

の場合、*Campylobacter* 食中毒は発生件数でみ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* の主要病原性因子は特定されていない。近年、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* が菌体の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、構造と機能の解析に努めてきた。本研究では、食中毒由来の *C. fetus* と *C. lari* について解析を行った。また、電子顕微鏡を駆使して CHSDU 解析を行い、より詳細な構造モデルを構築した。

## B. 研究方法

菌株：東京都健康安全研究センターから分与された食中毒由来の *C. fetus* と *C. lari* を用いた。対照として、*C. jejuni* ATCC33560 と *C. coli* M5 を用いた。  
運動性解析：10% 血清 (Fatal bovine serum) ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で培養し、運動解析装置を用いて解析した。

電子顕微鏡解析：走査型電子顕微鏡

(SEM) 解析の場合には、菌株をまず plastic coverslip に粘着させ、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定。さらに脱水後、臨界点乾燥を行い、金属蒸着した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析の場合には、上記の脱水処理資料を EPOK812 処理し、超薄切片化した後、酢酸ウラニウム・クエン酸鉛で染色した。

## C. 研究結果

*C. jejuni* や *C. coli* が示す CHSDU 構造を図 1 に示した。鞭毛が存在する菌端にだけ特異なカップ様構造を認める (右上挿入図、矢印)。*C. fetus* と *C. lari* にも同様の極構造が存在した (図 2)。また遊泳速度も *C. jejuni* や *C. coli* と同じで  $100 \mu\text{m/s}$  以上の高速であった。透過型電子顕微鏡解析の結果に基づいて構築した、最も可能性の高い CHSDU 構造モデルを図 3 に示した。

## D. 考察

現在までに得られている *C. jejuni* (や *C. coli*) の運動特性と関連構造に関する成果は以下の如くである。

1) 環境温度 ( $20^{\circ}\text{C}$ ) では非運動性で、人体温度 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) あるいは鶏体温 ( $42^{\circ}\text{C}$ ) で  $>100 \mu\text{m/s}$  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られる。

2) *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。

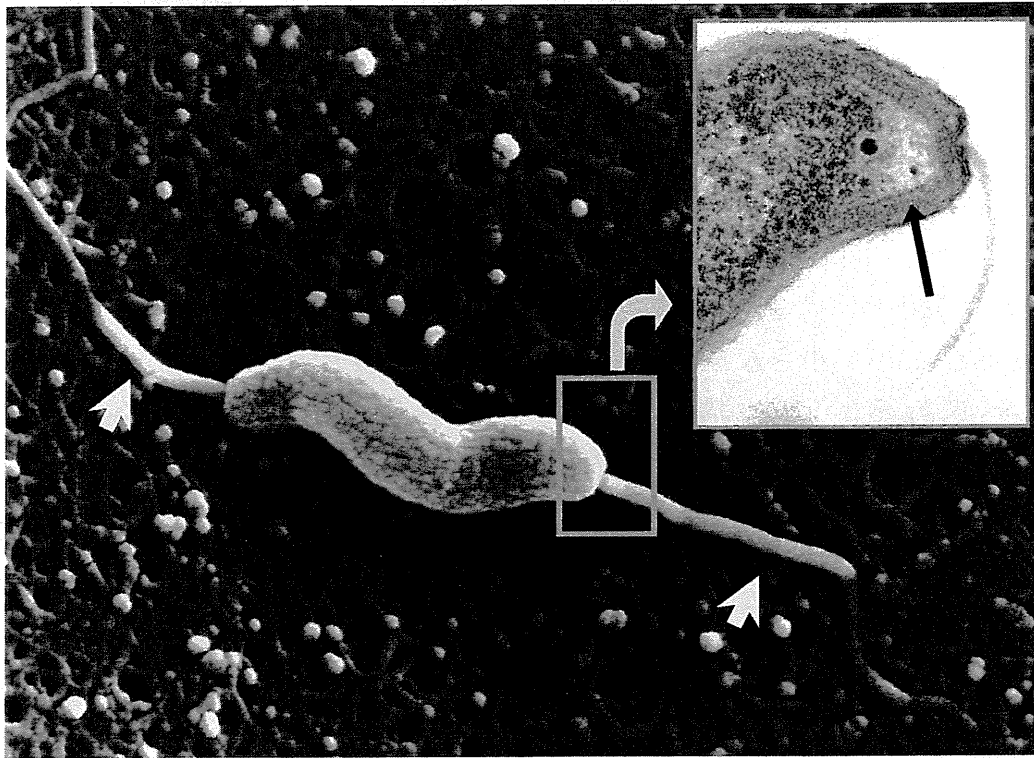


図1 *Campylobacter jejini*の鞭毛（中央の走査型電子顕微鏡像）と菌端のカップ様構造（右上の挿入透過型電子顕微鏡像）  
 矢じり、鞭毛；矢印、菌端カップ様構造。*C. coli*も*C. jejini*と同様の構造をもつ。

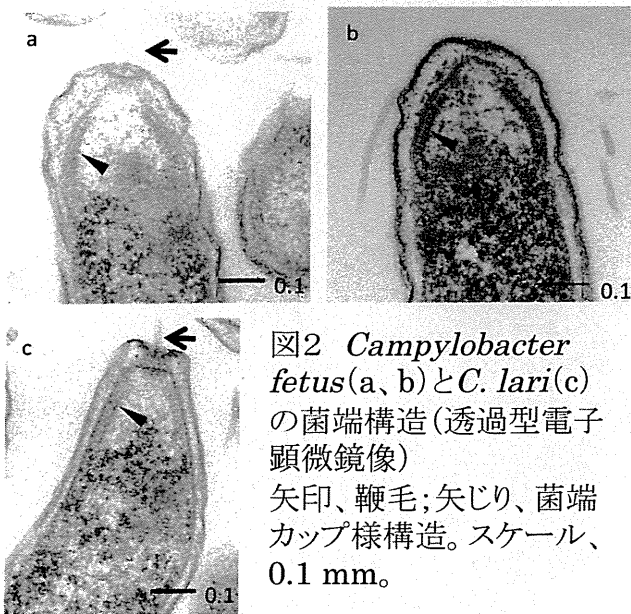


図2 *Campylobacter fetus*(a, b)と*C. lari*(c)の菌端構造(透過型電子顕微鏡像)  
 矢印、鞭毛；矢じり、菌端カップ様構造。スケール、0.1 mm。

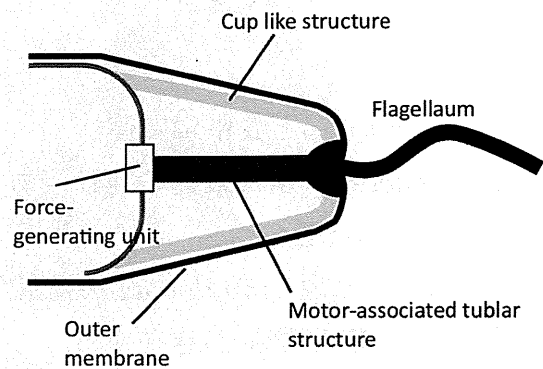


図3 *Campylobacter*属菌がもつ鞭毛高速駆動ユニット（CHSDU）の構造モデル

3) 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。

4) *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。

5) 現在、*Campylobacter* だけがもつ CHSDU 構造の解明をさらに進めている。また、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。

## E. 結論

(1) *C. jejuni* など食中毒関連

*Campylobacter* 属菌は最速の運動能力 (>100  $\mu\text{m/s}$ ) をもつ。

(2) 菌端には、*Campylobacter* 属菌だけがもつ CHSDU 構造が存在する。

(3) CHSDU 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。

## F. 健康危機情報

### *C. jejuni* など食中毒関連

*Campylobacter* 属菌は細菌の中で最速の運動能力 (>100  $\mu\text{m/s}$ ) をもつ。鶏肉の解体過程などで液体 (水) を使用する場合には拡散に注意が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

(1) Yamamoto, T., T. Takano, A. Nishiyama, and K. Saito. Strong motility and high-speed-driving units in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (Vancouver, Canada), 2011 (8月)

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

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

研究分担者 野田 公俊 千葉大学教授  
研究協力者 八尋 錦之助 千葉大学特任准教授

研究要旨：

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。

A. 研究目的

EHEC の産生する subtilase cytotoxin (SubAB)は低濃度(ng)で培養細胞に対して、アポトーシスを引き起こす。その作用機序として、本毒素の毒性発現領域である A サブユニットが、小胞体に存在するシャペロン BiP を基質として分解し、その結果 ER stress に起因する細胞致死に至ると考えられる。

本研究において、EHEC の感染における SubAB の病態発現における役割を理解するため、マウスを用い、生化学的、病理学的解析を行い、病態発現機序を明らかにする。

B. 研究方法

1) リコンビナント SubAB の発現と精製

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubAB(S272A) を Ni-NTA カラム により精製して実験に用いた。

2) SubAB のマウスへの投与と病理学的解析

メスの Balb/c マウス (4-5 週齢) に SubAB

あるいは、毒素活性を欠損させた変異体 mSubAB(S272A/H89A)、コントロール(PBS)を腹腔内へ注射した後、経時的に血液を採取し、生化学的解析を行った。また、開腹後、各臓器をホルマリンで固定し、HE 染色後、病理学的解析を行った。動物実験と細菌の取り扱い等に関しては、千葉大学の規則に従った。

3) PET-CT による解析

マウス体内の炎症部位を特定するため、<sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxy-D-glucose(<sup>18</sup>F-FDG)を用いた PET-CT を行った。毒素を投与し、24時間後、<sup>18</sup>F-FDG を微静脈より注射し、50分後、PET システムにより解析を行った。

4) RT-PCR

SubAB 或は変異体 mSubAB を投与したマウスから小腸を取り出し、トータル RNA を抽出した。次いで、Readay-to-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) を用い、cDNA を合成後、炎症性サイトカインのプライ

マーを用い、発現の有無を解析した。

## 【結果と考察】

### 1) 致死活性

マウスに SubAB あるいは変異体 mSubAB を投与した。変異体 SubAB ではマウスに変化は見られなかった。SubAB (10 mg/body) 処理したマウスは、36 時間後から運動量の減少が認められ、48-72 時間後までに全て致死に至った。

### 2) 開腹所見

開腹所見から、毒素投与後 48 時間で消化管上部からの大量の出血を認め、この出血によるためと思われる肝臓の白色化(虚血)、更に脾臓の萎縮が認められた (Fig. 1)。

### 3) 生化学的検査

経時的に採取した血液の生化学的解析から、SubAB 処理したマウスでは、血液中の BUN、AST、ALT、LDH、AMY、WBC の増加と、PLT、BS、TP、ALB、T-Cho、TG の減少が認められた。更に、48 時間後の血液の PT、APTT の増加が認められた。以上の結果は、SubAB による肝臓での虚血等による障害 (AST、ALT)、消化管からの出血、腎臓障害(BUN)、炎症応答による白血球の増加 (WBC) を示唆するものである。また、PT、APTT の増加は血小板の減少 (PLT) によるものであると考えられる。

### 4) $^{18}\text{F}$ -FDG PET による解析

SubAB の投与によって引き起こされる炎症が、マウスのどの部位で起こるのか  $^{18}\text{F}$ -FDG の炎症を起こした組織への取り込みを PET により解析した。6 時間後では、有意な取り込みが認められなかった、24 時間後では、腸管部へ

の取り込みが認められたが、他の臓器への著明な取り込みは認められなかった。病理所見で深刻な炎症が認められた 48 時間後では、 $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込みが認められなかった。これは、炎症を伴う出血で組織が脱落し、 $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込みができなかったと考えられる。

### 5) 病理学的解析

各組織を経時的に摘出し、病理学的解析を行った。変異体 SubAB を注射したマウスと比べ、SubAB を処理したマウスでは早いものでは、6 時間後から、上部消化管において炎症が認められ、48 時間後には、好中球の浸潤と出血を伴う炎症が観察された (Fig. 2)。

48時間後に、腎臓において、メサングウム細胞の増殖と、糸球体近接合部組織の過形成が認められた。

脾臓における所見では、赤脾髄は、マクロファージ系と思われる細胞及びリンパ球、形質細胞の、数が増加し、ラッセル小体の増加など免疫グロブリンを多量に産生している所見が伺えた。白脾髄は紡錘形の細胞が増えており、樹状細胞などこれも免疫系の細胞、芽球などが増えている可能性が示唆された。

### 6) 腸管における炎症性サイトカインの検出

生化学的解析と病理学的所見から、SubAB により腸管での、好中球の浸潤、出血を伴う炎症を引き起こしていることから、炎症性サイトカインの誘導、関与があるのではないかと推察されたため、RT-PCR により代表的な炎症性サイトカインの発現の有無を調べた。結果、

コントロールマウスと変異体 mSubAB 処理したマウス群とを比較して、SubAB を処理したマウスの腸管において、有意な IL6 mRNA の増加が認められた。一方、IL4、IL12 mRNA の発現は SubAB、変異体 mSubAB 共に減少が認められた。

IL6 は炎症、ストレス応答への関与や、腎臓のメサンギウム細胞の成長因子として知られている。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

##### 2. 学会発表

1. 腸管出血性大腸菌の産生する SubAB のマウスにおける病態発現解析  
第 58 回トキシシンポジウム 2011. 7. 6-7.

八尋錦之助、古川 健、寺崎 泰弘、辻 厚至、盛永直子、野田公俊

2. Subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces fetal hemorrhage in mice.  
IUMS2011. 2011. 9. 7.

Takeshi Furukawa, Kinnosuke Yahiro, Atsushi B. Tsuji, Yasuhiro Terasaki, Naoko Morinaga, Masaru Miyazaki, Yuh Fukuda, Tsuneo Saga, Masatoshi Noda.

3. Subtilase cytotoxin produced by *Escherichia coli* induces fatal hemorrhage in mice.  
46th US-Japan Cholera and Other Bacterial

Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2010. 12. 13-15.

Kinnosuke Yahiro, Takeshi Furukawa, Atsushi B. Tsuji, Yasuhiro Terasaki, Naoko Morinaga, Masatoshi Noda

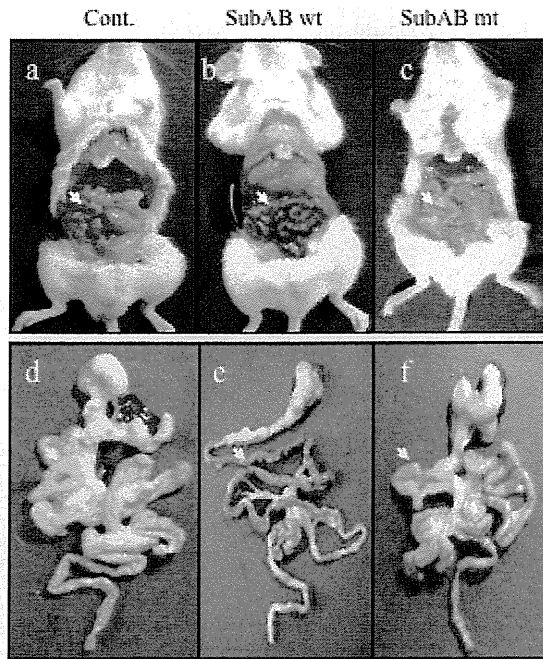


Fig. 1.

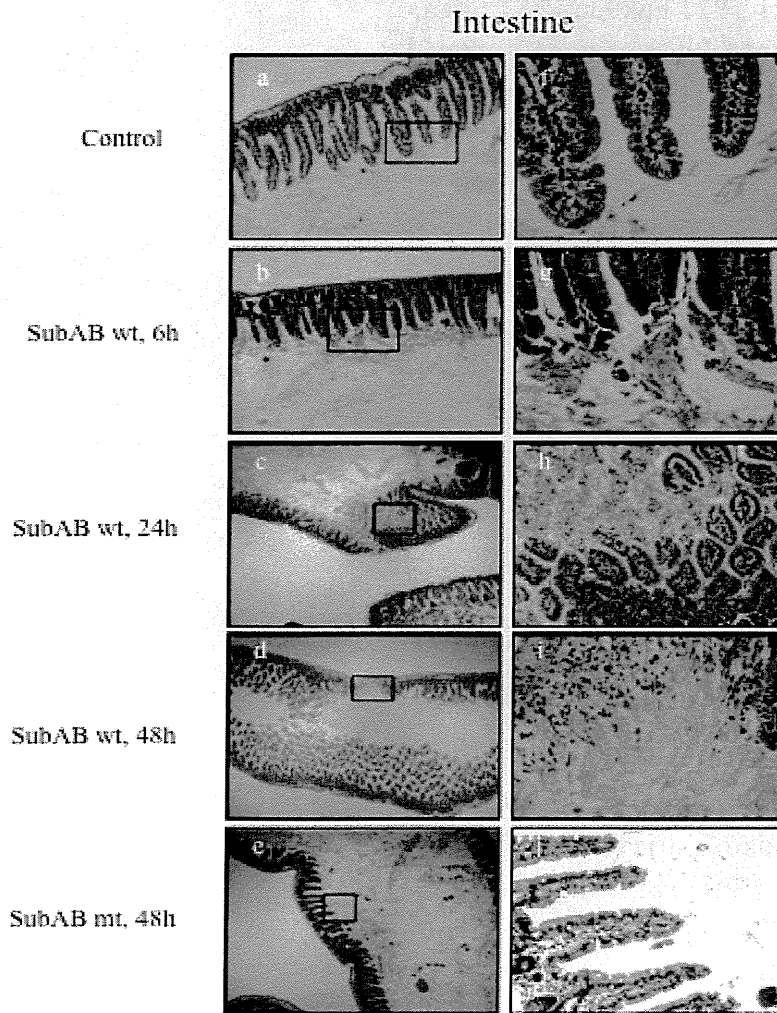


Fig. 2.

## 研究発表一覧

### A. 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. Pui, 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. Pui, 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 cholera 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, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16S rDNA, *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. Dis.. 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) 大楠清文, 江崎孝行. 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践, 医学のあゆみ 2011年 ; 237 巻 : 193-199.
- 19) 江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張繼偉, 大楠清文. 【新たなゲノムベースの感染症診断・開発の現状、応用と展望-】 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査, 化学療法の領域 2011年 ; 29 巻: 2006-2020
- 20) 大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応, 日本化学療法学雑誌 2011年 ; 59 巻 : 441-453.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 飯田哲也 : 感染症診断法の新天地. 化学療法の領域(2011)27:1986-1987. 中村昇太, 中屋隆明, 飯田哲也 : 感染症のメタゲノミック診断. 化学療法の領域 (2011)27:2078-2084.
- 25) 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

- 26) 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.
- 27) Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., 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<sub>L</sub>, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. Digestive Diseases and Science. 56: 999-1006.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Islam, K.B., S. Fukiya, M. Hagi, 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.
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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.
- 40) Sato, Y., A. Takaya and T. Yamamoto. 2011. Meta-analytic approach to the acute prediction of secreted virulence effectors in gram-negative bacteria. BMC

- 41) 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.
- 42) 山本友子。細胞内寄生性細菌のストレス応答と病原性発現制御機構 2011. *日細菌誌* 66 : 517-529.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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 $\gamma$ -induced persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection model in epithelial HEp-2 cells. *J. Infect. Chemother.* in press.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 48) Hirao, S., H. Wada, K. Nakagaki, T. Saraya, D. Kurai, S. Mikura, T. Yasutake, M. Higaki, T. Yokoyama, H. Ishii, K. Nakata, T. Aakashii, 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.
- 49) 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  $\beta$ -lactamase CTX-M-27 between *Escherichia coli* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 527-30.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.

## B. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 中口義次、Abdul Aziz Djamel、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)
- 3) 田中夏子、山崎渉、Varaporn Vuddhakul、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)
- 4) 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)
- 5) 中口義次、Nguyen Binh Minh、Abdul Aziz Djamel、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)
- 6) 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)
- 7) 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*. 46<sup>th</sup> US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2011. December 13-15, 2011, Kolkata, India
- 8) 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.

- 9) 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。
- 10) Nguyen, D. T., Iwami, M., and Ehara, M. Integration of two types of filamentous phages into the chromosomal DNA of *Vibrio cholerae* O1. 第85回日本細菌学会総会、2012年 3月 27-29日 (長崎) で発表予定。
- 11) Wang, L., Wakushima, M., Nishikawa, Y., and Kamata, Y. 2011. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among foods, domestic animals, and human: isolation by a colony-hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:60.
- 12) Nakashima, R., Nishikawa, Y., and Kamata, Y. 2011. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) and guanylin on barrier integrity in intestinal epithelial cells. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:72.
- 13) Tanimoto, Y., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. 2011. Comparison of abilities to induce IL-8 secretion on Caco-2 cells of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients and healthy carriers. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:72.
- 14) Tanimoto, Y., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. (2011) Abilities to induce IL-8 secretion on Caco-2 cells of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients and healthy carriers. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology/XIII International Congress of Mycology, Sapporo Convention Center, Abstract:237.
- 15) Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. (2011) Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among foods, domestic animals, and human: isolation by a colony-hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in



combination with multiplex real-time PCR. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 46th Conference, Kolkata, India, Abstract:159-164.

- 16) 中島 涼、西川禎一、鎌田洋一. T84 細胞における大腸菌耐熱性エンテロトキシン(STa) と Guanylin の影響、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.33
- 17) 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一. 下痢症患者および健康者に由来する分散接着性大腸菌の腸粘膜上皮細胞に対する炎症性サイトカイン誘導性、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.34
- 18) Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. Prevalence and properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from foods and faecal specimens of pigs, cattle, and healthy humans.
- 19) Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. Prevalence and properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from foods and faecal specimens of pigs, cattle, and healthy humans.第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.20
- 20) Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. Prevalence and properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from foods and faecal specimens of pigs, cattle, and healthy humans.
- 21) 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一. 下痢症患者および健康者から分離された分散接着性大腸菌の腸粘膜上皮細胞に対する炎症性サイトカイン誘導の比較、第 32 回日本食品微生物学会学術総会、平成 23 年 10 月 6-7 日 東京 p.30
- 22) 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一. 下痢症患者および健康者から分離された分散接着性大腸菌の Caco-2 細胞に対する IL-8 誘導性、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、平成 23 年 5 月 13-15 日 東京 p.107
- 23) 西堀友之、柴田裕介、Made Agus Hendrayana、大澤朗：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、第 45 回腸炎ビブリオシンポジウム、抄録集 p.13 (国立感染症研究所) (2011.10)
- 24) 西堀友之、柴田裕介、Made Agus Hendrayana、大澤朗：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、第 64 回日本細菌学会関西支

部総会、予稿集、p.23 (大阪府立大学中百舌鳥キャンパス) (2011.11.19)

- 25) Ezaki, T., Hayashi, M, Takuya Mizuno T., Izumi Kanazawa, K. Asami Mori, and Kiyofumi Ohkusu. 1st Harpin International Symposium: Survival strategy of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection 1st international Symposium on Salmonellosis. Harpin, May, China, 2011
- 26) Ezaki T. Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water. 2011 International Conference on Environmental OMICS., Guangzhou November 8 - 12, 2011
- 27) Ezaki T. Mizuno T, Hayashi M, Asami Mori, Shigeru Yoshida Izumi Kanazawa, and Kiyofumi Ohkusu . Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete genome era. 46<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. December 13-15, Kolkata, India. 2011.
- 28) Ezaki, T. T. Mizuno, I. Kanazawa, M. Hayashi, S. Yoshida, J.W. Zhang, and K. Ohkusu. Shall We Spin out Classical Taxonomy of High Risk Pathogens Even after Complete Genome Era IUMS Sapporo, Japan. 2011.
- 29) Ezaki T. Quick respiratory panel assay for screening of bacterial and viral pneumonia. IUMS Symposium Sapporo, Japan. 2011.
- 30) 飯田哲也 : 次世代シーケンスによる感染症防御. 2011 次世代シーケンサーセミナー「1G シーケンスの挑戦、ゲノム解析の新たな地平へ」日経バイオテク創刊 30 周年記念セミナー コクヨホール、品川、2011 年 11 月 30 日
- 31) 飯田哲也、中村昇太、中屋隆明 : 次世代シーケンサーを用いた臨床検体からの病原体探索. DNA シーケンサー最先端セミナー【大阪大学】 次 n 世代ゲノムシーケンス技術がもたらす新潮流. 大阪大学吹田キャンパス テクノアライアンス棟 2011 年 7 月 20 日
- 32) Yamazaki, W., S. Yamada, T. Taniguchi, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and N. Misawa. 2011. Rapid, simple and cost-effective detection of the trh gene of *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. 46th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Kolkata, India. pp13-pp22.

- 33) Tanaka, N., W. Yamazaki, V. Vuddhakul, F. Gondaira, J. Sugiyama, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2011. A method combining a new immunomagnetic separation technique and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for sensitive detection of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. 46th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Kolkata, India. pp286.
- 34) 田中夏子、山崎 渉、V. Vuddhakul、権平文夫、杉山純一、中口義次、西渕光昭. 2011. 魚介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. 10 月 20 日 - 10 月 21 日. pp10.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 小椋義俊 : 腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素ファージの比較解析. 第 5 回細菌学若手コロッセウム, 8/8-10, 2011, 高知.

- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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 gene clusters in multiple evolutionary lineages of *Escherichia coli*. IUMS 2011, 6 September, 2011, Sapporo.
- 45) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, M. Bardiau, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, Y. Ogura, K. Nakayama, J. Mainil, and T. Hayashi: Phylogenetic and intimin-subtyping analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- 46) Y. Ogura, M. Ohnishi, T. Mako, K. Kawano, T. Ooka, and T. Hayashi: Comparative analysis of STX2 prophages in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O-157. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- 47) K. Murase, T. Ooka, Y. Ogura, A. Iguchi, K. Nakayama, Md Asadulghani, Md.R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin, and T. Hayashi: Hemolysin E- and enterohemolysin-derived hemolytic activities of the O55/O157 and other *Escherichia coli* lineages. IUMS 2011, 7 September, 2011, Sapporo.
- 48) Md.R. Islam, Y. Ogura, Md. Asadulghani, K. Murase, T. Ooka, K. Nakayama, and T. Hayashi: Systematic functional analysis of the genes in SP5, the STX2 phage of O157:H7 Sakai. 7 September, 2011, Sapporo.
- 49) T. Hayashi: Mechanisms for the parallel evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and the genome diversification among O157 EHEC strains. IUMS 2011, 10 September, 2011, Sapporo.
- 50) J.G. Mainil, M. Bardiau, T. Ooka, Y. Etoh, S. Ichihara, K. Horikawa, G. Buvens, D. Pierard, and T. Hayashi: IS621 typing and PFGE of O26:H11 enterohemorrhagic