研究分担者は、我が国で下痢症患者から分離された *C. jejuni*/*C. coli* 菌株の分子疫学解析

を実施した。本研究では、それらの菌株群の中からグループの代表菌株について、液体中での運動特性を調べ、関連する超微細菌体構造を解析した。その結果、菌体両端の広い細胞間隙に内膜の運動駆動部と鞭毛に連結し、外膜内側の特異なカップ様構造と一体をなした、高速運動をつくり出す特異構造が存在することや、20℃では運動性が認められず、人体温(37℃)または鶏体温(42℃)で菌が高速遊走(>100 μm/s)することを明らかにした。深部感染症である Guillan-Barré syndrome [GBS] から分離された菌株では、解析した5株のうち2株が非らせん菌で、そのうち1株は高運動性の有鞭毛株、もう1株は非運動性の鞭毛欠落株であった。これらの結果から、研究分担者は、腸炎例ではらせん形菌体と高速運動が激しい下痢症を起こす *Campylobacter* の病原因子であると考えられた。一方、GBSの原因菌株では運動性/非運動性の非らせん菌が発症により関与する可能性があると考えた。

#### 4) 治療法に関する研究成果

[基礎から応用へ向かう研究—その1]

##### (1) 腸炎ビブリオ3型分泌装置の発現制御機構の解明と予防・治療への応用 (研究分担者： 飯田哲也)

海洋細菌である腸炎ビブリオは魚介類の喫食に由来する下痢症の重要な原因細菌であり、パンデミッククローン出現以降、このクローンによる感染症の世界的な流行が進行中である。本研究では、腸炎ビブリオの病原性を

コードする重要な遺伝子群領域 (pathogenicity island [Vp-PAI])に含まれる3型分泌装置関連遺伝子群 (T3SS2) が下痢症の発症において重要な役割を果たしていることを示す新たな知見を得た。すなわち、T3SS2 遺伝子群中に DNA 結合モチーフを有する *vtrA* および *vtrB* を見出し、欠失変異株の作成とそれらの細胞毒性および腸管毒性の解析により、これらの遺伝子は Vp-PAI 上の遺伝子群を特異的に正に発現制御する発現調節因子であることが明らかになった。そこでヒト腸管に存在する様々な因子について種々の *in vitro* および *in vivo* 実験により検討した結果、胆汁中の胆汁酸が T3SS2 関連タンパク質の発現を強力に誘導することを見出した。特に胆汁の *vtrB* 遺伝子発現誘導活性は胆汁酸吸着剤であるコレステラミン処理によって完全に消失したこと、およびウサギ腸管内の内在性胆汁酸をコレステラミンで吸着除去することにより、腸炎ビブリオ感染によって誘導される液体貯留が有意に減少した結果は興味深い。コレステラミンは高脂血症治療薬として既に臨床的に用いられている薬剤であり、安全性は確認されている。本研究により細菌性下痢症に対する新しい予防法・治療法の可能性が示唆された。

腸炎ビブリオ感染症の患者の症状は、軽微なものから重篤なものまで個人差がある。途上国では多くの患者が発生するが、重篤な患者が病院を訪れる。しかし、現在は対症療法による治

療のみが行われている。本研究では、本菌の病原性メカニズムの新たな側面を見だし、それが本感染症の新しい予防法・治療法の提唱に繋がることを示し、応用を目指した基礎研究の重要性を印象づける研究と言える。

## (2) 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究（研究分担者： 藤井潤）

腸管出血性大腸菌 O157(以下 O157 と略す)による感染症の典型的な症状は、出血性下痢であるが、希に脳症や腎臓の障害である溶血性尿毒症症候群(HUS)のような重篤な症状に発展し、死に至るケースがある。

研究分担者は、これを防止するにはどうすれば良いかという課題に取り組んだ。すなわち、リスク要因を明らかにして国民を教育し、罹患の可能性のある人々にはリスクを回避する（生肉を食べない）ように指導することを提唱した。

一方で、研究分担者は、罹患の可能性のある人々はどのような人々であるかを明らかにした。不慮の事故で死亡した法医学領域での剖検例を用いて、正常腎臓と脳における細胞レベルでのペロ毒素レセプターである Gb3 発現頻度を免疫組織化学法で調べた。その結果、脳における Gb3 陽性率は、小児の方が成人に比べて有意に高かった。腎臓では、男性に比べ女性において Gb3 陽性率は有意に高かった。また2例の大規模集団感染事例の情報や厚生労働省感染症発生動向調査事業報告のデータを脳症または HUS を発

症した患者の年齢、性、および数等を集計・解析した。その結果、O157 感染による重症化要因は、急性脳症は小児であり、HUS を含む腎機能障害は成人女性、特に高齢女性であることがわかった。

## 5) 予防法に関する研究成果

[基礎から応用へ向かう研究—その2]

### (1) 新規コレラワクチン開発に資する疑似腸管内環境培養下での毒素産生性コレラ菌の表層抗原性の変化に関する研究（研究分担者： 大澤朗）

現在、コレラ症の予防法としてワクチンがいくつか存在するが、いずれも防御期間をあまり長期間持続することが出来ない。そのため、より防御効果を長期間持続出来るワクチンを作成する必要がある。コレラワクチンの1つはコレラ菌の重要な病原因子であるコレラ毒素遺伝子をノックアウトした経口生ワクチンである。研究分担者は、このようなワクチンでは、菌が標的細胞に長期間定着すれば、より効果的なワクチン株になると考えた。定着因子は Toxin-coregulated pili (Tcp) として知られており、コレラ毒遺伝子 (*ctx*) やその他の蛋白遺伝子などとともに ToxR カスケードと呼ばれる、発現調節因子による発現調節を受けている。研究分担者は、*ctx* 遺伝子や菌体蛋白の発現を指標として、これらの発現量が増加するように、*in vivo* 条件（ヒトの消化管内に似る、例えば NaHCO<sub>3</sub> 添加）で試してみたが、残念ながら、成功しなかった。また 17 株の *ctx*<sup>+</sup>コレラ菌株を試験したが、菌株

間でバラツキがあったと報告している。単に *tcp* 遺伝子の発現を増加させたり、constitutive にする方法は他にある（遺伝子のプロモーターの操作等）。それが菌の定着期間の延長やワクチン株の改良に繋がるかどうか予想できない。

## (2) 毒素原性大腸菌における新規病原因子の探索及び粘膜ワクチンへの応用（研究分担者： 辻孝雄）

毒素原生大腸菌（ETEC）の産生する易熱性エンテロトキシン（LT）、または、耐熱性エンテロトキシン（ST）の遺伝子（*elt*、*est*）は、多くの場合、プラスミド（Ent プラスミドと呼ばれる）にコードされることが知られており、ETECはEntプラスミドを介して、これら遺伝子の転移により病原性を獲得した大腸菌であると考えられている。EETECには、LTまたはST単独産生性菌株、あるいはLTとSTの両エンテロトキシン産生性菌株まで多様である。このようにEntプラスミドは種々の遺伝子を受け渡すことができ、また大腸菌中に安定して維持されているので、未知の病原遺伝子を獲得しているタイプのものが存在するかもしれない。また新たなワクチン株を開発する場合にベクターとして利用できるかもしれないと考えられる。

EETEC H10407株の易熱性、及び、耐熱性エンテロトキシンおよびこれらをコードするEntプラスミド（pEntH10407）は従来から頻繁に研究対象になってきたにもかかわらず、pEntH10407の全塩基配列は報告され

ていない。この全塩基配列は将来有効に活用されるであろうと期待されるので、本研究において研究分担者らはそのミッションを遂行した。その結果、pEntH10407は、3つの異なる機能領域からなるモザイク状プラスミドとして進化してきたこと、RepFIIAの複製機構を有するIncFIIAタイプのプラスミドであること、3つのプラスミドメンテナンスシステムを有すること、そして、不完全な*tra*領域を有することが判明した。さらに、pEntH10407は、不完全な*tra*領域に由来する自己水平転移能を有することが明らかになった。

## (3) カンピロバクター菌による食中毒の予防に関する研究（研究分担者 三澤 尚明）

我が国で現在食中毒原因菌第1位のカンピロバクターの主要な感染源として鶏が重要視されている。鶏肉を生や不完全加熱調理のまま喫食する食習慣は日本の伝統的な食文化であることから、調理段階での原因菌の完全な除去は難しいと考えられる。したがって食鳥肉処理場におけるカンピロバクターの除去が必要である。現在我が国では、鶏肉を含めて食材生産・加工場での微生物制御には次亜塩素酸が使用されている。次亜塩素酸は有機物の共存下では効果が低下するため、鶏肉に付着した汚染微生物に対する殺菌効果は低いことが問題視されている。本研究課題ではこの問題を解決するため、新しい殺菌剤として塩化エチルピリジニウム（1000 ppm）を使用

し、と体への薬剤浸透効果を高める真空処理（吸引処理）の導入、およびと体全体に超音波を照射し、と体から菌の遊離を促すための共振超音波発生装置を用いるなどの組み合わせにより、と体に付着したカンピロバクターに対して高い殺菌効果（菌数を処理前の10～100分の1程度に減少）が得られる処理法を開発した。塩化エチルピリジニウムの代わりに次亜塩素酸を使用した場合ある程度効果がある（処理前の10分の1程度に減少）が、塩化エチルピリジニウムには、無味・無臭の殺菌剤であり、鶏肉の食味には影響しないというメリットもあるので、本法は、優れた処理法と言える。

#### D. 考察

多様化・ボーダーレス化するアジア諸国の腸管感染症が多発する現場で、原因食品の汚染状況および感染症発生・伝播状況を掌握するためにアジア諸国の現地での共同研究に力を入れた（疫学・生態学に関する研究成果）。十分とは言えないまでも、かなりの感染症原因菌（腸炎ビブリオ、サルモネラ菌、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌 O157、リステリア菌）と対象調査国（インドネシア、ベトナム、タイ、マレーシア）がカバーできた。予算は限られているが、これまで培われてきた研究分担者と現地研究者との研究協力体制がこれらの国際共同研究を可能にした。しかし、まだ情報は不足していると思われるので、2011

年度は（分担研究者数が多いという批判は承知の上で）、より多くの菌種および対象地域をカバーすることを目指した研究分担者の布陣を計画している。

共同研究の過程で、現地でMPN-PCR法やmultiplex PCR法がルチンに実施可能な時代になったことを痛感した。今後の日本チームに課せられる重要な役割は基礎研究に基づく新たな検査法の提供であろう。この中には先進的な技術開発を伴うもの（「下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な遺伝子検査法」、「サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析と迅速同定法」、「EPEC および EHEC における LEE 関連 III 型分泌系のバリエーションの解明とタイピング等への応用」、）もあれば、クラシックな培養法（U.S. FDA の方法）を再発掘し、再評価したケースもある（「食品からの *Vibrio cholerae* 検出法」）。先進技術のみならず、蓄積した知見も応用することが重要であることが示唆された。

まだ病原性メカニズムとの格闘が続いている菌種や新たに発見された病原因子については、疾患の予防、創薬の開発に繋がる研究成果が早く得られることを祈念しながらエールを送りたい（「赤痢菌の病原性遺伝子 Type III 分泌装置の発現調節機構の解析」、「腸管出血性大腸菌の AB サブユニット毒素の作用機構の解明とその阻止法の研究」、「ヘリコバクター・ピロリと口腔内細菌との相互作用に関



する研究」、「鶏株、ヒト腸炎株、ヒト Guillan-Barre syndrome (GBS) 株に関する比較プロテオーム解析および比較ゲノム解析 - 高運動性関連構造の解析-」、「腸炎ビブリオ3型分泌装置の発現制御機構の解明と予防・治療への応用」)。

「腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究」では、laboratory science と公衆衛生学的調査研究の成果を融合し、得られた成果は実用的で貴重なものである。

本年度の研究で指摘されている東南アジアでのハイガイ (bloody clam と呼ばれる、*Anadara granosa*) を半生で食べる食習慣 (「アジアで重要な食中毒原因細菌の生態および疫学に関する研究」)、日本で生牛肉 (「腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究」) や生の鶏肉 (「カンピロバクター菌による食中毒の予防に関する研究」) を食べる食習慣には共通した強固な食文化がある。これに対してサイエンスが立ち向かう方法は、リスクアセスメントに基づく国民の教育しかないであろう (Yamamoto, A. et al. 2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. Int. J. Food Microbiol. 124(1):70-78.)。そのため欠乏しているのは、環境 (食品を含む) 中の病原性菌株の定量データであり、これは世界的に取り上げられている重要な課題である。

本年度は、腸管出血性大腸菌 O157 に関する研究を多く取り上げた。疫

学・生態学、検査法、病原性メカニズム、および治療法 (実際には予防法も含む) の項目で最前線の研究成果が得られた。これらは、感染症の発生現場から先進技術を用いた実験室まで繋がる研究グループによる最新かつ多角的な研究の情報交換が可能となった一例である。

さらに本年度は、世界的に重視されるようになったカンピロバクターに関する研究に力を入れた。病原性に関する研究に新たな展開があったのみならず、新たなメンバーを迎えて予防法に関する研究を実施し既存の方法より優れた方法が開発された。一方東南アジアの1国として選んだマレーシアでの共同研究で、この菌による様々な環境汚染が明らかにされた。アジア地域の中でも新興国では、近年家畜や家禽の飼養頭羽数が急増し、越境性動物感染症や食品由来感染症の発生リスクが高まっており、本研究の最終的な目標である食鳥肉中のカンピロバクターの制御技術の確立は、自国内での食中毒発生を防止するだけでなく、食肉を輸出入する国々にとっても必要な技術であり、本研究の成果は安全な食鳥肉の確保に大きく貢献するものである。本研究で新たに開発された非塩素系の消毒法は他のアジア諸国でも浸透していくか否かについて注意しておきたい。

上記のように本研究では、カンピロバクターによる食鳥肉の汚染のみならず、アジアで腸管感染症原因菌に汚染した食材・食品の輸出入問題の例と

して、腸管出血性大腸菌 O157 汚染した牛肉、および腸炎ビブリオパンデミック・クローンに汚染した二枚貝に関する情報を提供した。現在国が検討している TPP (環太平洋戦略的経済連携協定) に参入すればアジアからの農畜水産物が大量に日本に上陸してくることが想定され、これを水際の防疫によって阻止するのは事実上不可能であろうと考えられる。したがって輸出国での農畜水産物、食品の安全性に関するスタンダードの共有、またこのスタンダードを維持、監視してゆくための科学技術、人材養成は必要不可欠になろう。このニーズを具体的に満たしてゆくためには、現地の研究者や研究機関との連携体制を構築してゆくことが必要不可欠である。このような観点からも、「日米医学協力計画」の基本方針として、現地との共同研究にさらに重点を置きつつ、日本国内の関連する基礎研究とも連携体制を維持してゆくことが重要であると考えられる。

#### E. 結論

総じて研究計画に沿って研究が進展し、かなり良い成果が得られている。今後もこれらの研究を、必要に応じて軌道修正しながら展開したい。特に次年度はアジアでの共同研究の裾野を拡大するために、願地の研究者と連携体制ができている研究者を研究分担者に追加することを計画している。

#### F. 健康危険情報

日本以外のアジア諸国（発展途上国のみならず、マレーシアのような経済力のある国でも）について、重要な腸管感染症原因菌 4 種類（腸炎ビブリオ、サルモネラ属細菌、カンピロバクター、大腸菌 O157:H7）および致死率の高いリステリア菌によって関連食材がかなり高い頻度で汚染している。特に生で食べる二枚貝、野菜、カット果物は感染のリスクが高く、露天で販売している商品はスーパーマーケットより汚染度が高い。これらの国々へ旅行する場合や、これらの国々から食材・食品を輸入する場合は、注意を必要とする。

タイおよび我が国の食肉がかなりの割合で、カンピロバクターおよび関連細菌で汚染していた。食肉の加熱調理の重要性を消費者に伝えることが重要である。

腸管出血性大腸菌 O157 感染による重症化要因は、急性脳症については小児であり、HUS を含む腎機能障害については成人女性、特に高齢女性であることがわかった。これらのハイリスクグループに属する人々は、腸管出血性大腸菌 O157 に汚染している可能性があるような食品（例：生肉、生レバー）の喫食は回避するように国民に伝えるべきである。

従来から頻繁に研究対象となってきた毒素原生大腸菌 H10407 株の易熱性、及び、耐熱性エンテロトキシンをコードする Ent プラスミド (pEntH10407) の全塩基配列を解析し

たので、関係する研究の役に立つであ  
らう。Ent プラスミド上に存在する *tra*  
領域により、Ent プラスミドが他の因  
子の補助なく、他の細菌へ水平転移す  
る可能性があり、そのため新規下痢原  
因菌の発生、あるいは、既存の下痢病  
原菌の下痢原性の増強に関与する可  
能性がある。

食鳥肉処理場において、チラー後  
(次亜塩素酸による殺菌処理後) のブ  
ロイラーと体の表面からカンピロバ  
クターが高頻度に検出されたことか  
ら、カンピロバクター食中毒を防止す  
るには、鶏肉の生食は避け、十分な加  
熱と二次汚染の防止に努めることが  
重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishibuchi, M. 2010. Features of enteric infections in Asia. K. Tanaka, Y. Niki, Y. Akatsuki (ed.) Current Topics of Infectious Diseases in Japan and Asia. Springer, Tokyo, Japan. pp. 3 – 23.
- 2) Nishibuchi, M. 2010. Transborder Microorganisms: Molecular Epidemiological Analysis of Seafood-borne pathogens. In N. Ishikawa (ed.), Flows and Movements in Southeast Asia: New Approaches to Transnationalism. Kyoto University Press., in press.
- 3) Nishibuchi, M. 2010. Recent trend in infections by *Vibrio parahaemolyticus* and distribution of this bacterium in shellfish in Asia. Proceedings of 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. P. Lassus (Ed.-in-chief). Ifremer. pp. 139-146.
- 4) Tang, J. Y. H, F. M. Ghazali, A. Z. Saleha, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, S. Radu. 2010. MPN-PCR enumeration of *Campylobacter* spp. in raw chicken meats and by-products. Front. Agric. China 4(4): 501-506.
- 5) Pui, C. F., W. C. Wong, L. C. Chai, H. Y. Lee, A. Noorlis, T. C. T. John, Y. H. Tang, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and S. Radu. 2011. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium. Trop. Med. Health., in press.
- 6) Pui, C. F., W. C. Wong, L. C. Chai, E. Nillian, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and Son Radu. 2010. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control

doi:10.1016/j.foodcont.2010.05.021

- 7) Jeyaletchumi, P., R. Tunung, S. P. Margaret, R. Son, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, and P. K. Malakar. 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN-PCR. Int. Food Res. J. 17: 281 -286.
- 8) Tunung, R., F.M. Ghazali, M. A. Noranizan, K. K. Haresh, M. B. Lesley, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and R. Son. 2010. Rapid detection and enumeration of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw vegetables from retail outlets. Int. Food Res. J. 17: 67-78.
- 9) Sukhumungoon, P., Y. Nakaguchi, N. Ingviya, J. Pradutkanchana, Y. Iwade, K. Seto, S. Radu, M. Nishibuchi, and V. Vuddhakul. 2011. Investigation of *stx<sub>2</sub><sup>+</sup> eae<sup>+</sup> Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. Int. J. Food Res. J. 18:381-386.
- 10) Tang J.Y.H., J. Carlson, F. Mohamad Ghazali, A. A. Saleha, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, and S. Radu. 2010. Phenotypic microarray (PM) profiles (carbon sources and sensitivity to osmolytes and pH) of *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 in response to temperature. Int. Food Res. J. 17: 837-844.
- 11) Usha, M. R., R. Tunung, L. C. Chai, F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, M. Nishibuchi, and R. Son. 2010. A study on *Campylobacter jejuni* cross-contamination during chilled broiler preparation. Int. Food Res. J. 17: 107-115.
- 12) Radu, M. Nishibuchi, and V. Vuddhakul. 2011. Investigation of *stx<sub>2</sub><sup>+</sup> eae<sup>+</sup> Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. Int. J. Food Res. J. 18:381-386.
- 13) Lee, H. Y., L. C. Chai, C. F. Pui, R. Tunung, W. Wong, M. Shuhaimi, Y. K. Cheah, M. G. Farinazleen, M. Nishibuchi, and R. Son. 2011. Using RAPD-PCR as molecular assessment on the performance of CHROMAgar™ *Listeria* and PALCAM agar on isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* from foods. Int. Food Res. J. 18: 498-503.
- 14) Lesley, M. B., L. Velnetti, Y. K. Cheah, R. Son, A. Kasing, L. Samuel, V. Micky, and M. Nishibuchi. 2011. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated