

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）
分担研究報告書

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 藤田保険衛生大学教授
研究協力者 越智 定幸 藤田保険衛生大学准教授

研究要旨：

毒素原性大腸菌 (ETEC) 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) の塩基配列解析から分子生物学的特徴と自己水平転移能について検討した。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。

A. 研究目的

病原性を示す大腸菌のうち、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) 産生性の大腸菌が ETEC として分類される。ETEC の LT と ST の遺伝子 (*elt*、*est*) は、多くの場合、プラスミド (Ent プラスミド) にコードされることが知られており、ETEC は、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。ETEC は、LT、または、ST 単独産生性、あるいは、LT と ST の両エンテロトキシン産生性の菌株まで多様性が存在し、多様な進化を遂げてきたと考えられる。一方、プラスミドとは自己複製能を有する染色体外レプリコンであり、病原性を含む種々の形質の伝播に関連することが

知られている。Ent プラスミドは、ETEC の主要な病原因子であるエンテロトキシンをコードすることから、Ent プラスミド伝播が病原性の伝播に関与することは明らかであるが、Ent プラスミドの自己水平転移活性については、研究者によって様々な見解があり、不明な点が多い。プラスミドが有する自己複製、転移性、安定性等の生物学的性質は、R プラスミド、F プラスミド、コリシンプラスミド等を用いた多くの研究から、プラスミド上の個々の遺伝学的モジュールに支配されることが明らかにされている。これらのことから、Ent プラスミドを介した形質の伝播様式を明らかにするためには、Ent プラスミドの分子生物学的解析が必要であるが、Ent プラスミドに関す

む 20 個の ORF が既に報告されている ORF であった。

2) pEntH10407K の複製領域と分配・メンテナンス領域

pEntH10407K は、R100 の複製領域にコードされるタンパク質と 53.8～100%の配列同一性を示す RepA1、TapA、RepA2、RepA3、そして、RepA4 をコードする RepFIIA 複製領域を有していた (Table 1)。低コピープラスミドの遺伝は、プラスミドの分配・メンテナンスシステムが必須である。塩基配列解析から、pEntH10407K には 3 つのプラスミドメンテナンスシステムの存在が示された (Table 2)。すなわち、R100 の *hok/sok* システムに類似性を示す *hok/sok*、R100 の *stbAB* システムに類似性を示す *stbAB*、及び、*Shigella sonnei* の巨大プラスミドである pSS の *stbDE* システムに類似性を示す *stbDE* の存在が判明した。R100 の *hok/sok* システムは、*hok*、*mok* 遺伝子と *sok* 配列から成り、pEntH10407K の *hok/sok* は、R100 の Hok、Mok と 70.6、50.0%のアミノ酸 (AA) 配列同一性、

及び、*sok* と 82.0%の塩基配列同一性を示した (Table 2)。また、pEntH10407K の *StbA* と *StbB* は、R100 の *StbA* と *StbB* にそれぞれ 99.1%と 99.1%の AA 配列類似性を示した (Table 2)。さらに、pEntH10407K の *StbD* と *StbE* は、pSS の *StbD* と *StbE* に 98.8%と 93.7%の AA 配列類似性を示した (Table 2)。これらの類似性は、pEntH10407K の *hok/sok*、*stbAB*、及び、*stbDE* システムが機能的であることを示唆すると考えられる。

3) pEntH10407K の不完全な *tra* 領域
R100、そして、F プラスミドの接合伝達に関連する完全な *tra* 領域は、40、そして、37 個の ORF からそれぞれ構成されている。しかしながら、pEntH10407K の ORF の相同検索から、*tra* 遺伝子は、17 個のみが検出された。この不完全な *tra* 領域は、*traM*、*traJ*、*traY*、*traA*、*traL*、*traE*、*traK*、*traB*、*traP*、*trbD*、*trbG*、*traV*、*traR*、*traD*、*traI*、*traX*、そして、*finO* から構成され、*traD* と *traR* の間には、挿入配列、ISEC8 と ISEC8 様エレメントが存在していた (Fig. 1)。また、ISEC8 と ISEC8 様エレメントは、R100 の *tra* 領域に存在する YhfA と YfhA とアミノ酸配列レベルで高い配列同一性を示すトランケートされた ORF に挟まれる形で存在していた。これら *yhfA* と *yfhA* は、F プラスミドの *tra* 領域には存在しない。

接合伝達されるプラスミドは、*oriT* と呼ばれる領域で 2 本鎖 DNA にニックが入り、生じる一本鎖 DNA が性線毛を通して接合伝達されることから、*oriT* 領域の存在が必要である。そこで、

Table 2 pEntH10407K の 3 つの plasmid segregation systems

System	Alias	Identity/similarity (%)	Orienta-tion ^c	Coordinates to pEntH10407K	Function
<i>hok/sok</i>	<i>parB</i>		-	3062-3330	
	Hok	72/84 ^a		3062-3223	membrane toxic protein
	Mok	50/58 ^a		3066-3281	modulator of <i>hok</i> translation
	<i>sok</i>	82/82 ^b		3269-3330	antisense RNA for <i>hok</i>
<i>stbAB</i>	<i>parA</i>		+	15101-16599	
	<i>StbA</i>	99/99 ^a		15284-16246	ATPase
	<i>StbB</i>	99/99 ^a		16246-16599	DNA-binding adaptor protein
	<i>parC</i>	90/90 ^b		15101-15267	cis-acting site
<i>relBE</i>	<i>stbDE</i>		-	39434-39969	
	<i>relB</i>	93/96 ^a		39718-39969	antitoxin for RelE
	<i>relE</i>	100/100 ^a		39434-39721	inhibitor of protein synthesis

^a タンパク質データベースに対するホモロジー

^b *, clockwise; -, counterclockwise.

pEntH10407K の *oriT* 領域を検索した。その結果、R100 と同様に、*traM* の上流 463 塩基の位置に R100 のニックング領域と完全に一致する配列領域が存在し、pEntH10407K に *oriT* 領域の存在することが判明した。

pEntH10407K には、多くの *tra* 遺伝子が残存していること、そして、*oriT* 領域を有していることから、自己水平転移能を有する可能性が考えられる。しかしながら、本 Ent プラスミドには自己水平転移能がないと以前に報告されている。そこで、pEntH10407K の自己水平転移能について検討した。完全な *tra* 領域を有する R100 の転移頻度を測定すると、 2.44×10^{-6} であった (Table 3)。pEntH10407K は、R100 の転移頻度と比較すると、著しく低頻度 (2.84×10^{-9}) ではあるが、トランスコンジュガントを生じることが判明した (Table 3)。*tra* 領域を持たないコントロールプラスミド、pUC19、あるいは、pBluescript II SK(+) では全くトランスコンジュガントは検出されなかった ($<10^{-11}$) (Table 3)。これらの結果から、pEntH10407K は、低い自己水平転移能を有することが示唆された。

Tra の関連する接合伝達は、供与菌に形成される性線毛により引き起こされる。*tra* 領域中の *traA* は、性線毛サブユニット、ピリンをコードし、R100 や F プラスミドの接合伝達に必須であることが知られている。pEntH10407K の自己水平転移活性が不完全な *tra* 領域に依存するか否かを明

Table 3 pEntH10407K と変異 pEntH10407K プラスミドの接合転移活性

供与菌株中のプラスミド	<i>tra</i> 領域のジェノタイプ	転移頻度
pUC19	Δ	$< 10^{-11}$
pBluescriptII SK(+)	Δ	$< 10^{-11}$
R100	<i>tra</i> ^{ab}	2.44×10^{-6}
pEntH10407K	<i>traT</i> ⁻ , <i>traS</i> ⁻ , <i>traG</i> ⁻ , <i>traH</i> ⁻ , <i>trbF</i> ⁻ , <i>trbJ</i> ⁻ , <i>trbB</i> ⁻ , <i>traQ</i> ⁻ , <i>trbA</i> ⁻ , <i>traF</i> ⁻ , <i>trbE</i> ⁻ , <i>traN</i> ⁻ , <i>trbC</i> ⁻ , <i>traU</i> ⁻ , <i>traW</i> ⁻ , <i>trbI</i> ⁻ , <i>traC</i> ⁻	2.84×10^{-9}
pEntH10407K ² <i>traA</i>	<i>traT</i> ⁻ , <i>traS</i> ⁻ , <i>traG</i> ⁻ , <i>traH</i> ⁻ , <i>trbF</i> ⁻ , <i>trbJ</i> ⁻ , <i>trbB</i> ⁻ , <i>traQ</i> ⁻ , <i>trbA</i> ⁻ , <i>traF</i> ⁻ , <i>trbE</i> ⁻ , <i>traN</i> ⁻ , <i>trbC</i> ⁻ , <i>traU</i> ⁻ , <i>traW</i> ⁻ , <i>trbI</i> ⁻ , <i>traC</i> ⁻ , ² <i>traA</i>	$< 10^{-11}$
pEntH10407K ² <i>tra</i>	² <i>tra</i> ^c	$< 10^{-11}$

pEntH10407K と変異 pEntH10407K プラスミドの接合転移活性を調べるため、種々のプラスミド (pUC19, pBluescriptII SK(+), R100, pEntH10407K, そして、pEntH10407K) で大腸菌 K-12 株を培養し、供与菌として用いた。このトランスフォーメーション大腸菌 K-12 株の受容菌株を混合し、37°C でインキュベーション後、混合菌液を選択平板培地へ接種し、生じるコロニー数から転移頻度を算出した。
^a *tra* 領域を有していない
^b 完全な *tra* 領域を有している
^c 不完全な *tra* 領域を有し、より欠損している

らかにするため、pEntH10407K の不完全な *tra* 領域中の *traA* を欠失させた変異 Ent プラスミド、pEntH10407K Δ *traA* の転移頻度を測定した。その結果、pEntH10407K Δ *traA* ではトランスコンジュガントの形成は全く認められなかった ($<10^{-11}$) (Table 3)。また、pEntH10407K の不完全な *tra* 領域の全てを除いた変異 Ent プラスミド、pEntH10407K Δ *tra* の転移頻度を調べたが、pEntH10407K Δ *traA* の場合と同様、トランスコンジュガントの形成は全く認められなかった ($<10^{-11}$) (Table 3)。これらの結果は、pEntH10407K の自己水平転移能は、不完全な *tra* 領域に由来すること、そして、本活性には *tra* 領域中の *traA* が必要であることを示唆している。

E. 結論

我々は、ETEC H10407 株の Ent プラスミドを Tn5-Km で標識した pEntH10407K の塩基配列解析を行い、本 Ent プラスミドが RepFIIA 複製領域を有する IncFIIA タイプのプラスミドであることを明らかにした。また、pEntH10407 は、本プラスミド中に 3

つの異なる分配・メンテナンスシステム、*hok/sok*、*stbAB*、そして、*stbDE*を有することが判明した。pEntH10407は、不完全な *tra* 領域を形成するが、この不完全な *tra*領域に由来する自己水平転移能を有すること、そして、pEntH10407 の自己水平転移活性には不完全な *tra* 領域中の *traA*が必要であることが判明した。pEntH10407Kは、複数のプラスミドメンテナンスシステムにより宿主菌体内で安定に維持され、また、不完全な *tra*領域の関与する自己水平転移活性により他の菌へ水平転移すると推察された。

F. 健康危機情報

EPECは、主に旅行者下痢症の原因菌であり、下痢原因毒素としてLT、あるいはまた、STを産生する。今回の検討から、これら病原遺伝子をコードするEntプラスミド、pEntH10407は、複数のプラスミドメンテナンスシステムを有することにより、容易に欠落することなく、宿主大腸菌に遺伝すると推察される。また、Entプラスミド上に *tra*領域が存在することが明らかになり、その *tra*領域が不完全な *tra*領域を形成しているにもかかわらず、自己水平転移活性を有することも明らかになった。このことは、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ことを示唆し、Entプラスミド上の *tra*領域の働きは、新規下痢原因菌の発生、あるいは、既存する下痢病原菌の下痢原性の増強に関与する可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirai, K., Arimitsu, H., Umeda, K., Yokota, K., Shen, L., Ayada, K., Kodama, Y., Tsuji, T., Hirai, Y., and K. Oguma. 2010. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. *Acta Med. Okayama*. 64:163-170.

Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., and T. Tsuji. 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res.* 16:299-309.

2. 学会発表

Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, A., Tsukamoto, T., Kato, M., Shimizu, S., and T. Tsuji. Analysis of the transfer and plasmid maintenance regions of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid pEntH10407, The 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, p.189 (2010)

有満秀幸、中嶋秀満、越智定幸、佐々木慶子、塚本健太郎、加藤道夫、清水利康、辻孝雄、コレラ毒素によるマウス脾臓細胞のCREB活性化シグナル伝達経路の解析、第57回トキシシンポジウム予稿集、p.150-153 (2010)

Neri, P., Hamada-Tsutsumi, S., Akahori, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Shimizu, T., Kurosawa, Y., and T. Tsuji, Human naïve antibodies against Shiga toxins isolated from a phage-display library、第57回トキシシンポジウム予

稿集, p. 157-158 (2010)

越智定幸、清水徹、大谷郁、有満秀幸、塚本健太郎、佐々木慶子、加藤道夫、一瀬休生、辻孝雄、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの機能領域の配列解析、第 57 回トキシシンポジウム予稿集, p. 159-160 (2010)

塚本健太郎、田中良和、Nipawan Nuemket、越智定幸、有満秀幸、加藤道夫、中村佳司、小崎俊司、辻孝雄、ボツリヌス神経毒素受容体結合領域の結晶構造と細胞内侵入機構の解析、第 57 回トキシシンポジウム予稿集, p. 162-163 (2010)

西脇啓太、塚本健太郎、有満秀幸、越智定幸、佐々木慶子、加藤道夫、辻孝雄、ボツリヌス C 型及び DC モザイク神経毒素は異なるガングリオシドを介して細胞内に侵入する、第 47 回日本細菌学会中部支部総会予

稿集, p. 33 (2010)

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷郁、Neri Paola、佐々木慶子、加藤道夫、一瀬休生、清水徹、辻孝雄、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの機能領域配列解析、細菌学会誌, 64(1), p. 163 (2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1. 特許取得
なし

1. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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）
分担研究報告書

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 宮崎大学教授

研究要旨：

カンピロバクター食中毒の主要な感染源として鶏が重要視されている。国内の食鳥肉処理場における微生物制御には次亜塩素酸が使用されているが、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を使用し、と体への薬剤浸透効果を高める真空処理の導入、さらにはと体全体に超音波を照射できる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が得られる処理法を開発した。

A. 研究目的

近年、BSE や大型食中毒の発生、さらには大手食品製造会社のずさんな衛生管理の発覚などに伴い、食の安全性に関する国民の関心が高まっている。厚生労働省の食中毒統計によると、食肉およびその加工品を原因とする食中毒の発生が増加傾向にあり、食肉を「さしみ」や「たたき」などの生食あるいは不完全加熱調理品として食べる日本人の食習慣によるところが大きいと考えられている。したがって、食肉の品質劣化を引き起こす細菌群や食中毒の原因となる病原微生物を制御するための新しい技術開発が望まれている。

カンピロバクターによる食中毒は近年増加傾向にあり、医療機関から届けられる年間患者数3,000人程度であるが、厚生労働科研究報告によると、

実際の患者数は年間160万人以上であると推定されている。カンピロバクター菌は、鶏肉を原因食品とする事例が多く、養鶏場、食鳥肉処理場、さらには流通・販売に至る過程において本菌の防除対策を講じることが急務となっている。しかしながら、鶏肉の生食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の背景もあることから、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。

食鳥肉処理場における微生物制御（殺菌処理）には現在主に次亜塩素酸が使用されているが、過去の研究結果から器具・器材に対する殺菌効果は認められるものの、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示されている。そのため、食鳥肉処理場における病原微生物を制御する

ための新しい技術開発が望まれていた。本研究課題では、この問題を解決するため、新しい殺菌剤の選択と殺菌剤のと体への浸透効果を高める処理技術の導入、さらにはと体全体に超音波を照射できる共振超音波発生装置を用いるなどの改良を加えることにより、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を示す処理技術の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 食鳥と体：検体として食鳥処理場のチラー処理後のブロイラー中抜きと体、及び小規模食鳥処理場で次亜塩素酸処理を行わずに処理された地鶏中抜きと体を用いた。

2) 殺菌処理方法：殺菌剤として、次亜塩素酸 (100ppm)、塩化セチルピリジニウム (CPC; 1000ppm) を用いた。殺菌剤を満たした真空容器内にブロイラーの「と体」を浸漬させ、0.002HPa (ヘクトパスカル) で10分間吸引後、常圧に戻す操作を3回行うことで脱気とともに薬液の浸透を促進させた。続いて殺菌剤を満たしたステンレス容器内に「と体」を移して浸漬させ、と体表面の付着細菌の遊離を促進させるため、共振型超音波発生装置 (130KHz) により5分間超音波を照射した。最後に使用した殺菌剤の除去を目的として流水洗浄を行った。

3) カンピロバクター菌数の測定：一連の殺菌処理が終了後、殺菌剤を除去するため、と体を流水で10分間洗浄し、ムネ、背、モモ外、モモ内、手羽外、手羽内の6箇所からカンピロバクターの検出を試みると共に、処理前後の胸および背の皮をストマッカー処

理し、最確数 (MPN) 法にて皮に付着しているカンピロバクター数を定量的に測定・比較した。対照として未処理と体を水道水で処理、真空処理と共振超音波処理の対照として薬液に浸漬するだけの処理を行い、同様にカンピロバクター菌数を測定した。

4) と体皮膚表面の走査型電子顕微鏡による観察：殺菌処理後の鶏皮の表面を走査型顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物を生体として使った実験等は含まれていないため、該当しない。

C. 研究結果

塩化セチルピリジニウムを用い、超音波照射処理のみと吸引処理と超音波照射処理の組合せを行った方法を未処理および水道水を用いた場合の菌数と比較した。超音波照射処理のみの殺菌方法では水道水による処理に比べ10分の1以下にカンピロバクターを減少させることができた。一方、吸引処理と超音波照射処理の組合せを行った方法ではさらに殺菌効果が高く、カンピロバクターは未処理では6箇所検出されたのが、処理後は2箇所程度まで減り、菌数も処理前の10~100分の1程度に減少させることができた。

次亜塩素酸でも吸引と超音波処理を組み合わせることによって、処理前の10分の1程度に減少させることができた。以上の結果から、殺菌剤に浸漬させた「と体」を吸引処理した後、共振型超音波発生装置による超音波照射処理を行うことで、従来の次亜塩素酸に浸漬させる方法に比べ、高い殺

菌効果を得ることが可能となった。

CPC による殺菌処理後のと体皮膚表面を走査型電子顕微鏡で観察すると、処理前に観察された付着物は除去されていることが確認された。

D. 考察

今回の殺菌効果の評価には、と体の主要な汚染部位である鶏皮のみを用いて実施しており、筋肉を含めた定量検査を実施した場合は、さらにカンピロバクター菌数は減少すると考えられた。以上の結果から、と体表面への殺菌剤を十分浸漬させるための吸引処理と、と体表面に付着している菌の遊離を促進させるための共振型超音波処理を行うことで、従来の次亜塩素酸に浸漬させる方法に比べ、高い殺菌効果を得られることが分った。

食鳥肉の微生物制御技術としては、放射線照射などの物理的な処理法や化学薬品を用いた殺菌法が開発されている。化学薬品の中には、酢酸や乳酸などの有機酸が用いられることがあるが、pH の低い薬剤に長時間浸漬すると、肉の変性が生じる等の欠点がある。これに対し CPC は無味・無臭の殺菌剤であり、鶏肉の食味には影響せず、カンピロバクターに対する殺菌効果も高い。

共振型超音波発生装置は、マイクロチップなどの洗浄を目的として作製されたもので、食品分野に応用した例はない。殺菌装置を構成する各パーツはすでに現存するものの組合せであるため、殺菌効果を高めるための条件の精査は必要であるが、装置を作製して実用化させるための実施上の課題が少ない。従って、本研究よって開発された食鳥と体のカンピロバクター

制御技術は、国内はもとより世界をリードすることが期待される。

E. 結論

食品微生物の制御技術の開発は、鮮度保持や安全性の向上を実現するものであることから、食品の生産から消費に至る全ての過程に関わる人々にとってニーズの高いものとなる。本研究課題で開発した殺菌技術は、ブロイラーと体の新しい殺菌処理法である。今回用いた CPC は、日本国内では医薬部外品としての使用が認められているが、食品添加物（殺菌料）としての使用は認められていない。しかしながら、米国の食鳥処理場で、微生物制御の目的で使用することが認められている殺菌剤である。カンピロバクター食中毒は、世界的に毎年 4~5 億人が感染していると推定され、カンピロバクターの鶏肉汚染菌数を 100 分の 1 に減少できれば、食中毒を 30 分の 1 に減らすことが可能であるとの疫学データがある。従って、本殺菌法は公共性・公益性の高い技術であるといえる。

F. 健康危機情報

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) 三澤尚明、副島潤一郎 超音波を使用したカンピロバクター撃退技術
超音波 TECHNO, 22: 6-9, 2010
 - 2) Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Horii, Y., Misawa, N., and Saegerman, C. Q fever in Japan: An update review. Vet. Microbiol., (in press)
 - 3) Yamazaki, W., Taguchi, M., Misawa, N. Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Microbiol. Immunol., 54:398-404, 2010
 - 4) Moe, K. K., Yano, T., Misumi, K., Kubota, C., Nibe, K., Yamazaki, W., Muguruma, M., and Misawa, N. Detection of antibodies against *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii*-like species in dairy cattle with papillomatous digital dermatitis. Microbiol. Immunol., 54: 338-346, 2010
 - 5) Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., and Misawa, N. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. Vet. Microbiol., 143: 352-362, 2010
 - 6) Moe, K. K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Masaaki Nakai, M., and Misawa, N. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. J. Vet. Med. Sci., 72: 411-416, 2010
2. 学会発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
- 1) 新木泰輔、佐々木賢美、山崎 渉、三澤尚明、食鳥肉における新しいカンピロバクター制御技術の開発、日本食品微生物学会講演要旨集・2010年(滋賀)
 - 2) 三澤尚明、佐々木賢美、吉山佳世、福井敬一、オゾン含有マイクロバブル水によるマンゴーの鮮度保持並びに殺菌効果、日本食品微生物学会講演要旨集・2010年(滋賀)
 - 3) 三澤尚明、佐々木賢美、山崎 渉、鶏と体のカンピロバクター制御技術の開発、第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集・p258・2010年(帯広)
 - 4) 吉本有貴、山崎 渉、三澤尚明、血清中に含まれる *Campylobacter jejuni* の自発凝集活性促進物質の検出、第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集・p252・2010年(帯広)
 - 5) 山崎 渉、三澤尚明、中口義次、西渕光昭、LAMP法による腸炎ビブ

リオ病原因子 *tdh*, *trh1*, *trh2* ならびに菌種特異的遺伝子の簡易迅速検出法の開発、平成 22 年度日本獣医公衆衛生学会（九州）・ p 138 ・ 2010（佐賀）

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
「真空および共振型超音波処理による食品材料における微生物の制御方法及び制御装置」（特願 2010-065744）
2011 年に国際特許を出願予定。

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

図1 共振型超音波照射のみの殺菌効果

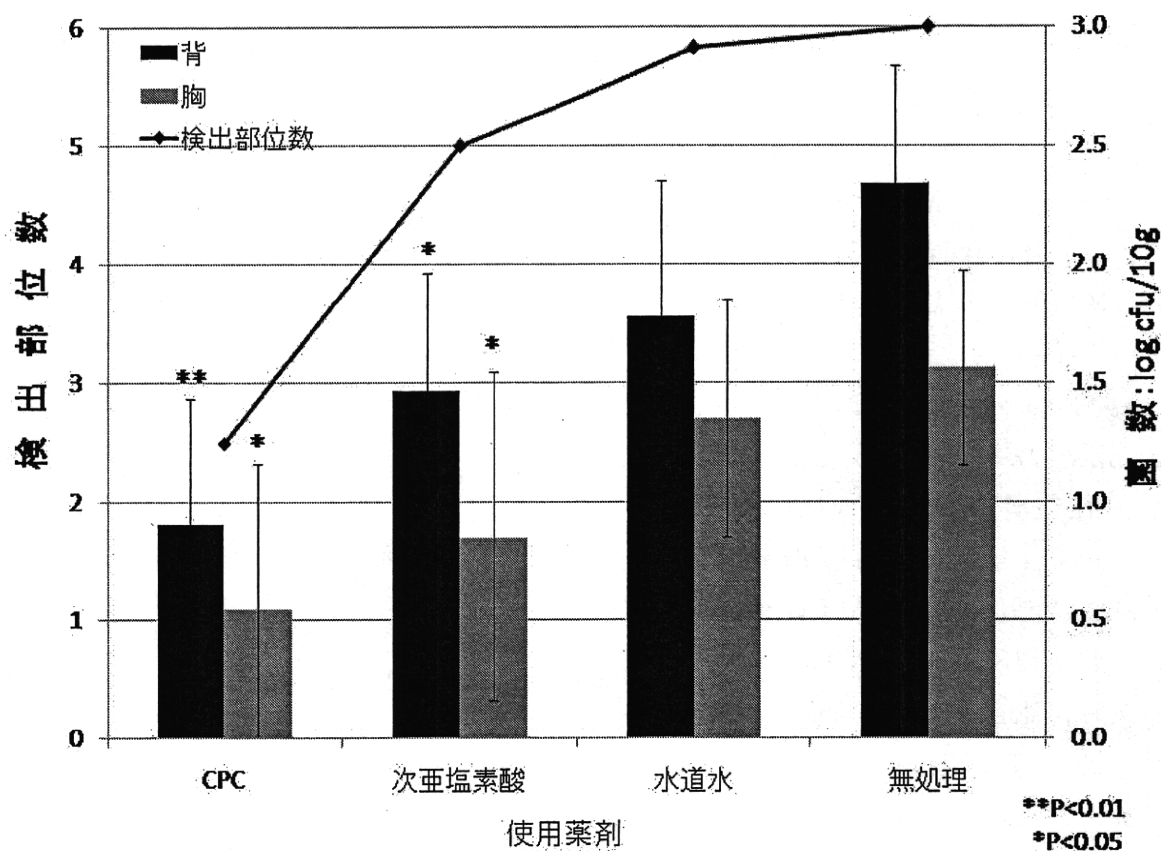
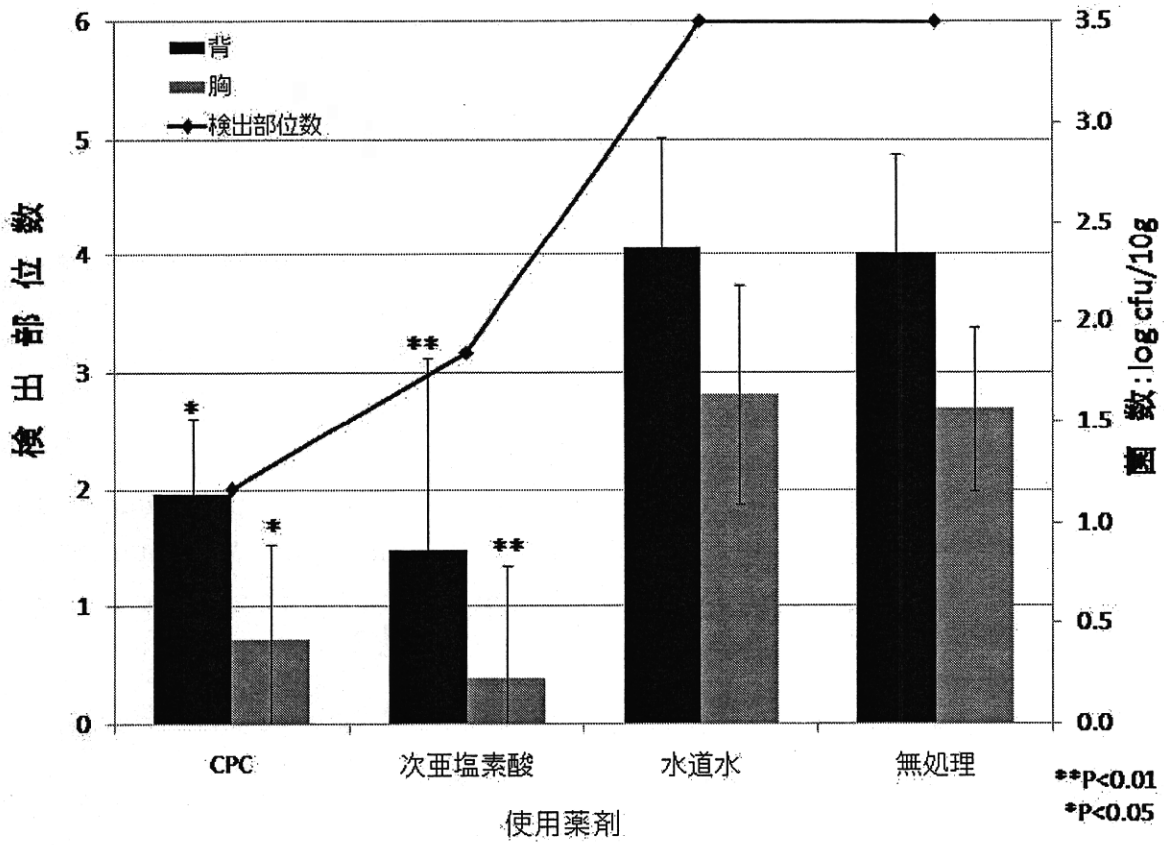


図2 陰圧処理後共振型超音波照射の殺菌効果



研究発表一覧

A. 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. 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.
- 3) 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.
- 4) 西瀨光昭. 2010. アジアの汽水環境の魚介類の病原細菌汚染の例. 化学療法の領域 26(10):2045-2052.
- 5) 西瀨光昭. 2010. 「食品の微生物汚染と安全性確保」: 国際的かつ多角的視点からの取り組みの重要性. 化学療法の領域 26(10):2036-2037.
- 6) 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.
- 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) 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.
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 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) Sukhumungoon, P., Y. Nakaguchi, N. Ingviya, J. Pradutkanchana, Y. Iwade, K. Seto, S. Radu, M. Nishibuchi, and V. Vuddhakul. 2011. Investigation of *stx2+* *eae+* *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. Int. J. Food Res. J. 18:381-386.
- 15) 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 from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. Int. Food Res. J. 18: in press.
- 16) S. M. Lutful Kabir, K. Kikuchi, M. Asakura, S. Shiramaru, N. Tsuruoka, A. Goto, A. Hinenoya, and S. Yamasaki. 2011. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. Jpn. J. Infect. Dis.,

64:19-27,

- 17) Pham van Hung, J. Zhang, M. Hayashi S.Yoshida, K. Ohkusu, and T. Ezaki. 2011. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16S rDNA and *rpoB* gene sequences. Jpn Soc. Cul. Coll.(submitted)
- 18) Thanongsaksrikul J., Srimanote P., Maneewatch S., Choowongkomon K., Tapchaisri P., Makino S.-I., Kurazono H., and Chaicumpa W. 2010. A V_HH that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. J. Biol. Chem. 285: 9657-9666.
- 19) Akada K.J., Aoki H, Torigoe Y, Kitagawa T, Kurazono H, Hoshida H, Nishikawa J, Terai S, Matsuzaki M, Hirayama T, Nakazawa T, Akada R, and Nakamura K. 2010. *Helicobacter pylori* CagA inhibits endocytosis of cytotoxin VacA in host cells. Disease Models & Mechanisms. 3(9-10): 601-617.
- 20) Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., and Kohno S. 2010. *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. Digestive Diseases and Science, October 7.
- 21) Toh, H., K. Oshima, A. Toyoda, Y. Ogura, T. Ooka, H. Sasamoto, SH. Park, S. Iyoda, K. Kurokawa, H. Morita, K. Itoh, TD. Taylor, T. Hayashi, and M. Hattori. 2010. Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. J. Bacteriol. 192(4):1165-6.
- 22) Yano, T., K. K. Moe, K. Yamazaki, T. Ooka, T. Hayashi, and N. Misawa. 2010. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. Vet. Microbiol. 134(2-4) :352-362.
- 23) Nakayama, K., K. Kurokawa, M. Fukuhara, H. Urakami, S. Yamamoto, K. Yamazaki, Y. Ogura, T. Ooka, and T. Hayashi. 2010. Genome comparison and phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains. DNA Res. 17:281-291.
- 24) Izumiya, H., Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda, and H. Watanabe. 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups:

O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54:569-577.

- 25) Yen, H., T. Ooka, A. Iguchi, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2010. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- κ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog.* 6 (12): e1001 231.
- 26) Kusumoto, M., T. Ooka, Y. Nishiya, Y. Ogura, T. Saito, Y. Sekine, T. Iwata, M. Akiba, and T. Hayashi. 2011. IS-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.* 2:152, DOI:10.1038/ncomms1152.
- 27) 大岡唯祐, 林哲也:細菌ゲノム解析の進歩. 日本臨床 増刊号 遺伝子診断学(第2版) - 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望 - 68 巻増刊号 8 : 144-149, 2010. ISSN:0047-1852, 株式会社日本臨床社.
- 28) Matsuura, G., N. Morinaga, K. Yahiro, R. Komine, J. Moss, H. Yoshida, and M. Noda. 2009. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect. Immun.* 77:2919-2924.
- 29) Yahiro, K., N. Morinaga, J. Moss, and M. Noda. 2010. Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells by mitochondrial permeabilization via activation of Bax/Bak, independent of C/EBF-homologue protein (CHOP), Ire1alpha or JNK signaling. *Microb. Pathog.* 49:153-163.
- 30) Yahiro, K., M. Satoh, N. Morinaga, H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2010. Identification of Subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun.* In press.
- 31) Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kamiya S. 2010. Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (Suppl 1):S90-94.
- 32) Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. 2010. Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (Suppl 1):S11-14.

- 33) Bai CL, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Zaman C, Kurata S, Kamiya S, Tanaka H. 2010. In vitro and in vivo effects of the Mongolian drug Amu-ru 7 on *Helicobacter pylori* growth and viability. *Microbiol. Immunol.* 54(9):508-515.
- 34) Hanawa T, Osaki T, Manzoku M, Kawakami H, Tomoda A, Kamiya S. 2010. In vitro antibacterial activity of Phx-3 against *Helicobacter pylori*. *Biol. Pharm. Bull* 33(2):188-191.
- 35) Yabe S, Higuchi W, Takano T, Razvina O, Iwao Y, Isobe H, Yamamoto T. 2010. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Infect. Chemother.* 16:174-85.
- 36) Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Takano T, Razvina O, Reva I, Nishiyama A, Yamamoto T. 2010. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from chickens and patients with gastritis or Guillain-Barré syndrome based on multilocus sequence types and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Microbiol Immunol.* 54:362-7.
- 37) 矢部 静、高野智洋、西山晃史、山本達男. 2010. トピックス-最新疫学情報 (海外)、最新疫学情報 (国内)、Journal club. 日本カンピロバクター研究会誌 vol. 3: 34-38.
- 38) Kodama, T., Gotoh, K., Hiyoshi, H., Morita, M., Izutsu, K., Akeda, Y., Park, K.-S., Cantarelli, V.V., Dryselius, R., Iida, T., and Honda, T. 2010. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. *PLoS One* 5: e8678.
- 39) Hiyoshi, H., Kodama, T., Iida, T., and Honda, T. 2010. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. *Infect. Immun.* 78: 1772-1780.
- 40) Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K.-S., Akeda, Y., Iida, T., and Honda, T. 2010. Transcriptional regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes by ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *FEMS Microbiol. Lett.* 311: 10-17.
- 41) Gotoh, K, Kodama, T., Hiyoshi, H., Izutsu, K., Park, K.-S., Dryselius, R., Akeda, Y., Honda, T. and Iida, T. 2010. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a therapeutic potential for bile acid-sequestering agents. *PLoS One* 5: e13365.

- 42) Okada, N., Matsuda, S., Matsuyama, J., Park, K.-S., de los Reyes, C., Kogure, K., Honda T. and Iida, T. 2010. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. BMC Microbiol. 10: 302.
- 43) Izutsu, K., and Iida, T. 2010. *Vibrio parahaemolyticus*. Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens, ASM Press p. 77- 84.
- 44) Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita, M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. 2010. Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139. Mol. Cell. Probes.
- 45) Hirai, K., Arimitsu, H., Umeda, K., Yokota, K., Shen, L., Ayada, K., Kodama, Y., Tsuji, T., Hirai, Y., and K. Oguma. 2010. Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera. Acta Med. Okayama. 64:163-170.
- 46) Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., and T. Tsuji. 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. DNA Res. 16:299-309.
- 47) 三澤尚明、副島潤一郎. 2010. 超音波を使用したカンピロバクター撃退技術 超音波 TECHNO, 22: 6-9.
- 48) Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Horii, Y., Misawa, N., and Saegerman, C. Q fever in Japan. An update review. Vet. Microbiol., (in press)
- 49) Yamazaki, W., Taguchi, M., Misawa, N. 2010. Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Microbiol. Immunol., 54:398-404.
- 50) Moe, K. K., Yano, T., Misumi, K., Kubota, C., Nibe, K., Yamazaki, W., Muguruma, M., and Misawa, N. 2010. Detection of antibodies against *Fusobacterium necrophorum* and *Porphyromonas levii*-like species in dairy cattle with papillomatous digital dermatitis. Microbiol. Immunol., 54: 338-346.
- 51) Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., and Misawa, N. 2010.

Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet. Microbiol.*, 143: 352-362.

- 52) Moe, K. K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Masaaki Nakai, M., and Misawa, N. 2010. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 411-416.

B. 学会発表

- 1) Koji Seo, Fumio Gondaira, Junichi Sugiyama, Pharanai Sukhumungoon, Varaporn Uddhakul, Wataru Yamazaki, Kazuko Seto, Yoshito Iwade, Rika Shimizu, Natsuko Tanaka, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi: O:K serotype of *Vibrio parahaemolyticus*: a very important epidemiological marker. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.
- 2) Abdul Aziz Djamal, Harry Fajri Zisoni, Yoshitsugu Nakaguchi, Kazuko Seto and Mitsuaki Nishibuchi: The first reported *Vibrio parahaemolyticus* diarrheal case from Batam, Indonesia and some additional related epidemiological characteristics. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.
- 3) Yoshitsugu Nakaguchi, Nguyen Binh Minh, Cuong Ngo Tuan, Tran Hoang Huy, Nguyen Hoai Thu, Le Thanh Huong, Kazuko Seto, Kazuhiro Okubo, Yoshito Iwade, Mitsuaki Nishibuchi: Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* Infection in Hanoi, Vietnam. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto.
- 4) 山下泰治、小谷博秀、川上大雄、西淵光昭: 焼成カルシウムをベースにした新しい食品用除菌剤の開発. 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会. 東京都. 平成 22 年 9 月 22 日. 日防菌防黴学会第 37 回年次大会プログラム p. 23.
- 5) 瀬尾晃司, 権平文夫, 勢戸和子, 山崎渉, 岩出義人, 杉山純一, 中口義次, 西淵光昭: 腸炎ビブリオの K 抗原のバリエーションと特定の DNA 領域変化との相関関係の解析. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会. 大阪府枚方市. 平成 22 年 11 月 20 日.
- 6) 中口義次、Nguyen Binh Minh、Cuong Ngo Tuan、Tran Hoang Huy、Nguyen Hoai Thu、Le Thanh Huong、勢戸和子、大久保和洋、岩出義人、西淵光昭: ベトナム北部ハノイ市における腸炎ビブリオ感染症調査. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジウム. 秋田県秋田市. 平成 22 年 11 月 25-26 日.
- 7) 瀬尾晃司, 権平文夫, 勢戸和子, 山崎渉, 岩出義人, 杉山純一, 中口義次, 西淵光昭: 腸炎ビブリオの K 抗原をコードする DNA 領域の比較解析. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジ