

201104002A

**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)**

**変容するアジアにおける細菌性下痢症を阻止するための  
フロントライン研究**

**平成 23 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 西淵 光昭**

**平成 24(2012)年 3月**

## 目 次

### 1. 総括研究報告

- 変容するアジアにおける細菌性下痢症を阻止するための  
フロントライン研究 . . . . . 1  
西淵 光昭 京都大学・教授

### 2. 分担研究報告

#### I. フロントライン研究：アジア諸国での感染症の疫学、菌の生態学

- (1) 東南アジアと東アジアの下痢症の発生・伝播に関する  
国際共同研究の展開に関する研究 . . . . . 24  
西淵 光昭 京都大学・教授
- (2) コレラ菌の分子疫学的解析に関する研究 . . . . . 33  
山崎 伸二 大阪府立大学・教授
- (3) 「ベトナム共同研究拠点」：北部、南部ベトナムのコレラ流行地域における  
ビブリオフィージの分離、ゲノム解析。コレラ予防、治療への応用に関する  
研究 . . . . . 38  
江原 雅彦 長崎大学・助教
- (4) 下痢原性大腸菌に関するインド・韓国との共同疫学調査に関する研究 . . . 44  
西川 禎一 大阪市立大学・教授
- (5) インドネシア環境水より分離されたコレラ毒素遺伝子保有非コレラ菌株に  
関する研究 . . . . . 52  
大澤 朗 神戸大学・教授

#### II. 実用的研究（検査法、診断法、治療法）

- (1) 食材中の低濃度病原体を網羅的にスクリーニングする方法の食材を使った  
検証 . . . . . 62  
山崎 孝行 岐阜大学・教授
- (2) 次世代シーケンサの細菌性下痢症への応用に関する研究 . . . . . 67  
飯田 哲也 大阪大学・特任教授
- (3) LAMP法による魚介類由来下痢症起因菌の包括的検出法の開発と途上国におけ  
る普及活動に関する研究 . . . . . 72  
山崎 渉 宮崎大学・准教授
- (4) 食品を対象とした下痢症起因菌の検出法に関する研究 . . . . . 77  
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター・部長

- (5) 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に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83  
倉園 久生 帯広畜産大学・教授
- (6) *Escherichia arbertii*のゲノム解析と菌種同定マーカーの同定に関する研究・ 90  
林 哲也 宮崎大学・教授
- (7) 腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の治療法に関する研究・・・・・・・・ 99  
藤井 潤 九州大学・准教授

### III. 治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析

- (1)サルモネラの病原性発現制御機構の解明とその応用に関する研究・・・・・・・・ 111  
山本 友子 千葉大学大学院・教授
- (2)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・・・・・・・・ 116  
神谷 茂 杏林大学・教授
- (3)大腸菌性下痢症に対する粘膜ワクチン開発に向けた新規病原因子の探索・・ 124  
辻 孝雄 藤田保健衛生大学・教授
- (4)赤痢菌の病原遺伝子解析とワクチン開発に関する研究・・・・・・・・・・・・ 130  
渡邊 治雄 国立感染症研究所・所長
- (5) *Campylobacter*属菌がもつ高速運動関連構造 (CHSDU) の解析,阻害剤の探索、およびその応用・・・・・・・・・・・・・・・・ 137  
山本 達男 新潟大学・教授
- (6)腸管出血性大腸菌の SubAB 毒素の作用機構の解明とマウスにおける病態形成メカニズムの解析に関する研究・・・・・・・・・・・・ 141  
野田 公俊 千葉大学・教授

### 3. 研究発表一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 145

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）  
変容するアジアにおける細菌性下痢症を阻止するためのフロントライン研究  
（H23-国医-指定-001）

平成 23 年度 総括研究報告書

代表研究者： 西渕光昭 京都大学東南アジア研究所教授

平成 24 年 3 月

**研究要旨：**

下痢症の多発・伝播が未だに防止できていないアジア諸国で、アジアの途上国で問題になっているか、今後問題になりそうな感染症を中心にできるだけ多くの下痢症をカバーするように、研究内容を(1)現地研究者と共同で疫学・生態学研究を進め、情報収集・情報交換をするフロントライン研究、(2) 共同研究現場で活用できる実用的研究（検査法、診断法、治療法）、(3) 治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析に大別し、特に研究内容(1)と(2)を強化した分担研究者の布陣にした。また(1)では今後重視しなければならないインドおよび中国を含めた国々と共同研究体制が確立しており、情報収集・情報交換の窓口となる研究分担者、(2)では途上国で有用な技術の開発・普及（例えば LAMP 法による PCR）が可能な研究分担者を追加した。それぞれの分担計画はほぼ達成された。昨年度までの研究結果をベースとして実施したこれらの研究により、さらなる研究の展開が見られた。特に本年度力を入れたフロントライン研究では、多くの有用な情報が現場での研究から得られた。PCR をベースにする各種の解析法（各病原遺伝子の検出に特化した PCR 法、MPN-PCR 法、multiplex PCR 法など）がアジア諸国における食品を含む環境サンプルや患者サンプルの調査において有効に活用され、これらのサンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細が明らかになった。実用的研究においては、各種検査・診断法の実用化が実際のサンプルを用いた性能の評価試験の段階に入っているものが多く、今後これらの実用化およびそれらによってアジア各地から得られる解析結果が期待できる。病原性・ゲノム解析の研究に関しては、本年度はそれらの研究結果がワクチンや新治療薬の開発などの実用的な研究に繋がる可能性の高い菌種に的を絞って実施し、それぞれ良い結果が得られた。

#### 分担研究者：

- 西淵 光昭：京都大学東南アジア研究所教授
- 山崎 伸二：大阪府立大学大学院薬学研究科教授
- 江原 雅彦：長崎大学熱帯医学研究所教授
- 西川 禎一：大阪市立大学大学院生活科学研究科教授
- 大澤 朗：神戸大学大学院農学研究科教授
- 江崎 孝行：岐阜大学大学院医学系研究科教授
- 飯田 哲也：大阪大学微生物病研究特任教授
- 山崎 渉：宮崎大学農学部獣医学科准教授
- 甲斐 明美：東京都健康安全研究センター部長
- 倉園 久生：帯広畜産大学畜産衛生学研究部門教授
- 林 哲也：宮崎大学教授
- 藤井 潤：九州大学大学院医学研究院准教授
- 山本 友子：千葉大学大学院薬学研究科教授
- 神谷 茂：杏林大学医学部感染症学教授
- 辻 孝雄：藤田保健衛生大学医学部教授
- 渡邊 治雄：国立感染症研究所所長
- 山本 達男：新潟大学大学院教授医歯学総合研究科教授
- 野田 公俊：千葉大学大学院医学研究院教授

#### A. 研究目的：

研究代表者と研究分担者（いずれも我が国の第一線で活躍する腸管感染症研究の専門家）は、本研究事業の最終目標（アジアの途上国の人々の健康改善）を再認識しながら、H21-22年度に「グローバル化、多様化、ボーダーレス化、多角的研究、フロンティア研究」をキーワードとしてアジアのコレラ・腸管感染症問題に関する研究を遂行してきた。これらの研究に対する評価は全般的に好意的であったので、本年度は、今までの基本姿勢を維持しながら、評価者のアドバイスを取り入れ、かつ最新のアジア情勢の変化に即応するための布陣で研究を展開する。

研究内容は、1)下痢症の多発・伝播が未だに防止できていないアジア諸国で、現地研究者と共同で疫学・生態学研究を進め、情報収集・情報交換をするフロントライン研究、2) 共同研究現場で活用できる実用的研究（検査法、診断法、治療法）、3) 治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析に大別される（添付した流れ図参照）。また、アジアの途上国で問題になっているか、今後問題になりそうな感染症を中心にできるだけ多くの下痢症をカバーするように研究分担者を選んだ。

アジアにおける腸管感染症研究は、米国と日本の協力のもとに現地研究者を巻き込んで展開してきた。昨年12月に京都で開催した日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症合同部会の参加者数は、まさに変容するアジア

ア情勢を反映していた：台頭する東アジア（中国6名、韓国1名）と南西アジア（インド7名、バングラデッシュ7名）に対して、結束を強める ASEAN の国々（4カ国合計7名）を、米国（12名）がかなりの経済支援によりサポートしていた；アジア諸国に地理的・文化的・思想的に近い日本（61名）に求められるものは、経済支援より、草の根的共同研究（米国の評価）を通じた技術・学術的サポートである。これは、評価者の1名のご意見「日米医学協力計画における研究の方向性、アジア地域への貢献等に関する記載が薄く、どのように関係するかが見えにくい」に代表される重要な点である。そこで本年度は、研究内容1)と2)を強化した布陣にした。1)では今後重視しなければならないインドおよび中国を含めた国々と共同研究体制が確立しており、情報収集・情報交換の窓口となる研究分担者、2)では途上国で有用な技術の開発・普及（例えば LAMP 法による PCR）が可能な研究分担者を追加した。

## B. 研究方法：

研究分担者それぞれが、申請した内容に合致した結果を得るために専門性（分子遺伝学、分子疫学、細胞化学、免疫学、環境生態学、生理学、病理学などの分野）を生かして、必要な技術を適宜組み合わせそれぞれの研究室単独で、あるいは研究協力者と役割を分担して、研究を遂行した。具体的

には、交付申請書に記載した流れ図（下記：最終ページ）に示した方法を用いて研究を実施した。

なお、病原性細菌はそれぞれのセイ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：

各研究者（下記の流れ図に記載した順）について、申請書に記載した研究計画（以下「計画」と省略）およびそれに対応して得られた結果を以下にまとめた。

1) フロントライン研究：アジア諸国での感染症の疫学、菌の生態学

### (1) [西瀝]

計画：東南アジア5カ国の研究者との共同研究。5種の病原体による下痢症の発生・伝播に影響する様々な要因の解析を継続；中国（山東省）の西瀝ラボと山東省 CDC との MOU 締結完了と共同研究開始を目標。

結果：マレーシアとの共同研究により、現地の一般市場のみならずスーパーマーケットで販売されている市販食

材や食品が、食中毒原因細菌に汚染している実態を明らかにした：フルーツジュースおよび合成原料を用いたジュース（コレラ菌）、淡水魚（腸炎ビブリオおよび類似菌）、野菜サラダ材料用生野菜およびベジタリアンバーガー（食中毒原因サルモネラ菌およびチフス菌）、生および調理後の鶏肉（カンピロバクター菌）、リステリア菌（チキンバーガー）。高感度 PCR-MPN 法を採用したためにこれらの菌の検出が可能となった。主として衛生状態の問題が汚染の原因であると考えられる。一方タイ南部では、PCR 法をベースにした方法を用いて、魚介類の宝庫的存在である汽水湖の環境水が複数の病原性ビブリオ属菌種をかなり高濃度で含んでいることを示した（以上発表論文参照。）ベトナムでの高感度検査法を用いた共同調査を継続した結果、市販魚介類（特に二枚貝）が腸炎ビブリオ病原性株によりかなり汚染していることを示す結果が得られた。シンガポール環境庁傘下の環境保健研究所と食品の安全性に関する共同研究を実施することに合意し、MOU 締結の準備が進行中である。中国における食品の安全性に関する共同研究を目指した（山東省）の西瀝ラボと山東省 CDC との MOU 締結は前進が認められなかった。山東省 CDC の代わりに上海海洋大学を選び、西瀝研（京都大学東南アジア研および山東省の西瀝ラボ）との間で 2012 年 3 月 2 日に MOU を締結し、中国での魚介類の安全性に関する共同研究（高感度検

査法を用いた菌の生態学および疫学を中心とする研究）を実施することになった。

やはり東南アジア諸国は、衛生状態と気候が我が国とは異なるので、食材を含む環境の食中毒菌汚染が問題である。高感度検査法などの先進技術を投入して、現地研究者と協力してさらに詳しい調査を実施することが、大量の食材をこれらの国々から輸入している我が国にとって重要であると言える。

(2)[山崎伸二]

計画：インドの共同研究者と連携し、患者・環境からコレラ菌の分離。細菌学的性状、DNA フィンガープリントや病原因子プロファイルの解析  
結果：本研究では、インドとの共同研究において下痢患者から分離された O1 コレラ菌 472 株（インド由来 468 株、バングラデシュ由来 4 株）、O139 コレラ菌 84 株（インド由来 61 株、バングラデシュ由来 23 株）、non-O1/non-O139 コレラ菌 196 株（全てインド由来）を本実験に用いた。下痢症患者から分離された各種血清型のコレラ菌の病原遺伝子の分布に基づく分子疫学的解析を行った。特に近年新たに見つかった ADP リボシルトランスフェラーゼであるコリックストキシン（*ctxA*）遺伝子の分布について調べた。調べた 765 株のコレラ菌（O1、485 株、O139、84 株、non-O1/non-O139）のうち non-O1/non-O139 の 53 株で *ctxA* 遺伝子が陽性となった。陽性となった 53 株中 43 株で *ctxA*、*tcpA*、T3SS に関す

る遺伝子は陰性であった。これら 53 株の *chxA* 遺伝子の全塩基配列の解析から、ChxA は 3 つのクラスターに分類された。

従って、ChxA は、non-O1/non-O139 コレラ菌に特異的に存在しており、少なくとも 3 種類のバリエーションが存在するが、いずれのバリエーションも、マウス肝臓に障害を与える病原性因子であることを明らかとした。今後は、Non-O1/non-O139 コレラ菌のこの新たな病原性因子が、ヒトの健康被害の原因になるか否か等を調査する必要性がある。

### (3) [江原]

計画：長崎大学熱研のベトナムでの共同研究拠点をベースに、北部・南部ベトナムでの O139 コレラ菌と vibriophage の分布状況の共同調査。

結果：ベトナムでのビブリオフィージの検出は 2006 年から開始され、現在に至っている。この間、南部、および北部の環境水検体より、線維状ファージ、fs1、fs2、およびカップファージの検出を行い、広くこれらのファージが分布していることを明らかにした。2010 年に北部ベトナムで分離した *Vibrio cholerae* O139 の性状を明らかにし、それより分離した線維状ファージ ND1-fs1 のゲノムの塩基配列を決定した。また、線毛産生コレラ菌 Bgd17 (fimbriate Bgd17) の固定死菌を家兎に免疫し、アジュバントなしで、抹消血中に抗線毛抗体が上昇することを確認した。

これまでベトナムでの O139 コレ

ラ菌に関するデータはほとんど知られていなかったが、江原らが、2007 年以来本研究まで継続した結果から、ベトナムの南部から北部にいたるまで、広範囲にわたって O139 コレラ菌が産生したと思われるファージ (podoviridae) が存在することや線維状ファージ fs1、fs2 が存在 (holerae) が O1 抗原、ctxA、B gene を horizontal gene transfer で獲得し、さらに線維状ファージ fs1、fs2 を獲得することが非病原株から病原性のある流行株に変化する可能性があることが示唆される。

以上から、ベトナムの環境中には全域にわたってコレラ菌の病原性菌株または、病原性株に変化するコンポーネントが分布していると言えるので、自然に獲得することはすでに環境株となった O139 コレラ菌が存在することを示唆している。したがって、ベトナムで下痢の調査をする際には O139 コレラ菌の抗血清、プライマーを準備することが必要であると言える。また環境水中に存在するいわゆる非病原性の NAG ビブリオ (Non-O1, non-O139 *V. c* 免疫ができあがっていない海外旅行者は、ベトナム訪問時には、コレラに罹患しないよう飲食物に注意する必要がある。

### (4) [西川]

計画：インドと韓国での共同研究。腸管毒素原性大腸菌 O169 : H41 の汚染源の探索。非定型下痢原性大腸菌の病原性と病因学的意義の解明。

結果：下痢原性大腸菌 (DEC) のコロニーを混在する非病原性の類似菌と



的確に識別し分離するための手法を開発した。疎水性格子膜を用いてコーンハイブリダイゼーションを実施したところ、増菌後の培養液中に DEC が 103/ml 前後の低濃度で存在する場合でも分離が可能となった。先に報告したマルチプレックスリアルタイム PCR 法によるスクリーニングと併用すれば精度の高い疫学調査を行えることが、食品や糞便を用いた試験でも実証された。

今後本検査法を用いてアジアの発展途上国における共同研究を展開することにより、DEC による下痢発生状況が明らかになるであろう。

#### (5) [大澤]

計画：東南アジア 4 カ国での共同研究。現地環境水や魚介類等における下痢原性コレラ菌および関連細菌群の分布および動態の研究。

結果：PMT 寒天培地上で *V. cholerae* 様の性状を示すインドネシアの環境水由来の菌に対し、コレラ毒素遺伝子 (*ctxAB*) を標的とした Primary-PCR、Nested-PCR を行ったところ、7 株で約 1kb の PCR 産物が得られた。*ctxAB* の塩基配列を解析したところ、3 株が Classical 型、4 株が El Tor 型のコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) を保有し、コレラ毒素 A サブユニット (*ctxA*) の配列に関してはいずれも共通の配列を保有していた。7 株は Ribosomal DNA の塩基配列解析より、1 株が *V. cholerae*、3 株が *V. cholerae* とは異なる種の *Vibrio* 属菌、3 株が *Aeromonas* 属菌と同定された。これら

の所見より、コレラ毒素を保有するバクテリオファージが種や属を越えて水平伝播することが示唆された。

今後この方法によって、周辺国の環境水を検査することにより、従来知られていなかった、コレラ菌および関連細菌の分布および疫学が明らかになる可能性がある。

#### 2) 実用的研究 (検査法、診断法、治療法)

##### (1) [江崎]

計画：食材中の主要な下痢症病原体すべてを単独の培地で増菌・選択する方法の有効性を野菜とミルクを対象に実証；病原体をカクテル増幅し、増幅産物を目視で判定するクロマト法を完成。

結果：食中毒を起こす多種類の病原体をスクリーニングする共通の増菌培地法を開発し、その利用法を検証した。サルモネラ、出血性大腸菌、セレウス菌、ビブリオでは 25g に 1 個を 4 時間培養で達成、リステリア、カンピロバクターは一夜培養で目標を達成した。冷凍肉はアルコバクターに 7 割が汚染、新鮮鶏肉は 8 割がカンピロバクターに汚染されていた。一般に使用されているボルトン増菌法は耐性菌のためわが国の鶏肉検査にはもはや適用できないことが実証された。

大きな最終目標に向かって動いてきた本プロジェクトは、本部会のフラグシッププロジェクトと言える。予想よりペースはやや遅いが、現在では実用化に際しての問題点発見と微妙な

軌道修正の段階に入り、着実に前進している。途上国でも適用可能なシステムであると考えられる。実用化に向けた改良を含む今後のさらなる進展に期待したい。

## (2) [飯田]

計画：次世代シーケンサを用いた迅速診断法の構築を継続：あらゆる下痢症病原体、新規病原体の同定、病原体と腸内細菌叢の動態解析。阪大微研のタイの研究拠点も利用。

結果：本研究では、次世代シーケンサを用いバングラデシュ小児の糞便中の細菌叢の比較解析を行った。適正体重児に比べ低栄養児では糞便中の細菌フローラの多様性が低くなっていた。また、低栄養児においては偏性嫌気性菌群である *Bacteroidetes* が減少し、比較的好気的な *Proteobacteria* の比率が顕著に増加している傾向がみられた。特に *Proteobacteria* の中でも *Klebsiella* 属や *Escherichia* 属といった菌群の比率が顕著に高かった。このような偏った腸内フローラをもっていることが低栄養児の感染症などへの易感受性に関与している可能性がある。

最近バングラデシュの ICDDR, B では、小児下痢症の原因について単なる病因論的な解析研究のみならず、栄養状態や母乳の供給率などの種々の環境要因の影響を調べる動きが活発になっている。特にコレラワクチンは大人には効果があるが、小児にはほとんど効果がないことが問題になっている。腸内細菌フローラの改変がコレラ

ワクチンの効果を改良する可能性に関して、最近研究代表者（西淵）らのグループが現地研究者と共同で二重盲検プラセボ試験を実施した（発表論文 1）。その結果得られた知見と本研究で得られた結果はある程度整合性があり、バングラデシュの小児の健康改善に向けて今後この点をさらに詳しく追求してゆく価値があると思われる。

## (3) [山崎渉]

計画：3 細菌種について、LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による魚介類からの簡便・迅速・高感度検出法の開発とタイにおける普及活動。

結果：LAMP 法を用いて、腸炎ビブリオの主要な病原遺伝子の一つである *trh* の迅速鑑別法の開発を試みた。80 株の腸炎ビブリオコロニーを供試して有用性を検討した。自家製反応試薬を使用することによって、1 反応あたりの費用を 100 円以下に削減することができた。LAMP 法は既存の PCR 法よりも迅速であり、DNA 抽出開始から 90 分以内に判定が可能であった。しかし、診断的特異度は 100% (20/20) であったものの、診断的感度は 93.3% (56/60) と不十分であった。実用化のためにはプライマーの再設計等のさらなる改良が必要であると思われた。

現在、FAO/WHO の提案に従って、魚介類に関する世界レベルでの安全性規範作成が起動にのって、国際的な基準作りが進行中である。その再問題になっているのが、世界中で適用可能

な簡便、迅速、かつ高感度な統一された検査法が確立されていないことである。また *trh* 遺伝子に関しては、定量データが不足しているため、その病原的意義を疑問視する学者が一部に存在する。そのため、研究代表者は、発展途上国でも使用可能な方法（LAMP 法を含む）を提唱して、世界各地で実証試験を開始している。ただし、LAMP 法の試薬のコストの問題と、腸炎ビブリオの *trh* 遺伝子については、塩基配列のバラツキによる現存プライマーの弱点が指摘されており、足踏み状態である。本研究は、成功すればこれらの弱点をカバーできる画期的な研究となるので、研究がもたらす結果は重大である。今後この研究はアジアの途上国を巻き込んだ共同研究に発展する可能性が高いと思われる。

#### (4) [甲斐]

計画：輸入食品中の下痢症原因細菌の高効率検査法および分離菌の同定に役立つ菌の特徴の探索。

結果：食品（いかの塩辛）を対象に、TDH 産生性の腸炎ビブリオの検出法を検討した結果、12 検体中 9 検体から目的菌を検出することができた。今回の検討から、以下の 3 点が明らかになった。(a)大量培養の培養液を対象としたスクリーニング試験を実施することで、的を絞った検査が可能になり、検出感度の上昇と作業の効率化を図ることが可能であった。(b)免疫磁気ビーズ法を用いて集菌することにより、目的とする血清型菌の釣菌が可能になること、また、培養液中に、腸炎ビ

ブリオ以外のビブリオ属菌が多い場合も目的菌を濃縮できる効果を確認できた。(c)分離平板としての酵素基質培地は、培養時間が長くなっても色調変化が少なく、目的とする菌の色調が明確で釣菌しやすいという利点を確認された。これらの方法を食品検査に応用することは、検査精度や作業効率の上昇のために有効であることが明らかとなった。

食品から病原性の確立されたビブリオ属細菌を検出するのは、容易ではないので、検出感度を改良するための様々な試みがなされている中で、免疫磁気ビーズ法や特殊な発色性に基づく選択培地の適用は、注目されている方法であり、首都の責任あるオーソリティーが得た結果による裏付けは、行政的に重要な意味を持つ。また大量培養法による検査は、現実的に実施が難しいであろうという観点から避けられてきたアプローチであり、今回得られた結果は大変興味深い。

#### (5) [倉園]

計画：精製に成功したサルモネラ属菌のエンテロトキシン (Stn) を用いて、その作用機作を解明。Stn を標的とする特異的な迅速診断法の開発。

結果：サルモネラエンテロトキシン遺伝子 (*stn*) はサルモネラ属菌特異的な存在が証明されており、今日ではサルモネラ属菌のマーカー遺伝子として広く知られている。本研究においては、患者及び食品由来の様々なサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子配列を解析し、本遺伝子配列が血清型間で高く保

存されている事を明らかにした。一方で、血清型 Enteritidis 及び Agona の *stn* 遺伝子内部に終止コドンの保存が確認され、遺伝子配列の高い相同性にもかかわらず、Stn タンパク質の構造が血清型により大きく異なる事が明らかとなった。今後、サルモネラ属菌感染症の分子機構を理解する上で Stn の構造と病原性の相関解析が必要である。

長年かって成功した Stn(蛋白)の精製と、それに対する特異抗体の作成、*stn* 遺伝子の検索システムの確立は、ついにこの研究のギアを結果の実用化へ向かってシフトさせることを促した。早々に Stn タンパク質の構造が血清型により大きく異なることなど、興味ある事実が明らかになっている。今後は、このような結果と Stn の起病性との関係の再評価を含めて、研究課題が多々あると言える。

#### (6) [林]

計画：新たな腸管感染症起因菌として確立される可能性のある *Escherichia arbertii* の大腸菌との比較ゲノム解析。菌の同定・鑑別に利用できる遺伝子マーカーの探索。

結果：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 275 株の進化系統解析によって *E. albertii* に分類された 26 株について、遺伝的・生化学的性状を解析した。その結果、本菌の遺伝的特性として、①マイナーな intimin サブタイプの保有、②cdtB 遺伝子 (バリエント II, III,

IV 型) の保有、また、生化学的性状として、④非運動性、⑤xylose や lactose の非分解などが明らかとなった。さらに、26 株中 13 株はヒト患者由来であること、2 株が *stx2f* 遺伝子を保有することから、本菌のヒト腸管病原菌また志賀毒素産生菌としての重要性も示された。現在、4 株のゲノム解析を進めており、予備的な解析から、本菌と大腸菌が明らかに遺伝的に異なる菌種であることが明らかになった。

今後、菌種内・菌種間でのゲノム比較をさらに進めるとともに、本菌のヒト及び動物での常在性と病原性を明らかにする予定である。

#### (7) [藤井]

計画：マウスモデルで、アジスロマイシン (AZM) の腸管出血性大腸菌 O157 急性脳症に対する治療効果を評価。大黃と AZM の併用による O157 感染症の新規治療法を開発予定。

結果：2009 年、米国の研究グループから無菌仔ブタに STEC を経口感染させるモデルで、マクロライド系アジスロマイシン (AZM) が急性脳症に有効であることが報告された。この報告を受けて私達の開発した STEC 経口感染マウスモデルを用いて AZM の効果を調べた。その結果、AZM は STEC からのベロ毒素分泌を抑制することにより、体重当たり 1.6  $\mu$ g/g の僅かな量でもマウスは 80%生存した。さらに漢方生薬である大黃を併用することで、AZM の効果をいっそう高めることに成功した。

腸管出血性大腸菌による脳症は死

に至る可能性のある重篤な疾病であるので、少なくとも我が国や先進国では重要な疾病である。にもかかわらず、この原因を明らかにして、治療法を確立するための研究を実施している研究者があまりいない状況である。本研究分担者は、長年この問題に取り組み、毎年新たな知見を報告しており、頭が下がる思いである。アジアを含めて、発展途上国では、腸管出血性大腸菌 O157 型による感染症事例報告はほとんどない。しかし、研究代表者が着手した O157 型以外の腸管出血性大腸菌による症例の調査の結果によっては、発展途上国でも意義深いものとして直ちに評価される可能性はある。またアジア各国で急激に進んでいる都市化は、これらの国々の衛生状態をいずれ先進国の状態に近づけることは間違いないので、その時点を視野に入れると本研究の意義が十分理解できる。

### 3) 治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析

#### (1) [山本友子]

計画：サルモネラ全身感染症制圧のための生ワクチン開発に向けた基礎研究。発症の中心となるマクロファージ細胞内寄生の分子機構と制御機構の解明。

結果：サルモネラの病原戦略の分子基盤は、エフェクター（病原分子）と宿主細胞標的分子間の相互作用にあるが、感染後の多岐にわたる変化は未だ同定されていないエフェクターと標的分子の存在を強く示唆している。本

研究ではバイオインフォマティクス的手法を導入して新規エフェクターを探索した。本研究で確立したメタアナリシスはエフェクター候補として予測された top-40 に 36 件の既知エフェクターを含む信頼性の高いツールであった。この中で 13 位にランクされた GogA の機能解析を行った結果、GogA は宿主マクロファージの caspase-8 活性化に関わる新規エフェクターであることが明らかとなった。

本研究の結果は、平成 23 年度 浅川賞（日本細菌学会）に値した研究分担者の長年の地道な研究の価値を代表するものである。この種のタイプの病原細菌による感染症の征圧には、ワクチン接種による予防法が非常に効果的であることは明らかである。発展途上国の衛生状態は、さらにその価値を引き上げることは間違いない。研究の継続と最終結果の達成が待ち望まれる。

#### (2) [神谷]

計画：ヘリコバクター・ピロリの感染症診断法の評価や治療法開発のために、本菌と口腔内細菌との相互作用（病原遺伝子発現、動物モデルにおける *S. mutans* との共凝集性）を検討。

結果：口腔はヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) のリザーバーとしての役割を担っているとされている。口腔内特に歯周病患者のデンタルプラーク中より *H. pylori* が検出されることがその理由である。しかしながらこうした研究において *H. pylori* は PCR による DNA レベルでの検出が主であり、生

菌での検出はほとんどがなされていない。そこで *H. pylori* が口腔内に定着しているのかについて、歯周病細菌から受ける影響という点より検討を行った。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の培養上清は *H. pylori* に抗菌的な作用をもたらした。また培養上清中の酪酸が *H. pylori* に対する抗菌性を示すことが明らかとなった。以上の結果より *H. pylori* が口腔内特に歯周病バイオフィルム中で長期生存することは難しいことが示唆された。

アジアでは、我が国のみならず、*H. pylori* による感染症の影響を憂慮せざるを得ない国々が多々ある。今研究の興味ある生態学的発見の恩恵は、これらの国々まで広がると言える。

### (3) [辻]

計画：毒素原性大腸菌の未解析株の *Ent* プラスミドの解析と病原遺伝子の探索。弱毒変異志賀毒素などを抗原とする低侵襲性粘膜ワクチンアジュバントへの応用の検討。

結果：腸管出血性大腸菌感染症のワクチン抗原を大量生産し、粘膜ワクチンとして応用するために、リンコマイシンを誘導剤とした志賀毒素 (Shiga toxin 2; Stx2) と弱毒変異毒素 (mStx2) の大腸菌でのリコンビナント蛋白発現系を作製した。1L 培養あたり 50-100mg レベルの高収量で精製された mStx2 で皮下免疫されたマウスの血中には A、B 両サブユニットに対する IgG の産生が認められた。また、免疫マウスを高致死量の Stx2 で腹腔内チャレンジしたところ、100 倍致死量

まで完全防御することができた。本発現系は EHEC 感染症による HUS 予防ワクチンの大量産生系として有用であることが明らかとなった。

腸管出血性大腸菌感染症のワクチン開発に関する研究があまり進んでいない状況下で、その試みと得られた興味ある結果は評価に値する。ワクチン効果のヒトにおける何らかの評価やワクチンに対する獲得免疫の安定性 (小規模な抗原変異、in vivo での自然な DNA 組み替えによるワクチン耐性型菌株の出現) などの評価実験がどのような結果を示すかが興味ある点である。

### (4) [渡邊]

計画：の Type III 分泌装置の発現調節機構の解析。得られた結果と関連する知見を応用赤痢菌してワクチン候補株の検討。

結果：赤痢菌の主要な病原因子 Type III 分泌装置 (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。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、それに関わる因子として細菌の主要な RNA 結合蛋白である Hfq と新規の因子 RodZ を見出した。hfq 欠損株は TTSS を初めとする病原遺伝子群の発現が増加しているにも関わらず、生体内での生存性が低いため、生ワクチンの候補株として有用な可能性がある。本研究ではこれまで行って来た病原遺伝子群の解析を進めると共に、モ

ルモットの結膜炎モデルを用いてワクチン候補株の評価を行った。

今後は、選択された候補菌株の実験動物における安全性と免疫原性の評価をおこない、最終的な絞り込みを経て、ヒトでの試験が必要である。細菌性赤痢が腸管感染症のかなりの部分を占めるアジアの発展途上国には、朗報である。

#### (5) [山本達男]

計画：カンピロバクター について、ゲノム解析等を駆使し、病原因子としての高速運動駆動ユニットの構造解析と粘液中の運動解析。運動性阻害薬を探索。

結果：*Campylobacter* 感染症は鶏肉の消費に伴って世界中で増加しており、細菌性食中毒（下痢症）の主要な位置を占める。旅行者下痢症の側面も注目されている。多くの場合腸炎と関連する。主症状は下痢、腹痛、発熱で、小児では血便を伴い、サルモネラや細菌性赤痢との鑑別は一般に難しい。また、深部感染症である菌血症や Guillan-Barré syndrome (GBS) あるいは Miller Fisher syndrome (MFS) と関連することがある。わが国の場合、*Campylobacter* 食中毒は発生件数で見るとサルモネラや腸炎ビブリオによる食中毒を凌ぎ、2003 年以来細菌性食中毒の一位を占める（2010 年）。*Campylobacter* 属には少なくとも 25 種類の菌種が含まれるが、食中毒の大部分は *C. jejuni* が原因で、*C. coli* がそれに次いで 1-25% を占める。*C. jejuni* や *C. coli* は両端に 1 本ずつ長い鞭毛をも

った双毛性のらせん菌で、強い運動性を示す。*Campylobacter* の病原性因子は特定されていないが、鞭毛による運動性が腸管への菌の定着や侵入過程で重要な働きをすると考えられるようになってきた。従来からの研究で、*C. jejuni* や *C. coli* などの *Campylobacter* 属らせん菌だけが両極に特異な骨格構造をもつことをつきとめ、*Campylobacter* high-speed-driving unit (CHSDU) と命名して、*Campylobacter* 運動特性の解明と CHSDU 構造の解析を進めてきた。結果は以下の如くである。

(a) 環境温度 (20°C) では非運動性で、人体温度 (37°C) あるいは鶏体温 (42°C) で >100  $\mu$  m/s もの高速で遊走する。細菌で最速である。運動性が最も重要な病原因子であると考えている。

(b) *Campylobacter* だけが両菌端に CHSDU 構造をもつ。確認した菌種は *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. lari* である。

(c) Black ら (1988) は桿菌状の菌体は非運動性であると結論しているが、桿菌状でもらせん菌と同じ高速運動性を示すことを確認した。高速運動にらせん形態は必須ではない。CHSDU 構造が重要である。

(d) *C. coli* で CHSDU 構造がらせん菌体から“とれてしまい”、小さな球状構造となる場合がある。この構造は、*Campylobacter* のコッコイド（例えば集落で自然に作られる大きな球状形）とは異なる。

(e) 現在、CHSDU 構造の解明を進めており、特異的な阻害剤を探索中である。このような阻害薬は *Campylobacter* 感染症の予防や治療に応用可能である。*Campylobacter-free* 鶏の作製への応用も期待される。

*Campylobacter* の重要な病原因子は運動性と言われてきたので、本研究は病原性機構の解明が予防や治療に繋がることを示す重要な研究である。

#### (6) [野田]

計画：腸管出血性大腸菌の新規病原因子である SubAB の細胞致死作用の研究：新たなアポトーシスマーカーの同定と作用機序の解析。マウスを用いた病態発現機序の解析。

結果：腸管出血性大腸菌(EHEC)の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) のマウスに対する病態解析結果から、SubAB は毒素投与後、6 時間で劇的な血小板の減少を認め、48 時間後には腸管内に大量の出血、脾臓の萎縮、IL6 等のサイトカインの誘導を伴う致死に至ることが判明した。

SubAB が EHEC の新たな重要病原因子である可能性を示唆する貴重な地検である。今後 SubAB の病原性機構の詳細な解明とその予防・治療法解明への応用研究の展開が期待される。

#### D. 考察

フロントライン研究 (アジア諸国での感染症の疫学、菌の生態学)、実用的研究 (検査法、診断法、治療法)、および治療・予防の基礎となる病原

性・ゲノム解析に大別して実施した本年度の研究は、それぞれの分担計画をほぼ達成していると言える。昨年度までの研究成果をベースとして実施したこれらの研究により、さらなる研究の展開が見られる。

特に本年度力を入れたフロントライン研究では、多くの有用な情報が現場での研究から得られた。PCR をベースにする各種の解析法 (各病原遺伝子の検出に特化した PCR 法、MPN-PCR 法、multiplex PCR 法など) がアジア諸国における食品を含む環境サンプルや患者サンプルの調査において有効に活用され、これらのサンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細が明らかになった。特にマレーシアにおける共同研究では、様々な市販食材や食品が、コレラ菌、腸炎ビブリオおよび類似菌、サルモネラ菌、チフス菌、カンピロバクター菌、リステリア菌で汚染していることを示した。タイ、ベトナム、インドネシアでの共同研究では、魚介類やそれらが収穫される環境の汽水から腸炎ビブリオが分離・確認されている。今後さらなる共同研究によって、現地での情報を入手するために、シンガポールおよび中国 (上海) で MOU を締結したので、次年度も新たな情報の入手が期待できる。コレラ菌に関しては、3 名の研究分担者の成果報告 (インドの患者調査、ベトナムの環境水、インドネシアの環境水) があり、これらの総合的な解析により、広域にわたる菌の生態学的考察 (環境中の病原遺伝子の



分布と病原性株の出現の関係)が可能であると思われる。また、これまでにあまり情報が得られていない下痢原性大腸菌(DEC)の生態学に関する成果も本年度新たに参加した研究分担者によって報告された。

実用的研究においては、各種検査・診断法の開発が実サンプルを用いた性能の評価試験の段階に入っているものが多く(次世代シーケンサを用いた迅速診断法、LAMP法による魚介類からの腸炎ビブリオの簡便・迅速・高感度検出法、輸入食品中の下痢症原因細菌の高効率検査法、サルモネラ属菌のエンテロトキシンを標的とする特異的な迅速診断法)、今後これらの実用化およびそれらによってアジア各地から得られる解析結果に期待したい。さらに比較ゲノム解析による新たな腸管病原性菌種(*Escherichia albertii*)の発見やAZMを用いたO157感染症による急性脳症の新治療法開発に関する報告は、実用研究として高く評価できる。

治療・予防の基礎となる病原性・ゲノム解析の研究に関しては、本年度はそれらの研究成果がワクチンや新治療薬の開発などの実用的な研究に繋がる可能性の高い菌種(サルモネラ全身感染症、ヘリコバクター・ピロリ、毒素原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、赤痢菌)に的を絞って実施し、それぞれ良い成果が得られている。

## E. 結論

それぞれの分担計画はほぼ達成された。昨年度までの研究結果をベースとして実施したこれらの研究により、さらなる研究の展開が見られた。特に本年度力を入れたフロントライン研究では、多くの有用な情報が現場での研究から得られた。PCRをベースにする各種の解析法(各病原遺伝子の検出に特化したPCR法、MPN-PCR法、multiplex PCR法など)がアジア諸国における食品を含む環境サンプルや患者サンプルの調査において有効に活用され、これらのサンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細が明らかになった。実用的研究においては、各種検査・診断法の開発が実際のサンプルを用いた性能の評価試験の段階に入っているものが多く、今後これらの実用化およびそれらによってアジア各地から得られる解析結果が期待できる。病原性・ゲノム解析の研究に関しては、本年度はそれらの研究結果がワクチンや新治療薬の開発などの実用的な研究に繋がる可能性の高い菌種に的を絞って実施し、それぞれ良い結果が得られた。

## F. 健康危険情報

本研究では、PCRをベースにする各種の解析法(各病原遺伝子の検出に特化したPCR法、MPN-PCR法、multiplex PCR法など)を用いた調査により、アジア諸国における食品を含む環境サンプルが腸管感染症原因細菌種によって汚染している実態の詳細

が明らかになった。特にマレーシアでは、現地の一般市場のみならずスーパーマーケットで販売されている市販食材や食品が、食中毒原因細菌に汚染している実態を明らかにした：フルーツジュースおよび合成原料を用いたジュース（コレラ菌）、淡水魚（腸炎ビブリオおよび類似菌）、野菜サラダ材料用生野菜およびベジタリアンバーガー（食中毒原因サルモネラ菌およびチフス菌）、生および調理後の鶏肉（カンピロバクター菌）、リステリア菌（チキンバーガー）。タイ、ベトナム、インドネシアでの共同研究では、魚介類やそれらが収穫される環境の汽水から腸炎ビブリオが分離・確認されている。インドネシアなどの東南アジア 4 カ国での環境水や魚介類等における下痢原性コレラ菌および関連細菌群の分布が明らかになった。これらの情報は、国外からの訪問者にとって予防策の作成に役立つのみならず、現地政策者にとって対策作成の有用な情報となる。

また、本研究において *Escherichia arbertii* がヒト病原菌である可能性が示唆されたので、今後の研究が必要であると言える。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Matsuda, F., M. I. Chowdhury, A. Saha, T. Asahara, K. Nomoto, A. A. Tarique, T. Ahmed, M. Nishibuchi, A. Cravioto, F. Qadri. 2011. Evaluation of a

probiotics, *Bifidobacterium breve* BBG-01, for enhancement of immunogenicity of an oral inactivated cholera vaccine and safety: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Bangladeshi children under 5 years of age. *Vaccine*. 29(10):1855-1858.

2) Ubong, A. R. Tunung, A. Noorlis, N. Elexson, T. C. Tuan Zainazor, F. M. Ghazali, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and R. Son. 2011. Prevalence and detection of *Vibrio* spp. and *Vibrio cholerae* in fruit juices and flavored drinks. *Int. Food Res. J.* 18(3): 1111-1117.

3) Chen, Y., O. C. Stine, J. H. Badger, A. I. Gil, G. B. Nair, M. Nishibuchi, D. E. Fouts. 2011. Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC Genomics* 12(1): 294.

4) Noorlis, A., F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, T. C. Tuan Zainazor, J. Ponniah, R. Tunung, J. Y. H. Tang, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, Y. and R. Son. 2011. Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *Int. Food Res. J.* 18: 673-679.

5) Thongchankaew U., P. Mittraparp-Arthorn, P. Sukhumungoon, N. Tansila, T. Nuidate, M. Nishibuchi, V. Vuddhakul. 2011. Occurrence of potentially pathogenic vibrios and

- related environmental factors in Songkhla Lake, Thailand. *Can. J. Microbiol.* 57(11): 867-873.
- 6) Nillian, E., C. L. Ching, P. C. Fung, T. Robin, U. Anyi, T. Z. T. Chilek, S. Radu, and M. Nishibuchi. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw salad vegetables and vegetarian burger patties. *Food and Nutrition Sciences* 2: 1077-1081.
  - 7) Tang, J. Y., M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, F. M. Ghazali, A. A. Saleha, and R. Son. 2011. Transfer of *Campylobacter jejuni* from raw to cooked chicken via wood and plastic cutting boards. *Lett. Appl. Microbiol.* 52(6):581-588.
  - 8) Wong, W. C., C. F. Pui1, T. Z. T. Chilek, A. Noorlis., J. Y. H. Tang, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, S. Radu. 2011. Survival of *Listeria monocytogenes* during frying of chicken burger patties. *Food Nut. Sci.* 2: 471-475.
  - 9) Wong, W. C., C. F. Pui1, T. Z. T. Chilek, A. Noorlis., J. Y. H. Tang, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, S. Radu. 2011. Survival of *Listeria monocytogenes* during frying of chicken burger patties. *Food Nut. Sci.* 2: 471-475.
  - 10) K. Ogura, K. Yahiro, H. Tsutsuki, S. Nakagawa, S. Yamasaki, J. Moss and M. Noda. 2011. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 286: 37207-37215.
  - 11) R. J. Lara, S. B. Neogi, M. S. Islam, Z. H. Mahmud, B. B. Demoz, S. Yamasaki, G. B. Nair and G. Kattner. 2011. *Vibrio cholerae* in waters of the Sunderban mangrove: relationship with biogeochemical parameters and chitin in seston size fractions. *Wetlands Ecology and Management*, 19: 109-119.
  - 12) Ngo, T. C., Nguyen, D. T., Tran, H. H., Le, T. H., Nguyen, H. T., Diep, T. T., Nguyen T. P. L., Nguyen, B. M., Tran, N. D., Yamashiro, T., Morita, K., Nguyen, T. H., and Ehara, M. 2011. Imported dogs as possible vehicles of *Vibrio cholerae* O1 causing cholera outbreaks in northern Vietnam. *The Open Infectious Diseases Journal*, 5:127-134.
  - 13) Wang, L., M. Wakushima, Y. Kamata, and Y. Nishikawa. 2011. Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 53:264-70.
  - 14) Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. 2011. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diag. Microbiol.*

- Inf. Dis.. 270:307-315.
- 15) Pham Van Hung, Jiwei Zhang, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, *16SrDNA*, *groEL*, and *rpoB* gene sequences. Microbiol Cult.Coll. 2011;27:1-12.
  - 16) Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T. Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. Diag. Microbiol. Infect. Dise.. 2011;70(3):395-398.
  - 17) Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. Int. Syst. Evol. Microbiol.. 2011;61:1927-1932.
  - 18) Monira, S., S. Nakamura, K. Gotoh, K.Izutsu, H. Watanabe, H., N. H. Alam, H. P. Endtz, A. Cravioto, S. I. Ali, T. Nakaya, T. Horii, T., T. Iida, and M. Alam. 2011. Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. Front. Microbiol. 2: 228.
  - 19) Nakaya, T., S. Nakamura, Y. Okamoto, Y. Nagai, J. Kawai, Y. Hayashizaki, Y., T. Iida, and T. Horii. 2011. Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Human Specimens using an Unbiased High-throughput Sequencing Approach. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, Ed. Frans J. de Bruijn. Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), Hoboken, NJ, USA.
  - 20) Nakamura, S., T. Nakaya, and T. Iida. 2011. Metagenomic analysis of bacterial infections by means of high-throughput DNA sequencing. Exp. Biol. Med. 236: 968-971.
  - 21) Yamazaki, W., Y. Kumeda, R. Uemura, and N. Misawa. 2011. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated seafood samples. Food Microbiol 28:1238-41.
  - 22) Yamazaki, W. 2011. Sensitive and Rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using loop-mediated isothermal amplification, In: Otto Holst (Ed.) Methods in molecular biology -Microbial toxins methods and protocols-. Humana Press, Clifton, N.J., United States, pp13-pp22.
  - 23) Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K.,