

B. 研究方法

1) 供試材料

食中毒に関連した食品「いかの塩辛」12検体を供試した。

2) 培養法

食品から腸炎ビブリオを検出する方法を図1に示した。食品10~20gをサンプリングし、希釈液で5倍乳剤を作製した後、TCBS寒天(日水製薬)へ直接塗抹する方法(直接法)と乳剤を2% NaCl加アルカリペプトン水(pH8.6)へ接種し37°C, 18時間培養後にTCBS寒天平板へ塗抹する方法(増菌法)を行なった。腸炎ビブリオの検出率を上げるために、残りの乳剤に2倍濃度のアルカリペプトン水を加えて培養する「大量培養法」も併せて実施した。

3) 培養液のスクリーニング試験

培養液中に腸炎ビブリオが存在するか否かを確認するために、大量培養液を対象として、PCR法でスクリーニング試験を行なった。

大量培養液1mlを遠心し、その沈渣に25mM NaOHを50 μ l加え100°C, 10分間加熱後(アルカリ処理), 2/25M Tris-HCl (pH7.0)を50 μ l加えたものをテンプレートとした。

PCR法では、腸炎ビブリオに特異的な遺伝子である *toxR* 遺伝子と *tdh*, *trh* 産生遺伝子を検出するプライマーを使用した(表1)。反応条件は94°C5分加熱後, 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C30秒(30サイクル)である。

4) 腸炎ビブリオの検出

大量培養液のスクリーニング試験

で *toxR* 遺伝子あるいは *tdh/trh* 遺伝子が陽性にであった検体については、多数の腸炎ビブリオ集落を得るために、TCBS寒天および酵素基質培地(クロモアガービブリオ)各5枚に分離した。

各平板に発育した腸炎ビブリオ様集落については生化学的性状試験を行い、腸炎ビブリオを判定後、血清型別試験を行なった。

また、スクリーニング検査で *tdh* 遺伝子が陽性にであった検体については、可能な限り多数の集落を釣菌し、TDH産生菌の検出を試みた。

5) 免疫磁気ビーズ法を用いた集菌法

患者から分離された腸炎ビブリオ血清型03:K6(TDH産生菌)を食品から分離するために、K6に対する抗体を感作させた免疫磁気ビーズ腸炎ビブリオK6「生研」(デンカ生研)を用い集菌する方法を併用した。

免疫磁気ビーズ法を用いて集菌後は、前述のとおり寒天平板へ画線塗抹し、出現した腸炎ビブリオ様集落についてTDH産生性の確認をPCR法で行なった(図2)。

6) 食品中の腸炎ビブリオ菌数およびTDH産生菌数の測定

食品の5倍乳剤についてアルカリペプトン水を用いたMPN3本法を実施し、培養液からPCR法を用いて *toxR* 遺伝子を標的とした腸炎ビブリオ菌数と *tdh* 遺伝子を標的としたTDH産生 *V.p* 菌数を測定した(MPN-PCR法)。

C. 研究結果

1) 食品からの腸炎ビブリオ検出

食品検体「いかの塩辛」(検食, 残品および参考品)の合計 12 検体中 9 検体から腸炎ビブリオが検出された(表 2)。これらは全て大量培養からのスクリーニング試験で *toxR* 遺伝子が陽性になった検体であった。検出された腸炎ビブリオの血清型は O3:K6 (9 検体), O2:KUT (6 検体), O1:KUT (1 検体), O3:KUT (1 検体) で, 1 検体から 3 種類もの異なる血清型が検出された検体もあった。

2) TDH 産生菌の検出

大量培養液からのスクリーニング試験で *toxR* 遺伝子が陽性となった検体は, 12 検体中 11 検体で (1 検体は判定不能), そのうち *tdh* 遺伝子も陽性となった検体は 9 検体であった。これら 9 検体を対象に TDH 産生菌の検出を試みた結果, 9 検体全てから TDH 産生腸炎ビブリオを検出することができた。血清型は全て患者由来株と同じ O3:K6 であった。

TDH 産生菌を検出するために調べた腸炎ビブリオ集落数は, 検体によって異なっており, 1 検体あたり 1 集落調べたのみで検出された検体や, 270 集落調べたうち 7 集落が TDH 産生菌であったものまで, 検体によって異なっていた(表 2)。

3) 免疫磁気ビーズ法の有効性

患者由来株と同一血清型菌を分離

するために, 増菌培養液あるいは分離寒天平板から colony-sweep 法で集菌後懸濁した菌液を対象に, 免疫磁気ビーズ法で K6 菌を濃縮し, クロモアガービブリオに分離した。発育した腸炎ビブリオ様集落を対象に TDH 産生菌の検索を行った。分離できない場合にはこれらの操作を繰り返し行った。免疫磁気ビーズ法を用いた集菌方法によって, 血清型 O3:K6 の腸炎ビブリオを容易に検出することが可能であった。また血清型 O3:K6 であるが, TDH 非産生菌も 3 検体から分離することができた。

4) MPN-PCR 法による腸炎ビブリオ菌数及び TDH 産生腸炎ビブリオ菌数の測定

塩辛 9 検体の腸炎ビブリオ菌数を MPN-PCR 法で測定した結果, いずれも $10^2 \sim 10^3$ MPN/g, TDH 産生 V.p 菌数は $10^{-1} \sim 10^2$ MPN/g であった。

D. 考察

2007 年 9 月, 東京都では仕出し屋が調製した仕出し弁当(当該品の「いかの塩辛」が含まれていた)を原因とした集団事例(300 名中 190 名が発症)と家庭内事例 10 事例(患者数 20 名)が発生した。

本事例の調査のために搬入された食品(いかの塩辛)を対象に, 原因菌である腸炎ビブリオの検出法を検討した結果, 12 検体中 9 検体から腸炎ビブリオを検出することができた。

通常, 食中毒検査では, 食品の 5 倍

乳剤を作製し検査に用いている。今回は通常法に加え、大量培養法も併用した。大量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、検出率を上げることが可能であった。

今回の食品は、増菌培養液から分離した平板では、腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌の割合が多く、腸炎ビブリオのコロニーを釣菌するのが非常に困難であった。しかし、K抗原を感作させた免疫磁気ビーズ法を用いて、培養液から腸炎ビブリオを濃縮させさせることによって、釣菌が容易になった。更に患者と同じ血清型菌を検出することが可能であった。

食品検体から多数の集落を釣菌する場合、従来から使用されているTCBS寒天よりも酵素基質培地であるクロモアガービブリオ寒天の方が、時間が経過しても色調の変化が少なく、平板上での腸炎ビブリオの存在が判り易かった。現在、酵素基質培地も数種類あるため、特に食品から腸炎ビブリオを検出には培地の種類を増やすことにより、より効率的な菌の分離が可能となることが示唆された。

MPN-PCR法で推定した腸炎ビブリオ菌数およびTDH産生菌数の関係において、TDH産生菌の分離のし易さに明らかな相関関係は認められなかった。

食品から溶血毒産生菌を分離することは、非常に困難である。少しでも検出率を上げるためには、遺伝子学的手法や免疫学的手法を駆使し、複数の分離平板を用いるなどの工夫が有効であった。

E. 結論

食品からTDH産生性の腸炎ビブリオを検出する方法を検討した結果、以下のことが明らかになった。

(1)大量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、検出率を上げることが可能であった。

(2)目的とする血清型が判明している場合は、免疫磁気ビーズ法を用いて集菌することにより、検査精度と検査効率を上げることができる。

(3)新しい分離平板である酵素基質培地は、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、他のビブリオ属菌と区別がしやすいため非常に有効であった。

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。

F. 健康危機情報

無し

G. 研究発表

準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

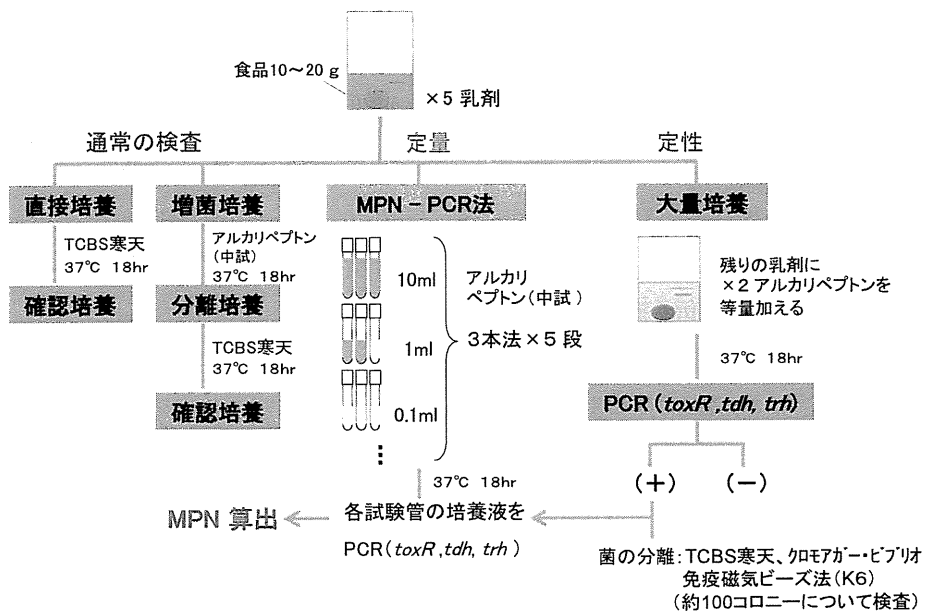


図1. 食品からの腸炎ビブリオ検査方法

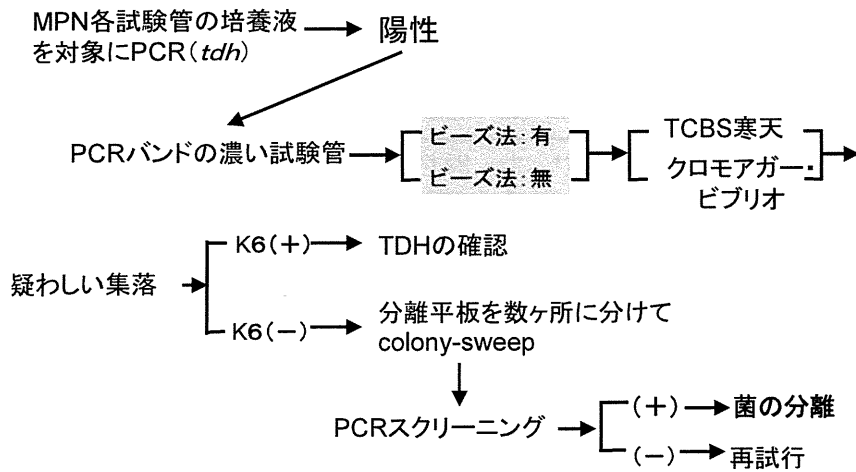


図2. 増菌培養液からのTDH産生菌の分離

表1. PCR法で使用したプライマーおよび温度条件

【テンプレートの作製】

培養液1mlを遠心し、その沈渣を50 μ lの25mM NaOHに懸濁して加熱(アルカリ処理)後、2/25M Tris-HCl(pH7.0)を等量加えた。

【プライマー】

toxR 遺伝子検出用 (Kim *et al.* 1999年)
 vptoxR1 : 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'
 vptoxR2 : 5'-ATACGAGTGTTGCTGTCATG-3' *toxR* = 368 bp

tdh 遺伝子検出用 (伊藤ら, 1992年)
 TDF-1 : 5'-AGCTTCCATCTGTCCCTTTT-3'
 TDF-2 : 5'-ATTACCACTACCACTCTCATA-3' *tdh* = 434 bp

trh 遺伝子検出用 (Tada *et al.* 1992年)
 R-2 : 5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'
 R-6 : 5'-CATTTCGGCTCTCATATGC-3' *trh* = 250 bp

【温度条件】

前熱変性 94°C, 5分
 熱変性 94°C, 0.5分
 アニールング 55°C, 0.5分 30サイクル
 伸長 72°C, 0.5分
 最終伸長 72°C, 3分

表2. いかの塩辛からの腸炎ビブリオの検出

No.	検体名	賞味期限	PCR (定性)		V.p.血清型		MPN-PCR /g (定量)		TDH産生菌の検出
			<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	TDH(+)	TDH/TRH(-)	<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	
1	塩辛A	07.10.05	検食	+++ +	O3:K6	O2:KUT	1.2 \times 10 ³	4.7 \times 10 ²	\geq 18/217
2	塩辛A	07.10.05	参考品	+++ \pm	O3:K6	O1:KUT O3:KUT	2.3 \times 10 ³	1.2 \times 10 ¹	\geq 11/235
3	塩辛A	07.10.05	参考品	++ ++	O3:K6	O2:KUT	1.2 \times 10 ²	1.8 \times 10 ⁰	7/270
4	塩辛A	07.10.05	残品	++ +	O3:K6	O3:K6	3.8 \times 10 ²	7.0 \times 10 ⁻¹	7/66
5	塩辛A	07.10.05	残品	+++ +	O3:K6	(-)	1.2 \times 10 ²	3.5 \times 10 ⁻¹	1/1
6	塩辛A	07.10.05	残品	+++ +	O3:K6	O2:KUT	1.9 \times 10 ²	1.2 \times 10 ⁰	1/6
7	塩辛A	07.10.05	残品	+++ +	O3:K6	O2:KUT O3:K6	7.5 \times 10 ²	1.2 \times 10 ⁰	4/129
8	塩辛A	07.10.05	残品	++ +	O3:K6	O2:KUT O3:K6	4.7 \times 10 ²	4.5 \times 10 ⁻¹	1/230
9	塩辛A	?	残品	++ +	O3:K6	O2:KUT	4.7 \times 10 ²	1.2 \times 10 ⁻¹	1/12
10	塩辛B	07.10.04	参考品	++ (-)	(-)	(-)	NT	NT	NT
11	塩辛B	07.9.30	残品	\pm (-)	(-)	(-)	NT	NT	NT
12	塩辛B	07.9.30	参考品	+ (-)	(-)	(-)	NT	NT	NT

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

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

分担研究者 倉園 久生 帯広畜産大学 教授

研究協力者 山崎 栄樹 帯広畜産大学 助教

研究要旨 サルモネラエンテロトキシン(*stn*) 遺伝子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。

A. 研究目的

サルモネラ属菌は分類学的に2菌種、6亜種からなり、2500種以上の膨大な血清型に分類されている菌群である。この中でヒト及び家畜に対して病原性を示すものはごく一部であるものの、サルモネラ感染症は血清型Typhi及び血清型Paratyphi A感染により引き起される重篤なチフス症（全身感染症）や血清型Enteritidisや血清型Typhimuriumに代表される食中毒原因菌の感染により引き起される非チフス性サルモネラ症（腸管感染症）まで多岐にわたっている。非チフス性サルモネラ症は世界的に最も多い食中毒であり、本邦を含む先進諸国においてもしばしば大きな問題となる。

サルモネラ属菌感染の分子機構に関しては、本菌の標的細胞に対する侵

襲性について世界中で詳細な解析が行われてきたが、これらの標的細胞侵襲性とサルモネラ属菌感染症の主症状である下痢症状との直接的な関連性は明らかにされていない。一方で、1994年に下痢原性を担う毒素タンパク質候補分子として血清型Typhimuriumの染色体DNA上に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と部分的にホモロジーのある遺伝子（サルモネラエンテロトキシン； *stn*）が報告された。本遺伝子は750bpからなり、約29kDaのタンパク質をコードしていた。我々は、本遺伝子にコードされるStnタンパク質の活性及びサルモネラ属菌感染症における役割を明らかにし、さらにStnタンパク質に対する免疫学的検出系を構築することで、Stnをターゲットと

するサルモネラ属菌の病原性を反映した検出系の構築が可能であるかを検討している。

stn 遺伝子の分布に関しては、我々を含めた国内外の多くの研究者により、全てのサルモネラ属菌がその血清型によらず *stn* 遺伝子を保持する事が明らかにされている。さらに、サルモネラ属菌以外の細菌には *stn* 遺伝子が存在しない事も明らかにされ、これらの知見から今日では *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌のマーカー遺伝子として、食品衛生及び医療の現場で広く用いられている。一方で、*stn* 遺伝子の配列に関しては、過去に血清型 Typhimurium 由来の配列が 1 種類報告されているのみであり、遺伝子配列の多様性に関する知見は存在しない。本研究においては Stn の機能を考察する上で重要な *stn* 遺伝子の配列保存性に関する知見を得る目的で、様々なサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子全長配列の解析を行った。

B. 研究方法

1) 試供菌株

1995 年にタイ王国の下痢患者及び食品から共同研究者により分離されたサルモネラ属菌株を用いた。全ての分離株は調査にあたって協力者にその趣旨を説明済みであり、納得の上でご協力頂いている。また、得られている情報に関してもプライバシーの保護に配慮し、患者の個人情報の取扱いには最善の配慮を行っているため、倫理面での問題は無い。

2) *stn* 遺伝子の配列解析:

4 つの血清型を含む 31 のサルモネラ属菌分離株の whole cell DNA をテンプレートとし、配列が報告されている血清型 Typhimurium 標準株ゲノム上の *stn* 遺伝子上流及び下流配列に対して相補的に設計された特異的プライマーを用いて、全長 *stn* 遺伝子を含む約 1.2kbp の PCR 増幅断片を得た。得られた遺伝子断片に対してシーケンシングを行い、Clustal W (v. 1.83) program (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて配列比較を行った。

3) 抗 Stn ペプチド抗体反応性タンパク質の分離

血清型 Enteritidis 臨床分離株の菌体破碎上清に対し、硫酸アンモニウム分画及び陽イオン交換カラムによる粗精製を行った後、抗 Stn ペプチド抗体結合カラムによる精製を行った。

4) デュアルレポーターアッセイ

β ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*)、血清型 Enteritidis 由来の *stn* 遺伝子及びルシフェラーゼ遺伝子 (*luc+*) をそれぞれ PCR で増幅させ、pGEX-6P-1 vector の GST タンパク質コーディング領域と置換した。その際、*lacZ*、*stn*、*luc+* が一つのオープンリーディングフレームを形成する様に設計し、これを *stn*(tag) とした (Figure 2)。更に、*stn*(tag) の *stn* 中にある終止コドン (tag) 部分の塩基を部位特異的に変異させ、インフレーム終止コドンを持たないポジティブコントロール 1 種類 (*stn*(cag)) と別の終止コドンを持つ

Table 1. *Salmonella* serotypes used for *stn* gene sequence analysis.

Serotypes of <i>Salmonella</i>	Isolated from	No. of isolates tested
Choleraesuis	diarrhea patient	2
	food sample	2
Enteritidis	diarrhea patient	6
	food sample	6
Typhimurium	diarrhea patient	3
	food sample	8
Agona	diarrhea patient	2
	food sample	2

ネガティブコントロール2種類 (stn(taa), stn(tga))、及びフレームシフト変異により複数の終止コドンをもつネガティブコントロール1種類 (stn(sift))を作製した。構築したプラスミドを血清型 Enteritidis 株に導入し、1%グルコース添加 LB 培地中で培養した。1mM IPTG の添加により融合タンパク質の発現を誘導した後、血清型 Enteritidis 内の β ガラクトシダーゼ活性及びルシフェラーゼ活性をそれぞれ測定し、計算式 (リードスルー頻度 (%) = [(ルシフェラーゼ活性 / β ガラクトシダーゼ活性) \div (ポジティブコントロールのルシフェラーゼ活性 / ポジティブコントロールの β ガラクトシダーゼ活性)] \times 100) に従い β ガラクトシダーゼ活性に対するルシフェラーゼ活性の割合からリードスルー頻度を算出した。

C. 研究結果

1. *stn* 遺伝子配列の多様性解析：

タイ王国の下痢患者及び食品からそれぞれ独立に分離されたサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子配列の解析を行った。4つの血清型を含む31のサルモネラ属菌株 (Table 1) の *stn* 遺伝子領域に対して配列解析を行った

Table 2. Homologies of *stn* gene sequences between each serotypes.

	Choleraesuis	Enteritidis	Typhimurium	Agona
Choleraesuis	-	-	-	-
Enteritidis	99.1 %	-	-	-
Typhimurium	99.3 %	98.9 %	-	-
Agona	98.5 %	98.7 %	98.9 %	-

結果、*stn* 遺伝子領域の配列は血清型内で100%保存されており、また、血清型間での相同性も98.5 - 99.3%と非常に高い事が明らかとなった (Table 2, Figure 1)。血清型 Typhimurium の *stn* 遺伝子は過去に報告されている *stn* 遺伝子と完全に一致し、また血清型 Choleraesuis の *stn* 遺伝子も血清型 Typhimurium の *stn* 遺伝子と同様に約29kDaのシングルポリペプチドをコードしていた。これに対して、血清型 Enteritidis 及び Agona の *stn* 遺伝子は血清型 Typhimurium の *stn* 遺伝子と98%以上の相同性をもつにも関わらず、その配列内に終止コドン (インフレーム終止コドン) を保持していた (Figure 1)。これらの終止コドンで翻訳が停止した場合、血清型 Typhimurium 及び Choleraesuis において29.1 kDaのStnタンパク質が産生されるのに対して、血清型 Enteritidis では11.9 kDa、血清型 Agona では27.8 kDaのタンパク質が産生される事となる。以上の結果から、*stn* 遺伝子配列の高い保存性にも関わらず、血清型により異なった構造のStnタンパク質が発現している可能性が示唆された。

2. 血清型 Enteritidis における Stn タンパク質の発現解析

我々は過去の研究において、Stn タ

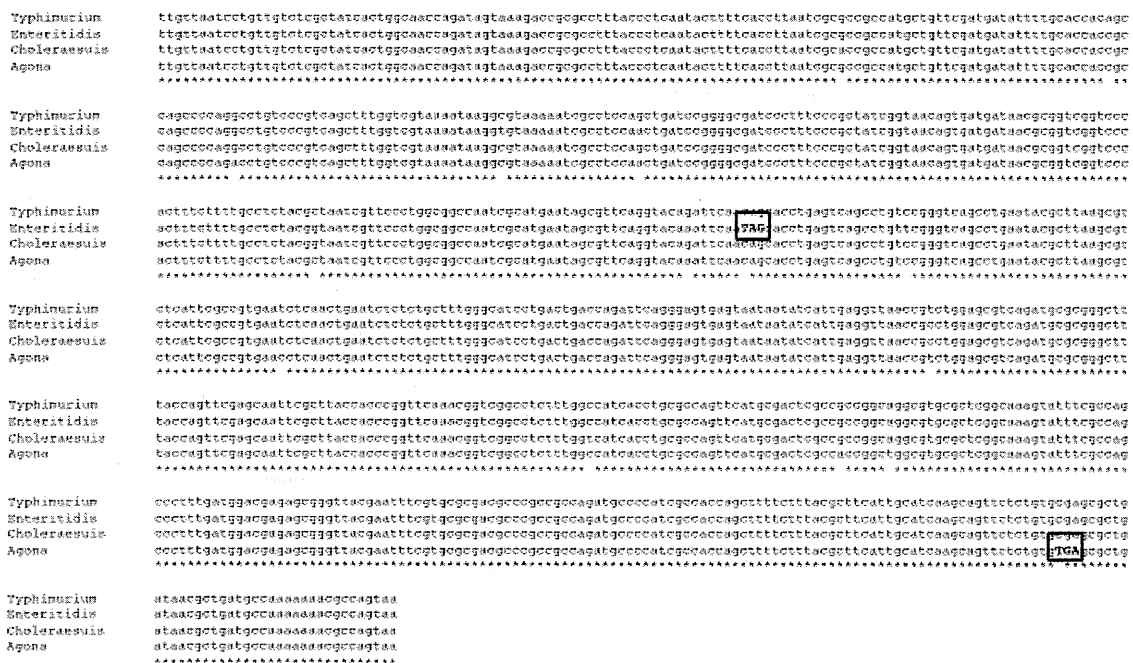


Figure 1. Multiple sequence alignment of *stn* genes.

Asterisks indicate nucleotides that are identical in all sequences of the alignment. In-frame amber (TAG) termination codon of serovar Enteritidis and in-frame opal (TGA) termination codon of serovar Agona were indicated in boxed capitals.

ンパク質のC末端領域を特異的に認識する抗Stnペプチド抗体 (No. 16 IgG) を構築し、さらに、幾つかの血清型 Enteritidis 分離株において本抗体と高い反応性をもつタンパク質が発現している事を報告した。今回の *stn* 遺伝子の配列解析により明らかになった血清型 Enteritidis のインフレーム終止コドンは No. 16 IgG の認識部位よりも上流であった。すなわち、上記の結果は少なくとも幾つかの血清型 Enteritidis 分離株において、*stn* 遺伝子のインフレーム終止コドンよりも下流にコードされているポリペプチドが発現している可能性を示唆していた。本可能性に関し、本研究においては以下の2つの解析により検証を行った。

2-1) No. 16 IgG 反応性タンパク質の分離

血清型 Enteritidis において No. 16 IgG と反応するタンパク質の分子量を確認するために、No. 16 IgG 結合カラム (No. 16 IgG カラム) を作製し、血清型 Enteritidis 菌体破砕液からの No. 16 IgG 結合性タンパク質の精製を試みた。過去の解析において我々は、No. 16 IgG 結合性タンパク質が 40% 硫酸アンモニウム分画において上清に回収され、さらに陽イオン交換カラム HiTrap CM に高い結合性をもつ事を明らかにしている。本研究においては、血清型 Enteritidis 菌体破砕液を 40% 硫酸アンモニウム分画及び HiTrap CM カラムにより粗精製し、得られた粗精製画分を No. 16 IgG カラムに添加することで、No. 16 IgG 結合性タンパク質の精製を試みた。No. 16 IgG カラムに添加前のサンプル、No. 16 IgG カラムに結合せずに素通りしたサンプル及

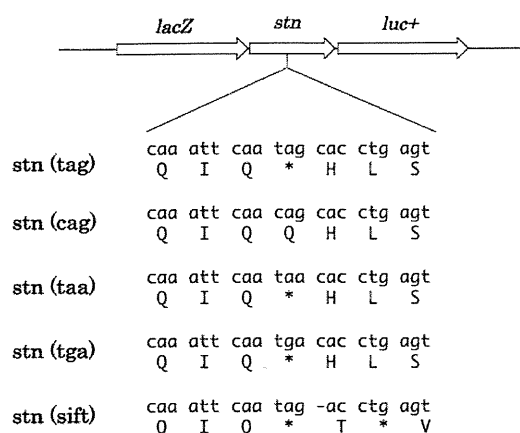


Figure 2. Structure of the reporter plasmids.

stn gene of serovar Enteritidis was inserted between IPTG-inducible *lacZ* gene and *luc+* gene. The sequence around the in-frame stop codon of *stn* gene are shown. Upper line and lower line of the each clones indicate gene sequence and deduced amino acid sequence, respectively. Asterisks indicate the positions of the stop codon.

び No. 16 IgG カラムからの溶出サンプルに対して No. 16 IgG との反応性を解析した結果、No. 16 IgG 反応性タンパク質は全て素通り画分として回収され、No. 16 IgG カラムと結合しない事が明らかとなった (data not shown)。すなわち、No. 16 IgG カラムを用いた No. 16 IgG 結合性タンパク質の分離は困難であり、No. 16 IgG 反応性タンパク質が *stn* 遺伝子の翻訳産物であるかどうかを検証する事は不可能であった。

2-2) リードスルー頻度の解析

終止コドンの読み飛ばし (リードスルー) は真核生物と原核生物の両方を含む多くの生物内で起こる事が知られている。インフレーム終止コドンをもつ血清型 Enteritidis において Stn の C 末端領域に相当するポリペプチドの発現が観察される理由として、リードスルーによりインフレーム終止コドンで翻訳が停止せず、血清型 Enteritidis においても血清型 Typhimurium と同様に約 29 kDa の一本

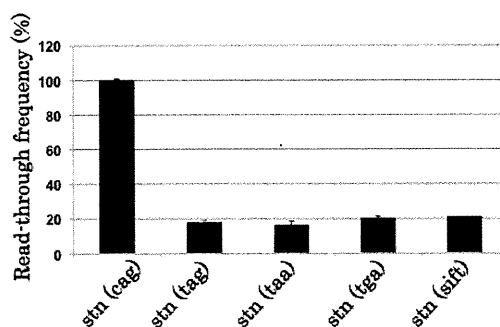


Figure 3. Quantification of the read-through frequency.

Read-through frequencies were expressed as percentage of the corresponding control *stn*(cag) in which the stop codon has been replaced by a sense "cag" glutamine codon.

鎖ポリペプチドを発現している可能性が考えられた。リードスルー頻度は終止コドンの種類や、終止コドンの前後の遺伝子配列により変化することが知られている。本研究においては *stn* 遺伝子におけるリードスルー頻度の解析を目的として、*stn* 遺伝子の上流と下流にレポーター遺伝子を結合させたレポータープラスミドを構築し (Figure 2)、本プラスミドを血清型 Enteritidis 株に導入した。リードスルー頻度は Stn の N 末端に結合させた β ガラクトシダーゼの活性と C 末端に結合させたルシフェラーゼの活性の比率により評価した。本評価系において血清型 Enteritidis 由来のインフレーム終止コドン (tag) を持つ *stn*(tag) のリードスルー頻度は 17.8% と算出されたが、この値はネガティブコントロールとして用いた *taa* 変異体 (*stn*(*taa*))、*tga* 変異体 (*stn*(*tga*)) 及び終止コドンを複数持つフレームシフト変異体 (*stn*(*sift*)) のリードスルー頻度と比較してほぼ同程度であった (Figure 3)。以上の結果から、血清型 Enteritidis の *stn* 遺伝子内のインフレーム終止コドンにおいて

高頻度のリードスルーは起きていないことが示唆された。

D. 考察

過去のPCR法を用いた様々な報告において、調査された全てのサルモネラ属菌に *stn* 遺伝子が存在し、加えてサルモネラ属菌以外の菌種で *stn* 遺伝子が検出されない事が報告され、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌特異的に存在する遺伝子である事が明らかにされてきた。しかしながら、これまでに *stn* 遺伝子として報告されている配列は血清型 Typhimurium 分離株由来の一種類のみであり、*stn* 遺伝子配列全体の保存性に関する知見は存在しなかった。我々は本研究において4つの血清型を含む31のサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子配列の比較解析を行い、その結果 *stn* 遺伝子配列は由来及び血清型の異なるサルモネラ属菌間でもその遺伝子配列全長に渡って高く保存されている事を明らかにした。一方で、血清型 Enteritidis 及び血清型 Agona においてはその配列内にインフレームの終止コドンが保存されている事が明らかになった。すなわち、*stn* 遺伝子の血清型間の相同性は非常に高いにもかかわらず、血清型によって構造の大きく異なる Stn タンパク質を発現している可能性が示唆された。特に血清型 Enteritidis においては血清型 Typhimurium に比較してC末端領域を大きく欠失させた Stn タンパク質を発現している可能性が示唆された。血清型 Enteritidis 内で発現している

Stn の一次構造について考察する目的で、血清型 Enteritidis 株からの抗 Stn モデルペプチド抗体を用いた Stn タンパク質の精製及び血清型 Enteritidis 内でのリードスルー頻度の解析を行ったが、いずれの解析においても血清型 Typhimurium と同様の一次構造をもった Stn タンパク質の血清型 Enteritidis 内での発現を支持するデータは得られなかった。

Stn の病原性に関しては、過去に海外のグループによって報告された *stn* 遺伝子欠失変異 Typhimurium 株を用いたマウス経口投与実験において、野生株に比して *stn* 欠失変異株での致死活性の低下が報告される等、サルモネラ属菌全体の病原性における Stn の重要性が報告されている。今回の解析で明らかになった血清型間の Stn の一次構造の相違は、サルモネラ属菌全体の病原性に対して影響を及ぼす可能性が考えられる。今後、今回調査を行わなかった血清型を含めた各々の血清型で発現している Stn の一次構造の解析することがサルモネラ属菌の病原性を理解する上で重要であると考えられる。

E. 結論

stn 遺伝子に関してはこれまでにそのサルモネラ属菌特異的な存在が広く知られていた。本年度の研究においては *stn* 遺伝子の配列解析を行い、その結果から血清型間で Stn タンパク質の一次構造に大きな相違が存在する事を示した。すなわち、サルモネラ属菌の病原性に対する Stn の寄与が血清型

により大きく異なる可能性が示唆され、今後、サルモネラ属菌感染症発症の分子機構を明らかにする上で、各血清型で発現しているStnタンパク質の構造を明らかにする事は不可欠であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., and Kohno S.: *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, 2011.
2. 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: Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, Indian J Med Res, 133: 387-394, 2011
3. Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K-I, Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, Ishiguro I: Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. Amyloid. 18: 112-118, 2011.

4. Monrat Chulanetra, Nitat Sookrung, Potjane Srimanote, Nitaya Indrawattana, Yuwaporn Sakolvaree, Manas Chongsa-nguan, Hisao Kurazono, Wanpen Chaicumpa: Toxic Marine Puffer Fish in Thailand Seas and Tetrodotoxin They Contained. Toxins. 3:1249-1262, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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
分担研究報告書

Escherichia albertii のゲノム解析と菌種同定マーカーの同定

研究分担者	林 哲也	宮崎大学 教授
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学 助教
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学 助教

研究要旨：

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 *Escherichia 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、② *pheU*-tRNA 遺伝子への LEE 領域の挿入、③ *cdtB* 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。

A. 研究目的

E. albertii は、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、*Citrobacter rodentium* と並んで、locus of enterocyte effacement (LEE 領域; コアとなる領域は、III 型分泌装置、intimin, 転写制御因子、数種類のエフェクター、シャペロン等をコードする 41 遺伝子からなる) にコードされる III 型分泌系と種々のエフェクターの作用により、attaching and effacing lesion と呼ばれる特徴的な形態変化を宿主

細胞に誘導し、腸管上皮に強固に結合するとともに、下痢などの臨床病態を引き起こしうる病原菌種として知られている。

本菌は、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、ヨーロッパやアメリカでの調査では、野鳥に病原性を示すとされている。しかし、ヒト病原菌としての位置づけは必ずしも明確ではなく、日本国内においては、本菌による感染症の報告はこれまでなかった。また、*E. albertii* は比較的

最近になってその存在が知られるようになった新しい菌種であることから、本菌についてのデータは少なく、基本性状が定まっていないのが現状である。したがって、これまでに分離されている *E. albertii* は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) や腸管病原性大腸菌 (EPEC) の指標である intimin をコードする *eae* 遺伝子の保有等をマーカーとして、当初は大腸菌として偶発的に分離された例が多く、本菌の遺伝的な性状や生化学的性状、あるいはヒトに対する病原性についても不明な点が多い。大腸菌との識別に有用な診断疫学マーカーも存在しない。

当研究グループでは、*eae* 遺伝子陽性 (LEE 保有) の大腸菌として分離された 275 株の進化系統解析を行い、26 株の *E. albertii* 株を同定した。したがって、EHEC や EPEC として分離されている大腸株の中に潜在的に相当数の *E. albertii* が含まれる可能性が高い。

本研究では、*E. albertii* に分類された 26 株について、遺伝的・生化学的性状解析を行い、さらに、そのうち 4 株について、Roch454 シーケンサーを用いた概要配列取得・大腸菌とのゲノム比較を行うことにより、大腸菌との鑑別等に有用な診断識別マーカーを検索することを試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株

国内外において分離された *eae* 遺伝子保有菌株 275 株 (ヒト由来 193 株、動物由来 76 株 [トリ、ブタ、ネコ、

ヒツジ、シカ]、環境由来 6 株) から *E. albertii* として同定された 26 株を用いた。菌株は、北海道・山形県・富山県・大阪府・福岡県・宮崎県の各地方衛生研究所の先生方、動物衛生研究所の小林秀樹博士、Federal Institute for Risk Assessment (Germany) の Lothar Beutin 博士、University of San Paulo (Brazil) の Tânia A. T. Gomes 博士、University of Liege (Belgium) の Jacques Mainil 博士から提供を受けた。

なお、倫理面に関しては、使用した菌株の分離年・臨床症状のみについての情報を得ているだけのため、特段の配慮を行なう必要はなかった。

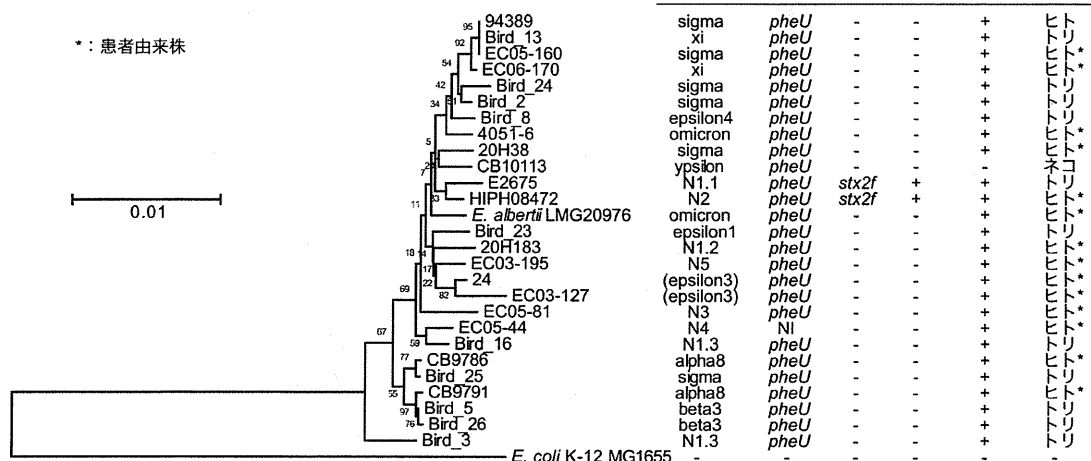
2) intimin サブタイピング

eae 遺伝子の配列決定は、Lacher ら (FEMS Microbiol. lett. 261:80-87, 2006) により報告された手法を用いた。具体的には、既知の *eae* 遺伝子サブタイプ間で配列保存性の高い領域の配列情報を基に、*eae* 遺伝子 (約 3kb) の 5'側前半部と 3'側後半部をそれぞれ PCR 増幅できる primer pair を作成し、PCR した後、その PCR 産物をダイレクトシーケンシングすることにより *eae* 遺伝子の全塩基配列を取得した。得られた塩基配列をアミノ酸配列に置換し、既知の intimin サブタイプとのアミノ酸配列比較により、95%以下の相同性を示すものを新規サブタイプとした。

3) PCR スクリーニング (*stx* 遺伝子, *cdtB* 遺伝子の有無および LEE 挿入部位の同定)

病原因子の PCR スクリーニングは、

図1 *E. albertii* の進化系統樹及び遺伝的特性



Stx1 及び Stx2 コード遺伝子(*stx1*, *stx2* and *stx2* バリエーション)と細胞致死膨化毒素 B サブユニット遺伝子 (*cdtB*) に対して行った。また、LEE の挿入部位の同定は、これまでに EHEC や EPEC の LEE 挿入部位として同定されている 3 カ所の tRNA 遺伝子 (*pheV*, *selC*, *pheU*) 領域について行った。

4) 生化学的性状解析

生化学的性状検査は、一般的な手法により行った。糖分解については、Andrade peptone water (OXOID) に糖を 1% 添加して行った。リジン及びオルニチン脱炭酸酵素、アルギニン加水分解酵素の産生能は、それぞれポアメディア R メラーリジン培地、ポアメディア R メラーオルニチン培地、ポアメディア R メラーアルギニン培地 (栄研化学) を用いて検定した。

5) 志賀毒素産生試験

stx2f 遺伝子を保有する 2 株の *E. albertii* 株について、CYME 培地 (マイトマイシン C 存在・非存在下) で 16 時間振とう培養し、その培養上清を用いて VTEC-RPLA 「生研」により志

賀毒素産生性を判定した。

6) Roche454 シーケンサーによるゲノム解析

図 1 に示した *E. albertii* 株の進化系統樹において比較的系統の離れた 4 株 (Bird_3 株, CB9786 株, HIPH08472 株, EC06-170 株) についてゲノム概要配列を取得した。具体的には、ショットガンシーケンシングにより 1 株あたり約 150 Mb (約 400 bp x 37 万 reads)、さらにペアエンド法を用いて約 8 kb 長のゲノム DNA ライブラリーについて約 25 万 reads 取得し、前述のショットガンデータとともにアセンブルしてゲノム概要配列を得た。また、GenomeMatcher ソフトウェアの Blast2sequences 機能を用いて、これら 4 株の概要配列間及び大腸菌 K-12 MG1655 株の全ゲノム配列との間でアライメント及び配列相同性の比較を行った。

C. 研究結果

1) intimin サブタイプ

26 株についての intimin サブタイプ

表1 Comparison of biochemical properties of *E. albertii* strains

	26 of <i>E. albertii</i> strains (this study)	<i>E. albertii</i> LMG20976 (type strain)	<i>E. albertii</i> strains (Ref. 1)	<i>E. coli</i> (Ref. 2)
Indole	96.2†	-	100	98†
Motility	0	-	0	95
Urea	0	-	0	1
ONPG	88.5	+	ND	ND
MUG	0	-	ND	(+)‡
Citrate	0	-	0	1
Acetate	92.3	+	ND	90
Malonate	0	-	ND	0
H ₂ S on TSI	0	-	ND	1
VP	0	-	ND	0
Lysine decarboxylase	100	+	100	90
Ornithine decarboxylase	100	+	100	65
Arginine dihydrolase	0	-	0	17
Glucose, acid	100	+	100	100
Glucose, gas	100	+	100	95
Adonitol	0	-	ND	0
L-Arabinose	100	+	100	99
Cellobiose	0	-	ND	2
Dulcitol	0	-	ND	60
myo-Inositol	0	-	ND	1
Lactose	3.9	-	0	95
Acid from:				
Maltose	88.5	+	ND	95
Mannitol	100	+	100	100
L-Rhamnose	0	-	0	0
Salicin	26.9	-	ND	40
D-Sorbitol	57.7	-	V	94
Sucrose	19.2	-	0	50
Trehalose	96.2	+	ND	98
D-Xylose	0	-	0	95

*ONPG, ortho-Nitrophenyl-β-galactoside; MUG, methylumbelliferyl-β-D-glucuronide; -, negative; +, positive; ND, not determined.

†: average (%) of the positive strains

‡: most *E. coli* strains produce β-D-glucuronidase.

Ref.1: Oaks et al. (2010) Emerg Infect Dis. 16:638-46.

Ref.2: Manual of clinical microbiology, 9th edition (2007) "Escherichia, Shigella, and Salmonella"

ングの結果、8株が5種類の新規サブタイプのいずれかを保有しており、残りの18株は既知の *intimin* サブタイプではあるものの大腸菌ではマイナーなサブタイプを保有していた。この結果は、*E. albertii* の系統にまだ数多くの新規サブタイプが存在する可能性を示唆する。

2) PCR スクリーニング (*stx* 遺伝子と *cdtB* 遺伝子の有無及び LEE 領域の挿入部位の同定)

cdtB 遺伝子: CB10113 株を除く全ての株がバリエーション II, III, V 型に近いタイプの *cdtB* 遺伝子を保有していた。また、E2675 株と HIPH08472 株はバリア

ント I 型タイプも併せて保有していた。

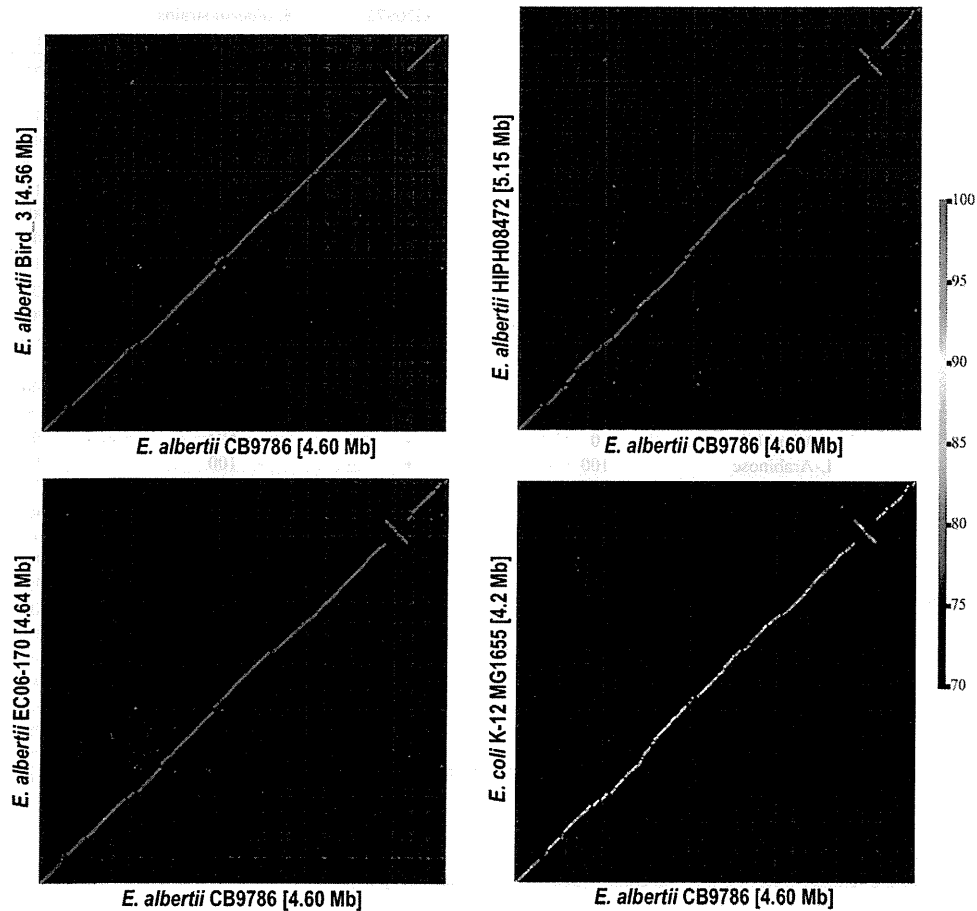
stx 遺伝子: E2675 株と HIPH08472 株が *stx2f* 遺伝子を保有していた。

LEE 領域の挿入部位: *eae* 遺伝子サブタイプは多様であるが、その遺伝子を含む LEE 領域は、26 株全てにおいて *pheU*-tRNA 遺伝子に挿入されていることが明らかとなった。

3) *stx2f* 保有株の志賀毒素産生性

stx2f 遺伝子を保有する 2 株 (E2675 株、HIPH08472 株) について、VTEC-RPLA を用いたラテックス凝集試験を行った。その結果、どちらの株においても毒素産生が検出されたが、ヒト下痢患者由来の HIPH08472 株の

図2 Blast2sequencesによる*E. albertii*菌株間及び大腸菌とのゲノム比較



方で明らかに高い毒素産生性が検出された。

4) 生化学的性状

26株についての生化学的性状解析を行い、大腸菌と異なる生化学的性状を同定することを試みた。その結果、糖分解能に関して、lactose, D-xylose, dulcitol はほぼ全ての株で陰性を示した。また、 β -グルクロニダーゼ非産生であり、運動性を示さないことも明らかとなった(表1)。

5) ゲノム概要配列の取得および大腸菌とのゲノム比較解析

Roche454を用いた4株のゲノム解

析の結果、推定ゲノムサイズと比べて、ショットガンシーケンスからは平均重複度約33倍、ペアエンドライブラリー(8 kb長)からは平均重複度約159倍の配列データが得られた。4株ともにゲノム完全長配列は得られていないが、予備的な解析からゲノムサイズは4.5-5.0 Mb程度と推定され、*stx2f* 遺伝子を保有するHIPH08472株のみが2つのプラスミドを保有していることが明らかとなった。また、Blast2sequencesによる解析の結果、*E. albertii* 株間および大腸菌との菌種間で大きなゲノムリアレンジメントは

検出されなかった。しかし、配列相同性については、*E. albertii* 株間では保存性が非常に高いが、*E. albertii* と大腸菌との菌種間では保存性が低いことが明らかとなり（90%程度の nucleotide sequence identity）、この結果から、この2菌種は明らかに遺伝的に異なる菌種であることが示された（図2）。

D. 考察

E. albertii は最近同定された病原菌種であり、一般的な細菌学的性状については不明な点が多い。これまでの研究から、本菌の遺伝的特性として、*eae* 遺伝子及び *cdtB* 遺伝子の保有、また、生化学的性状に関しては、lactose 及び D-xylose の分解能の違いが示されていた。しかしながら、大腸菌の性質と重複するものも多く、正確な鑑別には、これらの特徴だけでは十分とはいえない。本研究では、26株の *E. albertii* 株について詳細な解析を行い、上記の特徴に加えて複数の遺伝的・生化学的特性を見出した。ただし、注意すべきことは、これまでに解析されている *E. albertii* 株が、EHEC や EPEC の指標である *eae* 遺伝子の保有等をマーカーとして分離されたものであるため、菌株選定において一定のバイアスがかかっている可能性がある点である。当研究グループでは、現在、26株の *E. albertii* のうちの4株についてのゲノム解析を行い、これまでの *E. albertii* 分離基準と異なる識別マーカーの検索・開発を進めている。予備的な解析ではあるが、既知の大腸菌ゲノムとの

比較により、*E. albertii* の菌種特異的な配列・ゲノム領域を多数同定しており、これらは有用な新規診断疫学マーカーの開発に利用できると期待される。

志賀毒素産生菌は、これまで EHEC や赤痢菌が報告されており、我が国の感染症法においても重要視されている。本研究では、*E. albertii* の中に Stx2f を産生する株が存在することが明らかとなり、新たに本菌が志賀毒素産生菌種の一つであることが示された。Stx2f に関してヒトにおける病原性については不明な点があるものの、ヒトへの病原性が明らかとなっている他のタイプの *stx* 遺伝子を保有する *E. albertii* が存在する可能性もあり、志賀毒素産生菌の1つとして *E. albertii* のさらなる解析が必要であろう。

E. 結論

eae 遺伝子陽性（LEE 保有）の *E. albertii* 26株について、遺伝的・生化学的解析とゲノム解析を行った。その結果、これまでの研究に加えて、本菌の特性が多数同定された。また、新たに本菌が志賀毒素産生菌種であることも明らかとなった。今後は、*E. albertii* について、これまでの遺伝的・生化学的性状解析に加え、ゲノム情報についてより詳細な解析を行い、大腸菌との鑑別や疫学解析に利用できるマーカーのレパトリーを充実させるとともに、ヒト病原菌としての本菌の特性等を明らかにする必要がある。

F. 健康危機情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

1.論文発表

- (1) Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, DL. Paslier, T.Yamada, DR. Mende, GR. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, JM. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, 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.
- (2) 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.
- (3) Kuwahara, T., Y. Ogura, K. Oshima, K. Kurokawa, T. Ooka, H. Hirakawa, T. Itoh, H. Nakayama-Imaohji, 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.
- (4) 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.
- (5) Islam, K.B., S. Fukiya, M. Hagio, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, and A. Yokota. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141(5):1773-81.
- (6) 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)
- (7) 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)
- (8) Murase, K., T. Ooka, A. Iguchi, Y. Ogura, K. Nakayama, Md. Asdulghani,

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)

(9) 小椋義俊, 林哲也: 6.1 病原菌と常在菌の境界 (第6章腸内共生系の破綻と疾病). pp207-219, 腸内共生系のバイオサイエンス, 財団法人日本ビフィズス菌センター編, 2011年5月, 丸善出版, 東京, 全292頁.

2.学会発表

(1) 林哲也 (招待): 病原菌のゲノム解析から菌株の多様性をみる: 病原性大腸菌を例として. 第54回春季日本歯周病学会学術大会. 5/26-27, 2011, 福岡.

(2) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 金子紀子, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: *eae* 遺伝子保有株における *Escherichia albertii* の分布及びその性状とゲノム特性. 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2011, 大阪.

(3) 江藤良樹, 市原祥子, 堀川和美, 大岡唯祐, 林哲也, 寺嶋淳: IS-printing において観察されたエクストラバンドの検討. 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2011, 大阪.

(4) Md. R. Islam, Y. Ogura, Md. Asadulghani, T. Ooka, K. Murase, K. Nakayama, and T. Hayashi: Systematic functional analysis of the genes in Sp5,

the Stx2 phage of O157:H7 Sakai. 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2011, 大阪.

(5) 小椋義俊 (招待講演): ゲノム解析から見えてきた腸管出血性大腸菌の病原性進化メカニズム. 日本細菌学会関東支部・ICD制度協議会共催「緊急セミナー: 腸管出血性大腸菌の今」, 8/2, 2011, 東京.

(6) T. Ooka, Y. Ogura, and T. Hayashi: Identification and genome sequencing of stx2f-positive *Escherichia albertii* strains. 日米コレラ日本側総会. 8/3, 2011, 京都.

(7) 小椋義俊: 腸管出血性大腸菌O157の志賀毒素フェージの比較解析. 第5回細菌学若手コロッセウム, 8/8-10, 2011, 高知.

(8) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 金子紀子, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 種々の *eae* 遺伝子保有株における *Escherichia albertii* の分布とその性状解析. 第64回日本細菌学会九州支部総会, 8/26-27, 2011, 北九州市.

(9) T. Hayashi: Mobile genetic elements in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): their roles in the EHEC genome evolution and diversification. SGM Autumn Conference 2011 The University of York, 05-07 September. York, UK.

(10) A. Iguchi, H. Shirai, K. Seto, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Osawa, and R. Osawa: Evidence for horizontal transfer of O157-antigen biosynthesis