

- Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., and Kohno S. 2011. *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*. 56: 999-1006.
- 24) M. Na-Ubol, P. Srimanote, M. Chongsa-nguan, N. Indrawattana, N. Sookrung, P. Tapchaisri, S. Yamazaki, L. Bodhidatta, B. Eampokalap, H. Kurazono, H. Hayashi, G.B. Nair, Y. Takeda & W. Chaicumpa. 2011. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res*, 133: 387-394.
- 25) Murakami T, Inoshima Y , Watanabe K-I , Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H. Ishiguro I. 2011. Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid*. 18: 112-118.
- 26) Monrat Chulanetra, Nitat Sookrung, Potjane Srimanote, Nitaya Indrawattana, Yuwaporn Sakolvaree, Manas Chongsa-nguan, Hisao Kurazono, Wanpen Chaicumpa. 2011. Toxic Marine Puffer Fish in Thailand Seas and Tetrodotoxin They Contained. *Toxins*. 3:1249-1262.
- 27) Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, DL. Paslier, T.Yamada, DR. Mende, GR. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, JM. Batto, M. Bertalan, N. Borrueal, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, HB. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T, Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, EG Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, WM. de Vos, S. Brunak, J. Doré, MetaHIT Consortium, J. Weissenbach, SD. Ehrlich, and P. Bork. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-180.
- 28) Mainil, J.G., M. Bardiau, T. Ooka, Y. Ogura, K. Murase, Y. Etoh, S. Ichihara, K. Horikawa, G. Buvens, D. Piérard, T. Itoh, and T. Hayashi. 2011. IS621-based multiplex PCR printing method of O26 enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Appl. Microbiol.* 111:773-786.
- 29) Kuwahara, T., Y. Ogura, K. Oshima, K. Kurokawa, T. Ooka, H. Hirakawa, T, Itoh, H. Nakayama-Imahiji, M. Ichimura, K. Itoh, C. Ishifune, Y. Maekawa, K. Yasutomo, M. Hattori, and T. Hayashi. 2011. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a nonculturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. *DNA Res*. doi:10.1093/dnares/dsr022.
- 30) Iguchi, A., H. Shirai, K. Seto, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Osawa, and R. Osawa. 2011. Wide distribution

- of O157-antigen biosynthesis gene clusters 1 in *Escherichia coli*. PLoS ONE 6(8):e23250.
- 31) Islam, K.B., S. Fukiya, M. Hagi, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, and A. Yokota. 2011. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141(5):1773-81.
 - 32) Islam, Md.R., Y. Ogura, Md. Asdulghani, T. Ooka, K. Murase, Y. Gotoh and T. Hayashi. 2011. A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. Plasmid 10.1016/j-plasmid.2011.12.001, in press.
 - 33) Ooka, T., K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, A. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A.T. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, and T. Hayashi. Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.*, in press.
 - 34) Murase, K., T. Ooka, A. Iguchi, Y. Ogura, K. Nakayama, Md. Asadulghani, Md. R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin and T. Hayashi: Hemolysin E- and enterohemolysin-derived hemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. *Microbiology*, in press.
 - 35) Sato, Y., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Meta-analytic approach to the acute prediction of secreted virulence effectors in gram-negative bacteria. *BMC Bioinformatics* 12:442 (12 pages)
 - 36) Kitagawa, R., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Micorbiol.* 157: 3094-3103.
 - 37) Yonezawa, H., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, C. Zaman, T. D. Woo, M. Takahashi, S. Matsubara, H. Kawakami, K. Ochiai, S. Kamiya. 2012. The destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.*, in press.
 - 38) Suzuki, M., K. Kiga, D. Kersulyte, J. Cok, C. C. Hooper, H. Mimuro, T. Sanada, S. Suzuki, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, S. Kamiya, Q. M. Zou, R. H. Gilman, D. E. Berg, C. Sasakawa. 2011. Attenuated CagA oncoprotein in *Helicobacter pylori* from Amerindians in Peruvian Amazon. *J. Biol. Chem.* 286: 29964-72.
 - 39) Ishida, K., T. Yamazaki, K. Motohashi, M. Kobayashi, J. Matsuo, T. Osaki, T. Hanawa, S. Kamiya, Y. Yamamoto, H. Yamaguchi. 2011. Effect of the steroid receptor

- antagonist RU486 (mifepristone) on an IFN γ -induced persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection model in epithelial HEP-2 cells. *J. Infect. Chemother.*, in press.
- 40) Mikura, S., H. Wada, M. Higaki, T. Yasutake, H. Ishii, S. Kamiya, H. Goto. 2011. Erythromycin prevents the pulmonary inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Trans. Res.* 158: 30-7.
- 41) Woo, T. D., K. Oka, M. Takahashi, F. Hojo, T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, H. Yonezawa, S. Kamiya. 2011. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain. *J. Med. Microbiol.* 60: 1617-25.
- 42) Yonezawa, H., T. Osaki, T. D. Woo, S. Kurata, C. Zaman, F. Hojo, T. Hanawa, S. Kato, S. Kamiya. 2011. Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Anaerobe.* 17: 388-90.
- 43) Hirao, S., H. Wada, K. Nakagaki, T. Saraya, D. Kurai, S. Mikura, T. Yasutake, M. Higaki, T. Yokoyama, H. Ishii, K. Nakata, T. Aakashi, S. Kamiya, H. Goto. 2011. Inflammation provoked by *Mycoplasma pneumoniae* extract: implications for combination treatment with clarithromycin and dexamethasone. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 62: 182-9.
- 44) Oguri, S., J. Matsuo, Y. Hayashi, S. Nakamura, T. Hanawa, T. Fukumoto, Y. Mizutani, T. Yao, K. Akizawa, H. Suzuki, C. Shimizu, K. Matsuno, S. Kamiya, H. Yamaguchi. 2011. Ciliates promote the transfer of the gene encoding the extended-spectrum β -lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 527-30.
- 45) P. Neri, N. Shigemori, S. Hamada-Tsutsumi, K. Tsukamoto, H. Arimitsu, T. Shimizu, Y. Akahori, Y. Kurosawa, T. Tsuji. 2011. Single chain variable fragment antibodies against Shiga toxins isolated from a human antibody phage display library. *Vaccine* 29:5340-5346.
- 46) P. Neri, S. Tokoro, R. Kobayashi, T. Sugiyama, K. Umeda, T. Shimizu, T. Tsuji, Y. Kodama, K. Oguma, H. Mori. 2011. Specific Egg Yolk Immunoglobulin as a New Preventive Approach for Shiga-Toxin-Mediated Diseases. *PLoS ONE* 6(10)e26526.
- 47) Jiro Mitobe, Itaru Yanagihara, Kiyohisa Ohnishi, Shouji Yamamoto, Makoto Ohnishi, Akira Ishihama and Haruo Watanabe, 2011. RodZ regulates the posttranscriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system. *EMBO report* 12(9) 911-916.
- 48) Furukawa, T.; Yahiro, K.; Tsuji, A. B.; Terasaki, Y.; Morinaga, N.; Miyazaki, M.; Fukuda, Y.; Saga, T.; Moss, J.; Noda, M., Fatal hemorrhage

induced by subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 2011. 50 (3-4), 159-67.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(研究分担者 江崎孝行)

核酸クロマトグラフ法を利用した肺炎原因菌の検出方法 PCT/JP2011/001934、
出願日：2011年3月30日、国際公開日 2011年10月6日

2. 実用新案登録
なし

3. その他

(研究分担者 藤井 潤)

月刊誌 公衆衛生情報にエピソードで覚えるリザーバー病原体ガイドを監修した。

監修：「レジオネラ症」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (6) pp24, 2010

監修：「ノロウイルス」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (7) pp31, 2010

監修：「ロタウイルス」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (9)

pp28, 2010

監修：「クリプトスポリジウム」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (10) pp32, 2011

監修：「オウム病」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (11) pp38, 2011

監修：「麻疹 (はしか)」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 40 (12) pp34, 2011

監修：「つつが虫リケッチア」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (1) pp8, 2011

監修：「レプトスピラ」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (2) pp26, 2011

監修：「ウェルシュ菌」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (3) pp37, 2011

監修：「破傷風」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (4) pp18, 2011

監修：「サルモネラ」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出版社, 41 (6) pp17, 2011

監修：「腸管出血性大腸菌感染症」、エピソードで覚えるリザーバー別病原体ガイド、公衆衛生情報 (株)ライフ出

版社, 41 (7) pp28, 2011

特別講演

1. 食肉や生食の危険を広く伝えることにより、腸管出血性大腸菌 O157 やカンピロバクターなどの細菌性食中毒の予防を考える。基調講演 食品安全シンポジウム in 北九州 北九州市 2011年1月26日

2. 経口感染症と食中毒～最近のトピックス～、大分県危機管理即応体制強化研修会 大分県 2011年3月23日

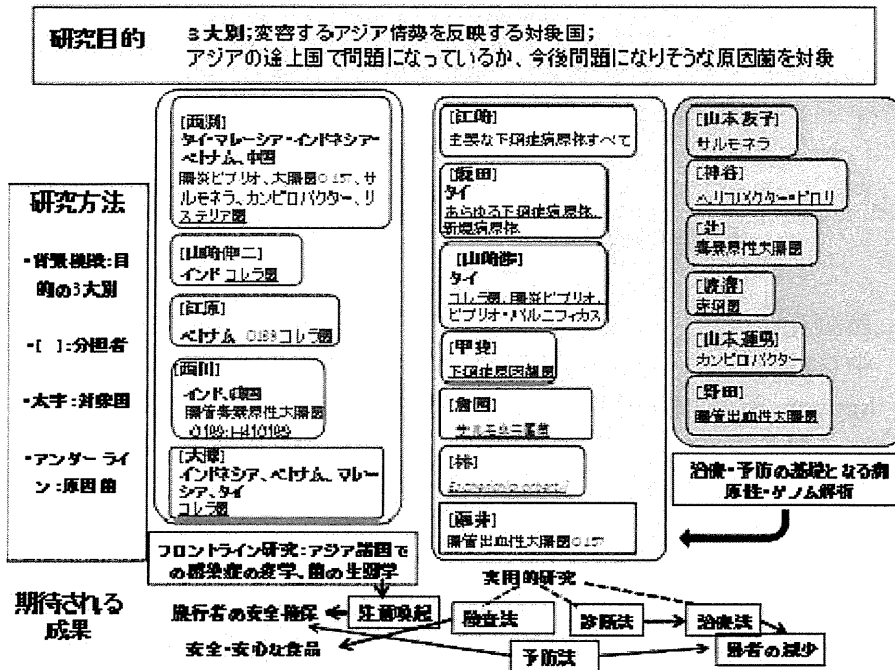
3. 食中毒、福岡市急患診療センター看護師研修会 福岡市 2011年7月9日

4. 腸管出血性大腸菌感染症の現状問題—わが国でのユッケによる O111 食中毒とドイツでの O104 大規模集団感染から—東北大学グローバル COE Network Medicine 創世拠点 NM 高等教育セミナー 2011年8月10日

5. 腸管出血性大腸菌感染症の現状問題、第 50 回福岡感染症懇話会、2011年12月16日

6. 腸管出血性大腸菌感染症における急性脳症の発症機序・診断と治療の展望、平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、札幌、2012年2月3日

7. 腸管出血性大腸菌感染症による脳症の病態と診断・治療法の開発、第 66 回秋田県感染症研究会、2011年2月21日



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

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

研究分担者	西沢光昭	京都大学教授
研究協力者	中口義次	京都大学助教
研究協力者	Nguyen Binh Minh	ベトナム国立衛生疫学研究所微生物学 部門長
研究協力者	Varaporn Vuddhakul	(タイ) プリンズ・オブ・ソンクラ大学
研究協力者	Son Radu	マレーシア・プトラ大学教授
研究協力者	Chengchu Liu	上海海洋大学教授
研究協力者	暮沼武士	青島誠誉食品検測有限公司副社長
研究協力者	Ng Lee-Ching	シンガポール環境保健研究所

研究要旨：

我々は、東南アジアで下痢症の発生・伝播に影響する様々な要因の解析を行ってきた。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。また下痢症の原因菌を含む食品の東南アジアおよび周辺国との輸出入が活発であり、アジアでは、東南アジアのみならず、東アジアを含めた共同研究を展開する必要があると考え、中国を加えたアジア 5 カ国の研究者と、5 種の病原体による下痢症に関する研究を継続あるいは新規に開始した。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（ジュース、生野菜、生および調理後の鶏肉、バーガー、淡水魚など）が、食中毒原因細菌（コレラ菌、腸炎ビブリオ、サルモネラ菌、チフス菌、カンピロバクター菌、リステリア菌など）に汚染している実態を明らかにした。これは、高感度 PCR-MPN 法を採用したために得られた成果である。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。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。シンガポールでは情報が不十分なので、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 を締結する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展開するため、上海海洋大学と、西沢研究室（京都大学東南アジア研究所および山東省の西沢研究室）との間で MOU を締結し、中国での魚介類の安全性に関する共同研究を実施することになった。以上の共同研究に

において、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。

A. 研究目的

我々は、東南アジアで多発する下痢症について、その発生状況のみならず、発生と伝播に関係する自然環境要因および社会・文化的環境要因について多数の国々と共同研究を展開してきた。その課程で、これらの国々では衛生状態のみならず、伝統的な食習慣や国民の経済力が重要な発生要因になっていることを示した。このようなローカルな要因のみならず、グローバル化の影響として、食中毒原因菌が輸出入食品に含まれて、国境を越えて移動していることを明らかにした。さらに先進国からのグローバル化の影響は、アジアの人々の食生活のスタイルや喫食する食品の内容影響を及ぼしている。しかし、アジアの途上国では、先進国のように衛生環境が良くないためその弊害が考えられる。本研究では、東南アジアでの下痢原因菌による食品や環境の汚染を高感度検査法を用いて調査する国際共同研究を実施した。さらに、東南アジアでは最も都市化した国家であるシンガポールおよび、経済的に東南アジアと非常に密接な関係を持つ東アジアの代表である中国との共同研究を開始することを試みた。対象とするのは、クラシクな下痢原因菌のみならず、国際的に重視されている輸出入食品を汚染する病原菌を選んだ。これらの国々において患者の発生状況や病原菌による

食材の汚染を明らかにするフィールド調査の結果とラボでの分離菌の詳細な解析結果および文化・社会的要因の影響を統合して、感染症の発生および伝播と人々の生活や衛生状態との相関関係を含めて感染症予防法を考察した。

B. 研究方法

1) 腸炎ビブリオの分離と検査：下痢患者から得た臨床サンプル（スワブまたは下痢便）を、直接 CHROMAgar Vibrio 寒天培地に接種し、腸炎ビブリオに特有な形状を示した集落について、生化学性状検査および遺伝学的検査（Kishishita et al. 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58:2449-57）により、腸炎ビブリオであることを確認した。海水や魚介類のような環境サンプルは、ある K6 抗原に対する抗体を感作させた免疫磁気ビーズで処理し、選択分離培地として、CHROMAgar Vibrio 寒天培地を使用した。同定した菌株について、PCR 法によって、*tdh* 遺伝子の有無、*trh* 遺伝子の有無、パンデミック株か否か（GS-PCR）を検査した。O:K 血清型は特異抗血清を用いたスライド凝集試験によって決定した。二枚貝から腸炎ビブリオを分離する場合は、増菌培養後、K 抗原に対する特異抗体を感作させた免疫磁気ビーズ法を適用した。貝の身をアルカリペプトン水を用いた増菌培養に続い

て、食塩ポリミキシンプイオンを用いた増菌培養を行った。その前後に特定のK抗原型を標的とする免疫磁気ビーズ処理を施し、ビーズを CHROMAgar Vibrio 寒天培地に接種した。改良法では、ビーズを寒天培地に接種せずに食塩ポリミキシンプイオン増菌培養に供し、必要に応じてこのステップを再度実施した後に CHROMAgar Vibrio 寒天培地に接種した。腸炎ビブリオに特有な形状を示した集落について、特異的なK抗血清を用いたスライド凝集試験によってスクリーニングに供した。陽性と判定された集落について、上記のように同定とPCR法による遺伝子型検査を実施した。

環境水中の腸炎ビブリオおよび関連する病原性ビブリオ属細菌種を培養法で検査する場合、メンブレンフィルター法と CHROMAgar Vibrio 寒天培地および TCBS 寒天培地を使用した分離培養法を用いた。生育してきた集落の腸炎ビブリオへの同定は、*toxR* 遺伝子を標的とする特異的PCR法 (Kim et al., 1999. J. Clin. Microbiol. 37:1173-1177) を用いた。また腸炎ビブリオを含む病原性ビブリオ属細菌種の同定は、PCR-RPLP法をベースにし、代表分離株の 16S rDNA 遺伝子の延期配列の決定によって確認作業を行った。培養法を用いないでフィルター上の濾過物のDNAを直接検査する場合は、denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法 (Eiler and Bertilsson. 2006. J. Microbiol. Methods 67: 39-348.) を用いて、標

準菌株との電気泳動パターンの比較に基づいて、菌種の有無を明らかにした。

2) サルモネラ菌・チフス菌の分離と検査：サンプル (カット果物) をペプトン水を用いた増菌培養後に、ボイル法によってテンプレートDNAを調製し、multiplex PCR を実施した。既報の *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium および *Salmonella* Typhi 検出用の標的遺伝子とPCRプライマーの塩基配列 (Soumet et al. 1998. Lett. Appl. Microbiol. 28: 113-117; Zhu et al. 1996. J Appl Bacteriol. 80: 244-251.) を参考にし、*Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium, および *Salmonella* Typhi を同時に検出できるプライマー3セットを決定し、プライマー濃度、マグネシウム濃度、および反応温度の組み合わせを調節して、multiplex PCR が実施可能な反応条件を設定した (Pui et al., Trop. Med. Health. 39:9-15)。標準的なMPN (most probable number [最確数]) 3本法と multiplex PCR法を組み合わせ、標的細菌 (群) の定量データを得た。

4) カンピロバクター菌の分離と検査：Bolton 選択培地、変法CCDA培地などを用いて培養し、カンピロバクター菌 (*Campylobacter* spp.) の菌量は、MPN-PCR法によって推定した (Lindquist, J. 2001. <http://www.jlindquist.net/general/micro/102di13.html> on 20/4/2007;

Whyte et al. 2004. Int. J. Food Microbiol. 95: 111-118)。

5) リステリア菌の分離と検査: : 野菜サンプルを *Listeria* Enrichment Broth (BLEB [Buffered *Listeria* Enrichment Broth], Merck 社)と選択物質(アクリフラビン、ナルジクス酸、シクロヘキサミド)を用いて 30°C で培養した。この培養法を MPN-PCR 法(3 本法)と組み合わせて、菌量を推定した。各試験管の培養液を PALCAM 寒天培地に接種し、各プレートに発育してきた典型的なコロニー 5 個以上を PCR 法で検査した。分離菌の液体培養液からボイル法で DNA テンプレートを作製し、PCR 法で検査した。*Listeria* spp. および *L. monocytogenes* について、それぞれ 16S rRNA 遺伝子と *hly* 遺伝子を標的とするプライマーを使用した。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオ: ベトナム、およびタイでの共同研究

ベトナムは、ドイモイ以後急速な経済成長を続け、二枚貝の生産(主として養殖)・国内消費・輸出が増加し続けている。特に輸出に関しては中国を対象にタイと競争状態にある。またグローバル化の影響を受けた健康食嗜好の傾向が見られ、生のカキを含む魚介類の消費が増加している。前年度の調査で、下痢患者の約 10% が腸炎ビブリオ感染症であり、分離菌の大部分がパンデミック・クローンによる感染症であることがわかった。今年度は、未検査の患者分離株を検査し、これを確認するとともに、魚介類(市販二枚

貝)から腸炎ビブリオの分離・解析を実施した。病原性株(*tdh+*, *trh+*, または *tdh+*かつ *trh+*)を標的にして、無作為にプールした二枚貝サンプルを定性的に検査し、病原性株の分離を試みた。分離菌の解析途中のデータではあるが、通常の本国内のサンプルに比べて明らかに病原性株の検出率が高く、特に大部分のパンデミック・クローンの特徴である K6 抗原を対象とする特異免疫磁気ビーズ法を併用すると、病原性株の検出感度が上昇した。免疫磁気ビーズ法を用いて分離された病原性株はほとんどが *tdh* 陽性かつ GS-PCR 陽性のパンデミック・クローンであった。特異免疫磁気ビーズ法を使用しない場合、魚介類サンプルの培養液から病原性遺伝子を検出できても、分離菌を得ることはできなかった。以上から、ベトナムでは現在二枚貝の喫食が原因で新型腸炎ビブリオ(パンデミック・クローン)による患者が多発していると言える。

ベトナムとハイガイの中国への輸出で競合しているタイでは、すでにハイガイを含む 3 種の人気のある市販二枚貝がパンデミック・クローンを高頻度で保菌しており、分子疫学的手法を用いて、タイ南部でこれらの喫食が原因で下痢患者が多発していることを過去に明らかにした。市販二枚貝が高頻度にパンデミック・クローンによって汚染しているならば、これらの二枚貝の生息環境水も、腸炎ビブリオや他のビブリオ属細菌種にとって、生存・増殖し易い環境であると考えられるので、タイ南部でこの点を明らかにする生態学的研究を開始した。タイ湾と繋がっているソクラ湖では、海水と淡水が混合される富栄養化した環境で、様々な魚介類が収穫・販売さ

れている。これまでに、このような熱帯汽水域での病原性ビブリオ属菌種の動態に関する研究報告はない。本研究では、熱帯汽水域環境の代表としてソクラ湖で2定点を選び、その環境水中での主要な病原性ビブリオ属菌種の消長を1年間にわたって調査した。病原性菌種の消長は、メンブレンフィルター法で収集した環境水中のサンプルから抽出したDNAをDGGE法で検査して調査した。主たる菌種の同定は、分離培養法、PCR-RPLF法、および16SrDNAの塩基配列決定によって確認した。夏場に全ビブリオ属菌種および腸炎ビブリオの菌数のピークが認められた。両グループの菌数と水温やプランクトン量との相関関係は認められなかったが、全ビブリオ属菌種と塩分濃度との相関関係が認められた。興味あることにビブリオ・コレラ non-01/non-0139のみならず腸炎ビブリオも、雨期で塩濃度が0に近い値が観察されたときにも検出された。2カ所のいずれの定点でも *Vibrio alginolyticus* が主たる菌種(培養法)であり、一方腸炎ビブリオも毎月観察された(DGGE法)。その他、培養法によってビブリオ・バルニフィカス、ビブリオ・フルビアリス、ビブリオ・ミミカスのような病原性菌種の存在が確認された。

2) マレーシアでの市販食品の汚染：昨年度に続いて、市販食品の腸管感染症原因細菌種による汚染状況の調査を調査対象を拡大して継続した。その結果、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も、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からコレラ菌、淡水魚であ

るにもかかわらず、腸炎ビブリオおよび近縁の類似菌が検出された魚サンプルがあった。野菜サラダ用生野菜およびベジタリアンバーガーからは、食中毒原因型サルモネラ菌およびチフス菌が検出され、生および調理後の鶏肉からはカンピロバクター菌、そしてチキンバーガーからリステリア菌が検出されたケースがあった。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と考えられる。またこれらの食品が販売されている現場の観察結果から、主として衛生状態の問題が汚染(すなわち交差汚染)の原因であると考えられる。

3) シンガポールおよび中国での調査と共同研究開始の準備：分担研究者らのグループは、これまで主として、東南アジアの発展途上国を中心とした国々および南西アジアのインドおよびバングラデシュで共同研究を展開してきた。また東南アジアでも比較的経済力のあるマレーシアとも共同研究を実施し、このような国でも、市販食品が各種腸管感染症原因菌によって汚染している状況を昨年度および今年度の研究で明らかにした。このことは、経済力と衛生状態が必ずしも結びつかない可能性を示唆しており、むしろ感染症を征圧しようとする国家の強い意志などが重要であるのではないかと考えられた。そこで、東南アジアの中では、近代的な「都市国家」であることと国家が「強い意志」を持つことで知られるシンガポールとの腸管感染症に関する共同研究を開始する方向で調査を実施し、準備を進めた。シンガポールはSARDSやデング熱のような感染症を国家ぐるみで征圧した国として有名である。一方腸管感染症に関しては、現地の調査(2011

年の2回の調査[外部評価を含む]結果から、強力な防御態勢ができているとは言えないと判断された。特に食品の大部分を輸入に依存している国であり、近代化を目指している東南アジアの発展途上国の手本となる国であるので、腸管感染症対策の確立に協力することを含めて、環境庁の環境保健研究所と研究分担者のグループの所属機関との間でMOUを締結する準備を昨年12月に開始し、人的交流や技術指導の可能性について検討中である。

東アジアで成長し続ける大国である中国については、腸管感染症に関する体系的情報がほとんどない。我が国は中国から、魚介類や野菜などの生鮮食料を大量に輸入しており、また東南アジアの国々も中国から野菜などを輸入している。研究分担者らが、過去に青島市で行った調査の結果、市販の二枚貝や肉類は重要な腸管感染症原因菌に高濃度で汚染していることが明らかになったので、研究分担者は、中国CDC主催の国際シンポジウムでの招待講演でこれらの結果に関して報告した(2010年)。その後数回の国際会議での聞き取り調査などから、上海海洋大学の研究グループが、魚介類のみならず、他の食品の安全性に関しても重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこで、ここの研究グループの所属機関と研究分担者のグループ(青島にある研究室分室を含む)の所属機関との間での共同研究を展開するために、2011年3月にMOUを締結し、共同研究の準備を進めている。

D. 考察

ベトナムでの調査の結果、パンデミ

ック・クローンのアジアの環境中での広がりとそれによる感染症の発生は衰えていないことがわかった。世界規模で本クローンによる感染症が猛威を振るっている中で、我が国では腸炎ビブリオ感染症は減少し続け、昨年度はごく僅かしか報告されなかった。これは、本クローンによる感染症が始まってまもなく、当時の厚生省が魚介類の衛生規範を厳しくしたためであると思われる。

今回のタイでの病原性ビブリオ属菌種の生態学的研究の結果およびこれまで、研究分担者のグループが得た研究結果から判断すると、これらの菌は熱帯の富栄養汽水環境を好み、旺盛に繁殖すると考えられる。興味あることに、腸炎ビブリオの分離培養時に競合菌となっているビブリオ・アルギノリティカスがこのような環境でも旺盛に繁殖していたことであった。ただしこのような環境では、腸炎ビブリオに関しては、食塩濃度はあまり関与していないようである。このような点を考慮して、新たな腸炎ビブリオの選択分離法が開発できるかも知れない。

E. 結論

腸炎ビブリオのパンデミック・クローンによる世界的流行はアジアを含めて現在も進行中である。原因菌は、二枚貝の汚染を介してヒトへの感染を成立させる。日本のとった衛生対策が功を奏していることが確認できる状況になったので、世界レベルでの対策の手本となり得る。

東南アジアの熱帯の富栄養化汽水

環境が、腸炎ビブリオの生存・増殖に適しているようであるが、競合して生育する他のビブリオ属菌も存在する。

東南アジアで比較的経済力のあるマレーシアでも、様々な市販食品の下痢原因菌による汚染が明らかになった。経済力と衛生状態の関係が必ずしも成り立たないことが示されると同時に、感度の高い PCR をベースにした方法が有用であることが示唆された。

今後は、東南アジアの都市国家（シンガポール）や中国での研究が必要であると感じられた。

F. 健康危機情報

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）。タイとベトナムでの共同研究では、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。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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.

Thongchankaew U., P. Mittraparp-Arthorn, P.

- Sukhumungoon, N. Tansila, T. Nuidate, M. Nishibuchi, V. Uddhakul. 2011. Occurrence of potentially pathogenic vibrios and related environmental factors in Songkhla Lake, Thailand. *Can. J. Microbiol.* 57(11): 867-873.
- 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.
- 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.
- Wong, W. C., C. F. Puil, 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.
- Wong, W. C., C. F. Puil, 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.
2. 学会発表
- 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、西瀨光昭 「北ベトナムのハノイにおける腸炎ビブリオ感染症の発生状況と病原性細菌による魚介類汚染の実態調査」 第32回日本食品微生物学会学術総会（東京都江戸川区、2011年10月6-7日）
- 中口義次、Abdul Aziz Djamal、Harry Fajri Zisoni、清水理香、勢戸和子、西瀨光昭 「インドネシア西部における腸炎ビブリオ感染症の発生と要因に関する地域間比較」 第45回腸炎ビブリオシンポジウム（東京都新宿区、2011年10月20-21日）
- 田中夏子、山崎渉、Varaporn Uddhakul、権平 文夫、杉山純一、中口義次、西瀨光昭 「魚貝類から腸炎ビブリオを定量検出する MPN 法の検出感度の改良」 第45回腸炎ビブリオシンポジウム（東京都新宿区、2011年10月20-21日）
- 中口義次、Nguyen Binh Minh、勢戸和子、大久保和洋、岩出義人、西瀨光昭 「ベトナムにおける腸炎ビブリオ感染症の流行と患者分離株の解析」 第64回日本細菌学会関西支部総会（大阪府堺市、2011年11月19日）
- 中口義次、Nguyen Binh Minh、Abdul Aziz Djamal、Harry Fajri Zisoni、西瀨光昭 「発展途上国での下痢症：腸炎ビブリオ感染症の発生と流行、そして食との関係」 第24回びわ湖国際医療フォーラム（滋賀県大津市、2012年1月14日）
- Mitsuaki Nishibuchi, Koji Seo,

Natsuko Tanaka, Fumio Gondaira,
Junichi Sugiyama, Pharanai
Sukhumungoon, Varaporn Vuddhakul,
Wataru Yamazaki, Kazuko Seto,
Yoshito Iwade, Yoshitsugu
Nakaguchi “SPREAD OF THE
INFECTION BY A NEW CLONE OF *VIBRIO*
PARAHAEMOLYTICUS O3:K6 AND ITS
SEROTYPE VARIANTS ACROSS
INTERNATIONAL BORDERS”
International Union of
Microbiological Societies 2011
Congress Sapporo (Sapporo, Japan,

September 6-10, 2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 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

コレラ菌の分子疫学的解析に関する研究

分担研究者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授
研究協力者 T. Ramamurthy National Institute of Cholera and Enteric
Diseases, Kolkata, India, Deputy Director
研究協力者 日根野谷淳 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助教
研究協力者 S. Awasthi 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科院生（博士）

研究要旨：

本研究では、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 (*chxA*) 遺伝子の分布について調べた。調べた 765 株のコレラ菌 (01、485 株、0139、84 株、non-01/non-0139) のうち non-01/non-0139 の 53 株で *chxA* 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。

A. 研究目的

コレラは今日なお、熱帯・亜熱帯地方において小児の死亡原因となる重要な疾患である。コレラの原因菌はコレラ毒素産生性の 01 と 0139 コレラ菌である。しかし、non-01/non-0139 コレラ菌も重症下痢症患者から分離されるが、その病原性については十分理解されていない。近年、コレラ菌の新たな病原因子として、コリックストキシン (ChxA) が報告された。ChxA は、分子量約 70 kDa からなるタンパク質で、大きく 3 つのドメインに分けられる。N 末端から (1) レセプター結合ドメイン (RBD)、(2) トランスロケーションドメイン (TD)、(3) 触媒ド

メイン (CD) である。マウスの繊維芽細胞に対する毒性 (IC_{50}) は 4.6 ng/mL である。本研究では、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、特にコリックストキシン (*chxA*) 遺伝子の分布に基づく分子疫学的解析を行い、コレラ菌における ChxA の病原因子としての重要性について解析した。

B. 研究方法

1) 菌株：

01 コレラ菌 472 株 (インド由来 468 株、バングラデシュ由来 4 株)、0139 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-01/

non-0139 コレラ菌 196 株 (全てインド由来) を本実験に用いた。

2) コロニーハイブリダイゼーションによる *chxA* 及びその他の病原遺伝子の分布 :

当該コレラ菌を、ニトロセルロースを載せた LB-Agar 上 37° C で一晚培養した。ニトロセルロース膜をアルカリ処理後、中和乾燥し、UV 照射により DNA を膜に固定した。*chxA*, *ctxA*, *tcpA*, T3SS, *nagst*, *rtx*, *zot*, *hlyA* 遺伝子を PCR で増幅し、³²P で標識し、DNA プロブとしてハイブリダイゼーションに用いた。

3) コリックストキシン遺伝子のクローニングと塩基配列の解析 :

コリックストキシン (*chxA*) 遺伝子が陽性となった 53 株の *chxA* 遺伝子の全長がカバーできるように、*chxA* 遺伝子を複数のプライマーを用いて PCR で増幅した。得られた PCR 産物を直接シーケンスするか、PCR 産物が得られなかった場合はゲノムウオーキングにて解析し、*chxA* 遺伝子の全塩基配列を決定した。得られたシーケンスから Lasergene DNASTAR を用いてデンドログラム解析を行った。

4) 組み換えコリックストキシンの発現と精製及び抗体の調製 :

デンドログラム解析の結果、得られた 3 種類のコリックストキシン (*chxA*) 遺伝子を pET にクローニングし、大腸菌に形質転換した後、組み換

えコリックストキシン (rChxA) を発現した。組み換え大腸菌を超音波破碎し、粗毒素液を作製した。粗毒素液を、ニッケルセファロースカラムを用いて精製し、SDS-PAGE で純度を確認した。精製した 2 種類の rChxA をウサギに免疫し抗体を作製した。

5) 細胞毒性試験 :

2 種類の rChxA (rChxAI/II) の細胞毒性を 8 種類の株化細胞、すなわち、HeLa、Caco-2、Int407、HEp-2、CHO、Vero、Y-1 及び NIH-3T3 細胞を用いて調べた。Y-1 細胞と NIH-3T3 細胞はそれぞれ 5% FBS を含む Ham' s F12 又は 10% FBS を含む DMEM で培養した。HeLa と Vero 細胞は 5% FBS を含む MEM で培養した。それ以外の細胞は、10% の FBS を含む MEM で培養した。培養は 5% の CO₂ を含む空気中で行った。rChxAI 又は rChxAII を細胞に添加し、継時的に細胞の形態変化を観察した。

6) ウサギ腸管ループ試験 :

精製した rChxAI/II/III (10、50、100、500 g) をウサギの結紮腸管ループに注入し、16 時間放置した後、腸管内の液量と腸管の長さを測定し、FA (液量/長さ) 比を測定した。

7) マウス致死活性 :

精製した rChxAI/II (1、5、10、25 g) をマウスに静脈内投与し、マウスの生死を約 1 週間観察した。死亡したマウスを解剖し、臓器を取り出し肉眼的に異常が見られた臓器について病理学

的解析を行った。

(論理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

1) コリックストキシン (*chxA*) 遺伝子の分布と遺伝学的特性：

コレラ菌 765 株について調べたところ、*chxA* 遺伝子が陽性となったのは non-01/non-0139 の 53 株であった(表 1)。*chxA* 陽性のコレラ菌の他の病原遺伝子 (*ctxA*、*tcpA*、T3SS、*nagst*、*rtx*、*zot* 及び *hlyA*) の分布について調べた結果、表 2 のように全ての株で *rtx* と *hlyA* 遺伝子が陽性となったが、それ以外の病原遺伝子に関しては、43 株では全てが陰性であった。4 株は T3SS のみ陽性、3 株で TS33 と *nagst* が陽性、*nagst* のみ陽性、*ctxA*、*tcpA*、TS33 及び *zot* 陽性と *tcpA* 単独陽性がそれぞれ 1 株ずつ見つかった。全ての *chxA* の全塩基配列を解析した結果、全長の長さから 2 つのグループに分かれた。すなわち、1,887 bp (628 アミノ酸残基) からなるグループと 1,905 bp (634 アミノ酸残基) からグループがあった。また、推定アミノ酸配列の相同性から 3 つのグループに分けることができ、新たなバリエーションを 2 種類見いだした。

2) コリックストキシン (ChxA) の生物学的特性：

3 つに分類された ChxA は、既に報告されている ChxA と同一かあるいは

酷似した ChxAI、ChxA とアミノ酸配列が異なり RBD 領域に多様性がある ChxAII と、ChxA と比べ CD 領域に多様性のある ChxAIII があった。rChxAI と rChxAII を大腸菌で発現させ、精製毒素を用いて細胞毒性を調べた。その結果、ChxAI と ChxAII とともに NIH3T3、Int407、Hep-2、Vero 細胞に細胞毒性を示したが、CHO と Caco-2 細胞に対しては細胞増殖抑制活性を示した。しかし、HeLa と Y-1 細胞に関しては rChxAI では毒性を示したが、rChxAII では全く毒性は観察されなかった。マウス致死活性は、rChxAI、rChxAII とともに 10 µg/mouse の投与で約半数が 2-3 日で死亡したが、25 µg/mouse と量を増やすと rChxAII では 24 時間以内に全てのマウスが死亡した。しかし、rChxAI では 7 匹中 6 匹のマウスが 7 日以内に死亡した。さらに精製 rChxAI、rChxAII、rChxAIII の腸管毒性をウサギ腸管ループ試験で調べた結果、3 毒素とも下痢活性を示さなかった。

D. 考察

Non-01/non-0139 コレラ菌に見いだされた新規の ADP リボシルトランスフェラーゼである ChxA には少なくとも 3 つのバリエーションが存在した。*chxA* 遺伝子は、non-01/non-0139 コレラ菌に特異的に見いだされたことから non-01/non-0139 コレラ菌の病原因子として重要である可能性が考えられる。マウスに対しては特に ChxAII が強い致死活性を示したが、ウサギ腸管ループ試験では 3 つのバリエーションと

も毒性を示さなかった。このことは、ChxA は腸管毒性に働くというよりも non-O1/non-O139 コレラ菌の病原性を高めるか、腸管外感染症の病原因子として働いている可能性が考えられる。

E. 結論

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していることを明らかとした。また、それぞれのバリエーションは各種細胞に対する感受性が異なるが、マウスに対して肝臓に障害を与えることで病原性を発揮していることを明らかとした。

F. 健康危機情報

Non-O1/non-O139 コレラ菌の新たな病原因子として ChxA についても調査して行く必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Ogura, K. Yahiro, H. Tsutsuki, S. Nakagawa, **S. Yamasaki**, J. Moss and M. Noda. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, 286: 37207-37215, 2011.
- (2) R. J. Lara, S. B. Neogi, M. S. Islam, Z. H. Mahmud, B. B. Demoz, **S. Yamasaki**, G. B. Nair and G. Kattner. *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, 2011.

2. 学会発表

- (1) S.P. Awasthi, M. Asakura, N. Chowdhry, S.B. Neogi, A. Hinenoya, T. Ramamurthy, G.B. Nair, and **S. Yamasaki**. Novel variants and their biological activities of cholix toxin detected in non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. 46th US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2011. December 13-15, 2011, Kolkata, India
 - (2) S.P. Awasthi, M. Asakura, N. Chowdhry, S.B. Neogi, A. Hinenoya, T. Ramamurthy, G.B. Nair, and **S. Yamasaki**. Novel cholix toxin variants produced by *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. The Forth Conference on the Biology of Vibrios. VIBRIO 2011. November 1-4, 2011, Santiago de Compostela, Spain.
 - (3) S.P. Awasthi、朝倉昌博、N. Chowdhury、S. B. Neogi、日根野谷 淳、山崎伸二:コレラ菌のコリックストキシン遺伝子の多様性と新規コリックストキシンバリエーションの同定。第45回腸炎ビブリオシンポジウム、2011年10月 東京
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当無し
 2. 実用新案登録
該当無し
 3. その他
該当無し

表1. コレラ菌におけるコリックストキシンとコレラ毒素遺伝子の分布

血清型	分離国	株数	<i>chxA</i>	<i>ctxA</i>
O1	インド	295	-	+
(n=485)		173	-	-
	ブラジル	10	-	+
	バングラデシュ	4	-	+
	ペルー	2	-	+
		1	-	-
O139	インド	58	-	+
(n=84)		3	-	-
	バングラデシュ	23	-	+
Non-O1/non-O139	インド	52	+	-
(n=196)		1	+	+
		7	-	+
		136	-	-
合計		765	53	400

chxA: コリックストキシン、*ctxA*: コレラ毒素

表2. コリックストキシン陽性コレラ菌の病原因子プロファイル

血清型	株数	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	T3SS	<i>nagst</i>	<i>rtx</i>	<i>zot</i>	<i>hlyA</i>
Non-O1/non-O139	43	-	-	-	-	+	-	+
	4	-	-	+	-	+	-	+
	3	-	-	+	+	+	-	+
	1	-	-	-	+	+	-	+
	1	+	+	+	-	+	+	+
	1	-	+	-	-	+	-	+
合計	53	1	2	8	4	53	1	53

ctxA: コレラ毒素、*tcpA*: toxin co-regulated pilus、T3SS: 3型分泌装置、*nagst*: 耐熱性エンテロトキシン、RTX: Repeat in Toxin、ZOT: zonula occludens toxin、*hlyA*: エルトール溶血毒素