

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

腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の発症メカニズムと
組織学的アジスロマイシンの治療効果に関する研究

研究分担者 藤井 潤 九州大学医学研究院大学准教授
研究協力者 Muhammad Yunus Amran 九州大学大学院博士課程

研究要旨：

ベロ毒素 2c 型産生大腸菌 (E32511 株) を経口感染させて血液脳関門 (BBB) が障害されるモデルを用い、ベロ毒素レセプター合成酵素の *in situ* hybridization と免疫組織学的研究を行った。その結果、ベロ毒素の標的細胞は延髄網様体神経細胞と脊髄全角運動神経細胞であった。また、このモデルではアストロサイトの活性化を認め、それに伴って脳血管周囲の aquaporin 4 が消失していた。ミクログリアの活性は認めなかった。アジスロマイシンを投与された E32511 マウスモデルでは、HE 染色で病変を認めず、アジスロマイシン有効性が組織学的に明らかとなった。

A. 研究目的

1994 年、私達は、腸管出血性大腸菌 O157 を経口感染させ、急性脳症を発症するマウスを開発した (Infect. Immun. 62(8): 3447-3453 1994)。このマウスモデルは、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が、破壊されており、BBB の破綻が死因であると報告した。今回、私達が開発したマウスモデルを使って、さらに詳細に BBB の破壊のメカニズムを解明することを目的とした。さらに前回報告したアジスロマイシンの有効性を組織学的に検討した。

B. 研究方法

4 週齢 ICR マウスに、ストレプトマイシン (SM) を 3 日間飲ませ、その後と

マイトマイシン C (MMC) に耐性の Stx2c-producing *Escherichia coli* O157 (E32155/HSC SM^r, MMC^r; E32511 と略) を 10¹¹CFU 経口投与し、同時に MMC を 2.5mg/kg 腹腔内投与すると 100%のマウスは四肢麻痺を生じて死亡した。この感染モデルを E32511 モデルとした。4 週齢 ICR マウスに Lipopolysaccharide (LPS) を 500 µg/kg、1 日 1 回 3 日間、腹腔内投与 (i.p.) した。これを LPS モデルとした。

1) *in situ* hybridization (ISH)

ベロ毒素のレセプターは globotriaosylceramide (Gb3) という糖脂質である。ICR マウス脳での Gb3 合成酵素遺伝子の発現を検証するため、Gb3 合成酵素遺伝子プローブを作成し、マウス脳のパラフィン切片を用いて ISH

を行った。

2) 免疫染色

マウスは E32511 感染 5 日目に灌流固定され、脳を取り出された。次にパラフィン包埋ブロックからパラフィン切片を作成して免疫染色を行った。

一次抗体は

① アポトーシスの検出のため、polyclonal anti-cleaved caspase-3 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc),

② アストロサイトの検出のため polyclonal rabbit anti-GFAP 抗体 (Dako Cytomation),

③ aquaporin 4 (AQP4) の検出のために polyclonal rabbit anti-AQP4 抗体 (Santa Cruz Biotechnology),

④ マイクログリアの検出のために polyclonal antibody rabbit anti-Iba1 抗体 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を使用した。

同時に hematoxylin and eosin 染色 (HE 染色) も行った。

3) E32511 を感染させた後、2 時間後にアジスロマシンを 200 µg/g 経口投与し、アジスロマシンの効果を組織学的 (HE 染色) に調べた。

この研究は、九州大学動物実験規則第 12 条 4 項に基づき承認されている。

C. 研究結果

1) ISH

E32511 モデルでは、感染後 4 日に延髄網様体 (図 1A で囲まれた部分) の血管内皮細胞や神経細胞に、Gb3 合成酵素が発現していた (図 1 anti-sense, 矢印)。

LPS モデルでは、E32511 モデルと同様、延髄網様体 (図 2B で囲まれた部分) に血管内皮細胞や神経細胞の Gb3 合成酵素が発現していた。加えて脊髄

(図 2C で囲まれた部分) にも Gb3 合成酵素が発現していた。脊髄の部分においても、血管内皮細胞や神経細胞に、Gb3 合成酵素が発現していた (図 2C anti-sense, 矢印)。

2) 免疫染色

1. アポトーシス (caspase-3 の活性) E32511 モデルでは、感染後 5 日目に、脊髄前角細胞のアポトーシスを認めた (図 3A 矢印)。また延髄網様体にもアポトーシスを認めた (図 3B 矢印)。

HE 染色

E32511 モデルにおいてアジスロマイシンを投与されなかったマウスでは、脊髄の神経細胞が空砲を伴ってアポトーシス様に変化していた (図 4 H 矢印)。一方、アジスロマイシンを経口投与されたマウスは (図 4 I)、コントロール (図 4 G) と同じ正常であった。なお、図 4 は E32511 感染後 5 日目の結果である。

2. 延髄網様体で、アストロサイトを観察した結果、コントロールと LPS モデルでは、アストロサイトの突起は脳血管周囲を取り巻くように検出された (図 5, cont. LPS)。コントロールでは、活性化されていない星状のアストロサイトも認められた (図 5, cont.)。一方、E32511 マウスにおいてアストロサイトは、活性化しており、血管周面に拡大して広がっていた (図 5 E32511)。それに伴い、神経細胞も空砲を伴ってアポトーシス様に変化していた (図 5 E32511 矢印)。

3. 延髄網様体においてコントロール、LPS モデルでは、AQP4 が脳血管周囲に、明白に認められた (図 6, cont. LPS)。一方、E32511 モデルでは脳血管周囲に AQP4 が消失していた (図 6, E32511)。

4. 延髄網様体と脊髄でミクログリアの活性を観察した。ミクログリアは活性化すると周囲に突起を出して活性化する。この活性化したミクログリアを顕微鏡下で計測した結果、コントロールと E32511 モデルでは有意な差は認められなかった (図 7A)。一方、LPS モデルでは、ミクログリアは有意に活性化していた (図 7B)。

D. 考察

Gb3 を免疫染色することは難しいとされる。それは、Gb3 は糖脂質なので、脱パラファンの段階でアルコールによって溶出するからである。よって私達は ISH によって、マウスの Gb3 合成酵素の局在を明らかにした。Gb3 は LPS などの炎症反応で増加することも知られている。ISH と免疫染色から、ベロ毒素により延髄毛様体神経と脊髄全角運動神経が、アポトーシスを引き起こしたことが明らかとなった。延髄網様体が障害されると、循環障害や呼吸不全を来して死亡する場合がある。脊髄全角運動神経が障害されると四肢麻痺、呼吸筋麻痺を引き起こす。この研究で、以前に発表した E32511 のマウスモデルは、ベロ毒素によって BBB が破壊されるという現象論のみに止まっていたが、本研究では BBB の破壊のメカニズムを明らかにした。そのメカニズムとは、

(1) ベロ毒素レセプターである Gb3 は、脳血管内皮細胞に存在するので、ベロ毒素は脳血管内皮細胞を障害して、脳実質内に移行する。

(2) 脳実質内に移行したベロ毒素がアストロサイトを活性化させ、活性化したアストロサイトは、周囲の神経細胞や脳血管内皮細胞を障害する。

(3) アストロサイトの突起は脳血管

内皮細胞と AQP4 を介して連結しており、栄養を電解質、H₂O コントロールして脳血管内皮細胞を強力にサポートしている。今回の研究結果から、E32511 モデルにおいて脳血管周囲の AQP4 が消失しており、アストロサイトからのサポートが受けられなくなって脳血管内皮細胞が破綻、BBB の破壊につながったと考えられた。ミクログリアも炎症反応で活性化するが、E32511 モデルでは、ミクログリアの活性は認めなかった。

E. 結論

O157 経口感染モデルに生じた急性脳症のメカニズムを明らかにした。ベロ毒素の標的細胞は、延髄網様体神経細胞と脊髄全角運動神経細胞である。ベロ毒素による BBB の破壊には、アストロサイトの活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。また O157 感染モデルにアジスロマイシンを投与されたマウスは、脳に組織学的障害を認めなかった。

F. 健康危機情報

平成 23 年に起きた O111 による食中毒事件で溶血性尿毒症症候群を起こした 34 名の約 61.8%にあたる 21 人が脳症を起こしたことが、報告されている。本研究から、腸管出血性大腸菌感染症に併発する急性脳症発症のメカニズムが明らかになり、診断や治療法の開発に寄与するものと考えられた。またアジスロマイシンは腸管出血性大腸菌感染による脳症に有効であることが組織学的にも証明された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, Kobayashi H, Yoshida S, Obrigt T: Protection by recombinant Bacillus Calmette-Guérin vaccine expressing Shiga toxin 2B subunit against Shiga toxin producing *Escherichia coli* in mice. 2012. Clin. Vaccine Immunol. 19(12): 1932-1937.

2. Klinosky DJ, et al. (著者多数のため省略 Fujii J 333 番目): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. 2012. Autophagy 8(4):445-544.

2. 学会発表

1. 藤井 潤: 腸管出血性大腸菌感染症による急性脳症の発症機序・診断と治療法の展望、シンポジウム「腸管出血性大腸菌の現状—その病態と疫学—」、平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(北海道), 札幌, 2月, 2012. 講演要旨集 p121

2. Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Mechanism of encephalopathy caused by enterohemorrhagic *E. coli* O157 infection in mouse model. 日本細菌学雑誌、2012, Vol. 67. P36.

3. Fujii J, Mizoue T, Nakada Y, Ugajin S, Naya Y, Nakamura T, Saitoh K, Maruyama Y, Tada Y, Okabe N and Yoshida S: Risk factors for hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing

Escherichia coli infection in Japan. 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection. Amsterdam, The Netherlands, May, 2012. Abstract p213.

4. Amran MY, Fujii J, Yoshida S: Effectiveness azithromycin and/or Chinese medicine in the early and late stage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infected mouse models. 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection, Amsterdam, The Netherlands, May, 2012. Abstract p212.

5. Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Investigation of acute encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing enterohemorrhagic *E. coli* O157 in mice. U.S.-Japan cooperative medical science program, Chiba Japan, December, 2012. Abstract p34-38.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1. 特許取得
なし

1. 実用新案登録
なし

3. その他

図1

In situ hybridization of Gb3 synthase in mouse brain of E32511 model

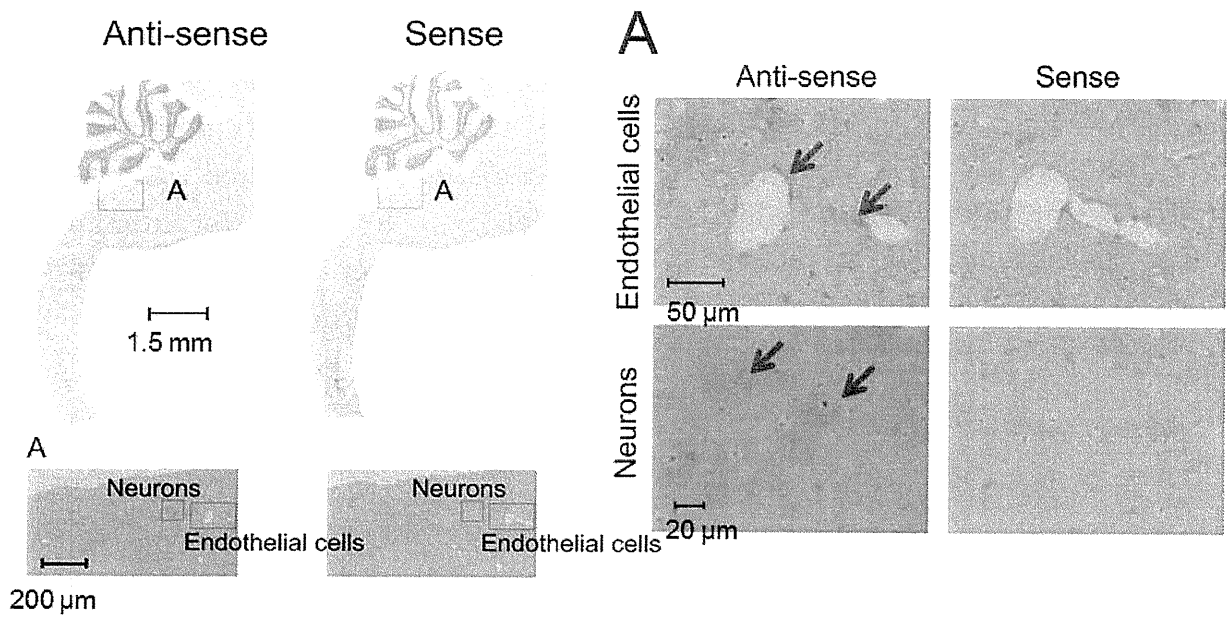
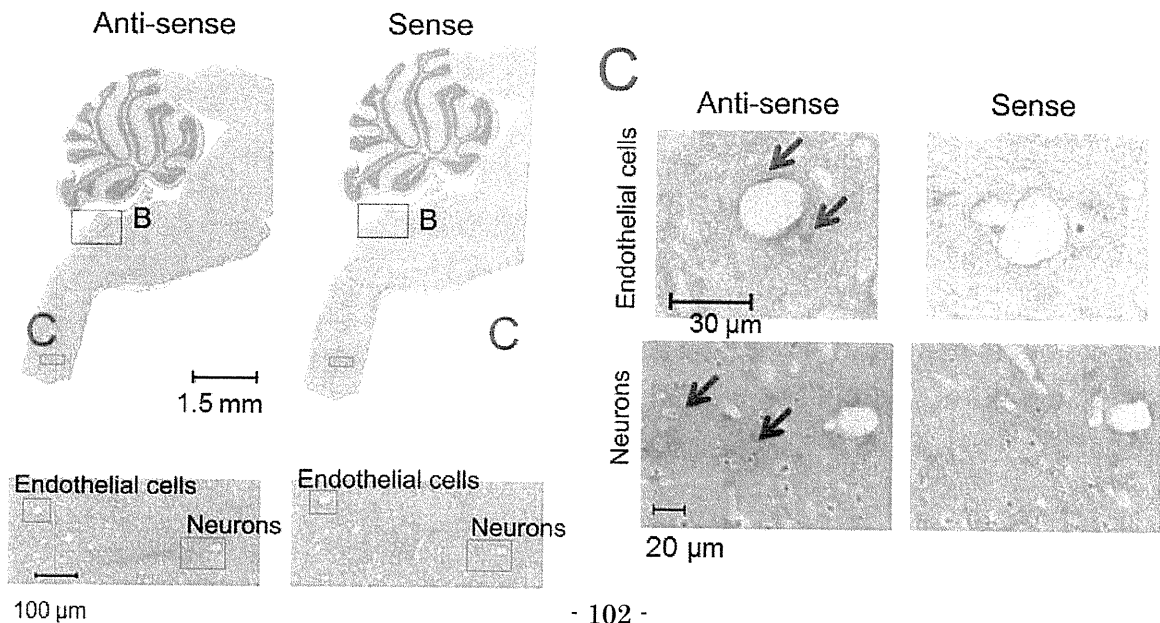


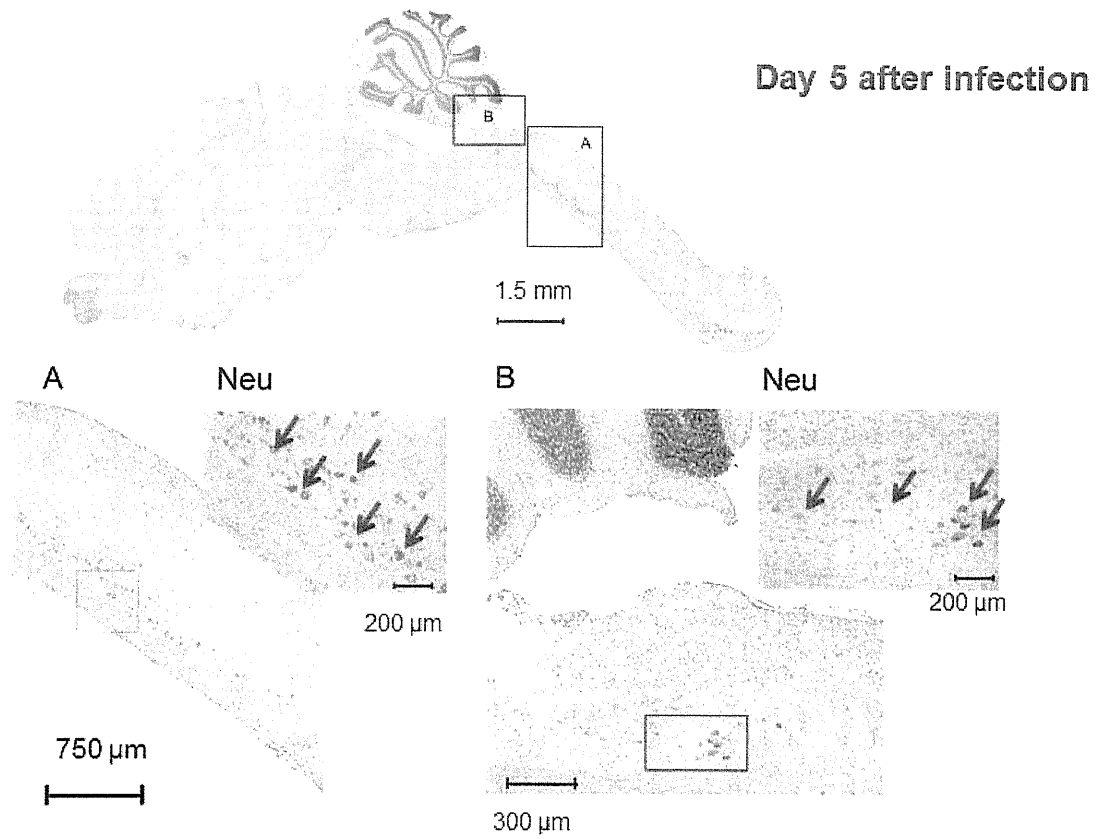
図2

In situ hybridization of Gb3 synthase in mouse brain of LPS-injected mouse



☒ 3

Caspase-3 activation in E32511 model mouse brain



☒ 4

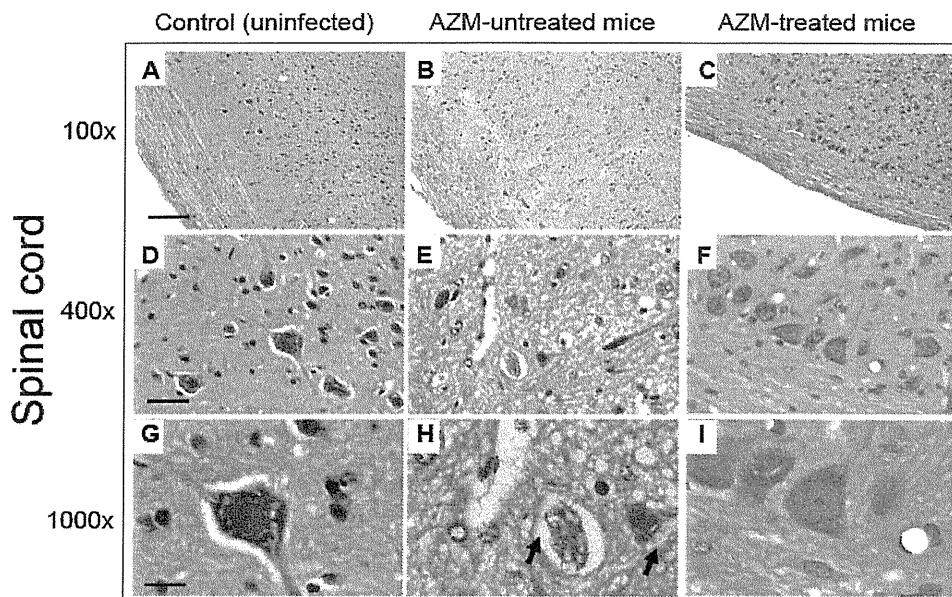


图 5

Astrocyte (GFAP) activation in the mouse models Reticular formation in medulla oblongata

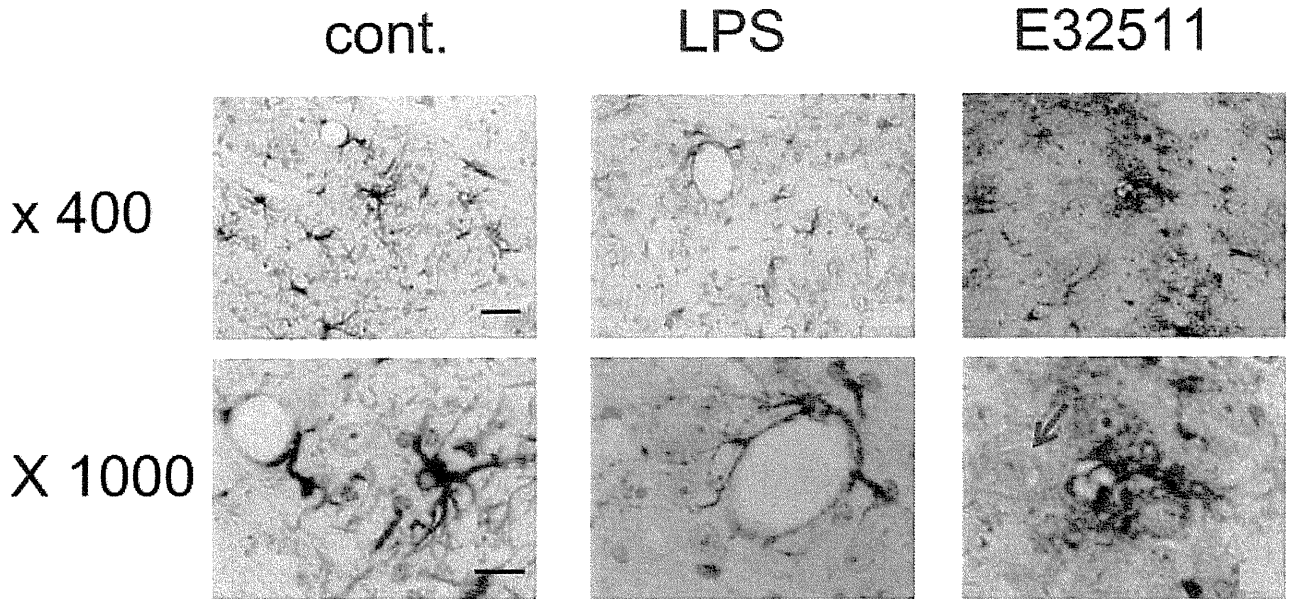
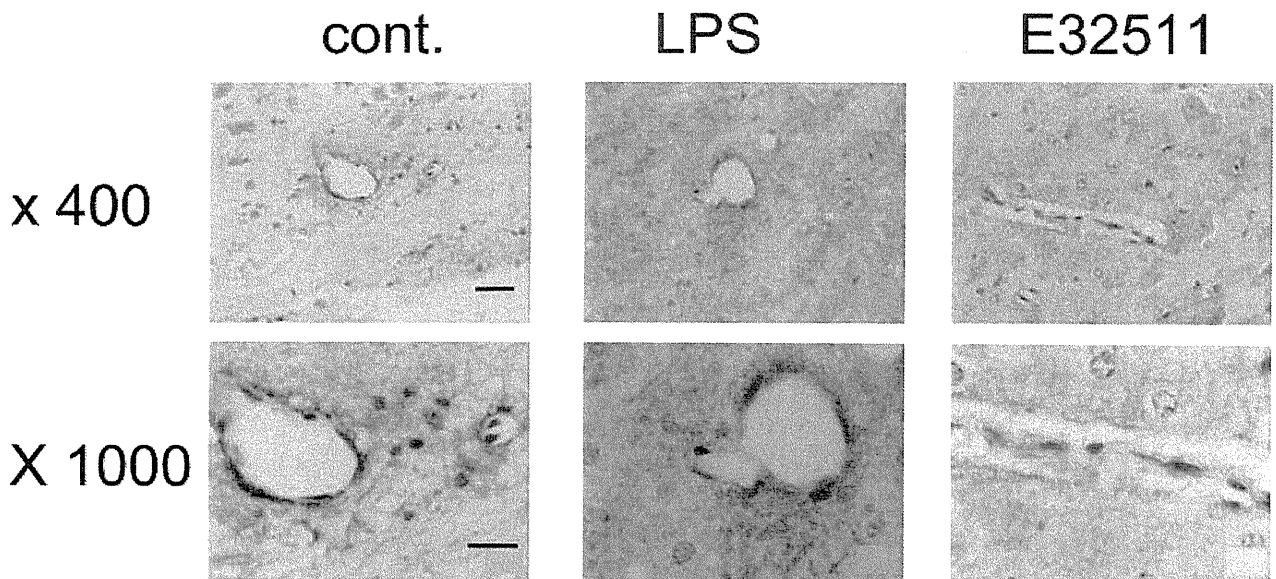
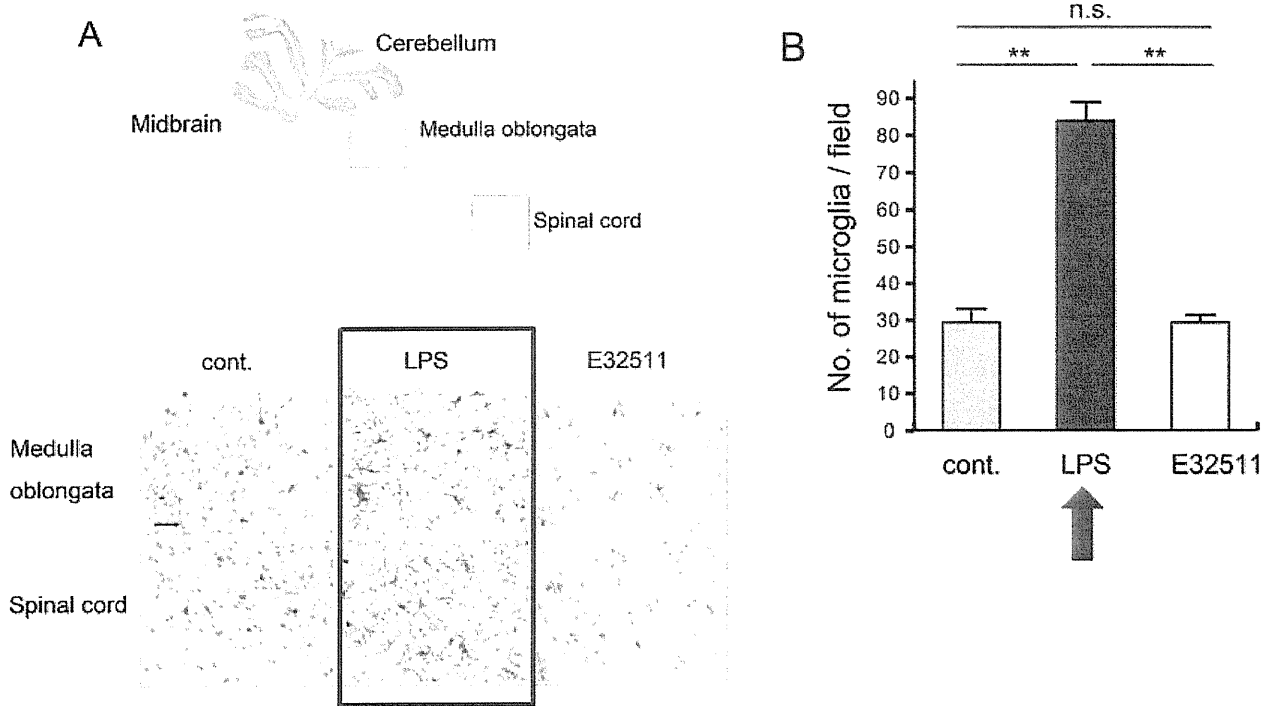


图 6

Aquaporin 4 expression in the mouse models Reticular formation in medulla oblongata



Microglial activation in LPS-injected model



研究發表一覽

A. 論文發表

- 1) Sandra, A., Afsah-Hejri, L., Tunung, R., Tuan Zainazor, T.C., Tang, J.Y.H., Ghazali, F.M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. Son, R. 2012. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat cooked rice in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(3): 829-836.
- 2) Loo, Y. Y., B. W. Chieng, M. Nishibuchi, and S. Radu. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *Int. J. Nanomedicine* 7:4263-4267.
- 3) Wong, W. C., Pui, C. F., Tunung, R., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in frozen burger patties in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(4): 1751-1756.
- 4) Puspanadan, S., Afsah-Hejri, L., Loo, Y.Y, Nillian, E., Kuan, C.H., Goh, S.G., Chang, .S., Lye, Y.L., John, Y.H.T., Rukayadi, Y., Yoshitsugu, N., Nishibuchi, M. and Son, R. 2012. Detection of *Klebsiella pneumoniae* in raw vegetables using Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR). *International Food Research Journal* 19(4): 1757-1762.
- 5) Patrick, G. B., Nishibuchi, M., Tunung, R. and Son, R. 2012. Molecular characterization of clinical isolate of *Vibrio cholerae* isolated from outbreaks cases in Malaysia. *International Food Research Journal* 19(3): 1267-1274.
- 6) Chang, W.S., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Khatib, A., Lye, Y. L., Loo, Y. Y., Mohd Shahril, N., Puspanadan, S., Kuan, C.H., Goh, S.G., John, Y.H.T., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2013. Prevalence and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in organic vegetables and chickens. *International Food Research Journal* 20:1023-1029.
- 7) Lye, Y. L., Afsah-Hejri, L., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Puspanadan, S., Kuan, C. H., Goh, S. G., Shahril, N., Rukayadi, Y., Khatib, A., John, Y.H.T., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Son, R. 2013. Risk of *Escherichia coli* O157:H7 transmission linked to the consumption of raw milk. *International Food Research Journal* 20:1001-1005.
- 8) Goh, S. G., C. H. Kuan, Y. Y. Loo, W. S. Chang, Y. L. Lye, P. Soopna, J. Y. Tang, Y.

- Nakaguch, M. Nishibuchi, L. Afsah-Hejri, and R. Son. 2012. *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia. *Poult. Sci.* 91(10):2686-2690.
- 9) Kurai, D., K. Nakagaki, H. Wada, T. Saraya, S. Kamiya, Y. Fujioka, K. Nakata, H. Takizawa, H. GotoH. *Mycoplasma pneumoniae* Extract Induces an IL-17-Associated Inflammatory Reaction in Murine Lung: Implication for Mycoplasmal Pneumonia. Inflammation. In press.
- 10) Osaki, T., T. Matsuki, T. Asahara, C. Zaman, T. Hanawa, H. Yonezawa, S. Kurata, T. D. Woo, K. Nomoto, S. Kamiya. Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog.* 53:12-8. 2012.
- 11) Inoue, S., M. Niikura, S. Takeo, S. Mineo, Y. Kawakami, A. Uchida, S. Kamiya, F. Kobayashi. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24:12129-34, 2012.
- 12) Hojo, F., D. Sato, J. Matsuo, M. Miyake, S. Nakamura, M. Kunichika, Y. Hayashi, M. Yoshida, K. Takahashi, H. Takemura, S. Kamiya, H. Yamaguchi. Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets to stockpile food. *Appl Environ Microbiol.* 78:5247-57, 2012.
- 13) Oka, K., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, M. Okazaki, T. Manzoku, M. Takahashi, M. Tanaka, H. Taguchi, T. Watanabe, T. Inamatsu, S. Kamiya. Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. *J Clin Microbiol.* 50:915-21, 2012.
- 14) Yonezawa, H., T. Osaki, T. Hanawa, S. Kurata, C. Zaman, T. D. Woo, M. Takahashi, S. Matsubara, H. Kawakami, K. Ochiai, S. Kamiya. Destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 61:582-9, 2012.
- 15) Okuda, M., S. Kamiya, M. Booka, S. Kikuchi, T. Osaki, T. Hiwatani, K. Maekawa, Y. Fukuda. Diagnostic accuracy of urine-based kits for detection of *Helicobacter pylori* antibody in children. *Pediatrics Internatl.* 2013, in press
- 16) Osaki, T., M. Okuda, J. Ueda, M. Konno, H. Yonezawa, F. Hojo, K. Yagyu, Y. Lin, Y. Fukuda, S. Kikuchi S. Kamiya. Multi locus sequence typing for the analysis of

intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by using fecal specimens. J Med Microbiol. 2013, in press

- 17) S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Nagita, A. Matsuhisa and S. Yamasaki. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. J. Vet. Med. Sci., 74:857-862, 2012.
- 18) 山崎伸二、朝倉昌博、四良丸 幸、井上春奈：カンピロバクターの簡便・迅速検査法、特集：食中毒の基礎と臨床、日本臨床、70(8): 1305-1312、2012.
- 19) Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J. Ogasawara, C. Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2013. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. Appl. Environ. Microbiol. (in press)
- 20) Wani, S. A., I. Hussain, M. A. Rather, Z. A. Kabli, K. Nagamani, Y. Nishikawa, S. D. Qureshi, and I. Khan. (2012) Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. Indian J. Microbiol. 52: 587–592.
- 21) Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H, 2011 RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system EMBO report vol.12(9) 911-916.
- 22) Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., Hughes, KT. 2012. YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol.* 83, 1268-84.
- 23) Nakano M. , Yamasaki E., Ichinose A., Shimohata T., Takahashi A., Akada K. J., Nakamura K., Moss J., Hirayama T., and Kurazono H. 2012. *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis. Model. Mech.*, 5(4): 515-521.
- 24) Yahiro, K., H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, J. Moss, and M. Noda. 2012. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells.

Infect Immun 80:1803-1814.

- 25) Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Suzuki, A. Suto, K. Ogura, S. Nagasawa, H. Ihara, T. Shimizu, H. Nakajima, J. Moss, and M. Noda. 2012. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF-kappaB activation. *Infect Immun* 80:3939-3951.
- 26) Arimitsu H, Sasaki K, Shimizu T, Tsukamoto K, Shimizu T, Tsuji T. 2012. Large-scale preparation of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* for toxoid vaccine antigen production. *Microbiol Immunol.* (in press).
- 27) Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Nakamura K, Tanaka Y, Nuemket N, Taniguchi K, Kozaki S, Tsuji T. 2012. P19 embryonal carcinoma cells exhibit high sensitivity to botulinum type C and D/C mosaic neurotoxins. *Microbiol Immunol.* 56(10):664-72.
- 28) Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, Kobayashi H, Yoshida S, Obrig T: Protection by recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine expressing Shiga toxin 2B subunit against Shiga toxin producing *Escherichia coli* in mice. 2012. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(12): 1932-1937.
- 29) Klinosky DJ, et al. (著者多数のため省略 Fujii J 333 番目): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. 2012. *Autophagy* 8(4):445-544.

B. 学会発表

- 1) 中口義次、Abdul Aziz Djamaal、Harry Fajri Zisoni、清水理香、勢戸和子、西渕光昭. 「発展途上国における魚介類媒介感染症：インドネシアでの腸炎ビブリオ食中毒の発生とその要因分析」 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会. (東京都新宿区 2012 年 9 月 11-12 日)、口頭発表
- 2) 中口義次、Abdul Aziz Djamaal、Harry Fajri Zisoni、清水理香、勢戸和子、西渕光昭. 「インドネシアにおける魚介類媒介食中毒とその発生要因の地域間での比較」 第 33 回日本食品微生物学会学術総会. (福岡県福岡市、2012 年 10 月 25-26 日)、口頭発表
- 3) 中口義次、西渕光昭 「タイにおける魚介類の生産流通消費と腸炎ビブリオ汚染のフィールド調査」. 第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム、大分県由布市、2012 年 11 月 15 日-16 日、口頭発表. 岩出義人、中口義次、西渕光昭、権平文夫 「tdh 保有腸炎ビブリオ検出における免疫磁気ビーズと LAMP の効果」 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉県千葉市、2013 年 3 月 18 日-20 日) ポスター発表
- 4) Oscar R. Escalante-Maldonado、Ahmad Yaman Kayali、中口義次、西渕光昭 「Dried LAMP is Highly Reliable in Detecting Virulent Strains of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood」 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉県千葉市、2013 年 3 月 18 日-20 日) ポスター発表
- 5) 中口義次、西渕光昭 「タイにおける魚介類の生産流通消費と腸炎ビブリオ汚染のフィールド調査」第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム、大分県由布市、2012 年 11 月 15 日-16 日、口頭発表
- 6) 林将大、名取達矢、水野卓也、宮田町子、大楠清文、江崎孝行 : DNA クロマトグラフィーを用いた食中毒病原細菌の迅速検出, 平成 24 年度東海乳酸菌研究会, 愛知, 2013 年 2 月
- 7) 名取達矢, 林将大, 水野卓也, 窪田佐代子, 大楠清文, 江崎孝行 : DNA クロマトグラフィーと遺伝子検査を組み合わせた *Campylobacter* の迅速検査法の構築, 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 横浜, 2013 年 2 月
- 8) 林将大, 名取達矢, 窪田佐代子, 水野卓也, 大楠清文, 江崎孝行 : 短時間培養と遺伝子検査を組み合わせた *Campylobacter* の迅速検査法の構築, 第 49 回日本細菌学会中部支部会, 金沢, 2012 年 11 月

- 9) 小西典子, 齊木大, 鈴木康規, 横山敬子, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美: 野菜を原因とした毒素原性大腸菌 O148 による大規模食中毒事例, 第 86 回日本感染症学会学術講演会, 2012, 長崎
- 10) Yamada, S., O. R. Escalante- Maldonado¹, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and W. Yamazaki. 2012. Development of a LAMP assay for detection of *trh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and an attempt for comprehensive detection of seafood-borne entero-pathogens. 47th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Chiba, Japan. pp158-pp162.
- 11) Escalante-Maldonado¹, O. R., A. Y. Kayali, W. Yamazaki, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2012. Dried form of a LAMP reagent is applicable to and highly reliable in detecting virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. 47th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Chiba, Japan (poster session).
- 12) Kikuchi S, Okuda M, Osaki T, Yagyu K, Lin Y, Kamiya S. Prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Japanese children. The 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN 2012) November 14-18, 2012, Taipei.
- 13) Okuda M, Kikuchi S, Ueda J, Osaki T, Yagyu K, Lin Y, Maekawa K, Yonezawa H, Kamiya S, Fukuda Y. Incidence of *Helicobacter pylori* infection in children during a one-year follow-up and the infection status in families in a rural area of Japan. European *Helicobacter* Study Group XXVth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 13-15, 2012, Slovenia.
- 14) 北条史、大崎敬子、米澤英雄、花輪智子、蔵田 訓、山口博之、神谷 茂. *Helicobacter pylori* の原生動物内における生存性の検討第 95 回日本細菌学会関東支部総会、平成 24 年 10 月 10-12 日、東京
- 15) 大崎敬子、 奥田真珠美、上田純子、米澤英雄、北条史、柳生聖子、林櫻松、福田能啓、菊地正悟、神谷 茂. 糞便材料を用いた MLST 法による *Helicobacter pylori* 感染源の家族内検索、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日-30 日、岡山
- 16) 北条史、大崎敬子、 米澤英雄、花輪智子、山口博之、神谷 茂. *Helicobacter pylori*

の原生動物内における生存性の検討、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日－30 日、岡山

- 17) 奥田真珠美、菊地正悟、大崎敬子、上田純子、米澤英雄、林櫻松、柳生聖子、北条史、神谷 茂、福田能啓. 小児の *H. pylori* 感染状況と追跡調査－篠山スタディ第 2 報、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日－30 日、岡山
- 18) 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、Zaman Cynthia、神谷 茂. *Helicobacter pylori* のバイオフィルム形成とクラリスロマイシン抵抗性、第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 24 年 6 月 29 日－30 日、岡山
- 19) 大崎敬子、奥田真珠美、蔵田 訓、神谷 茂. *Helicobacter pylori* 感染源の家族内検索のための MLST 法の応用 第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25－26 日、長崎
- 20) 蔵田 訓、大崎敬子、田口晴彦、神谷 茂. *Mycoplasma pneumoniae* 菌体抗原を用いた Th17 免疫応答についての解析、第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25－26 日、長崎
- 21) 杉崎健太郎、花輪智子、大崎敬子、蔵田 訓、神谷 茂. *Bordetella pertussis* の病原性発現における緊縮応答制御因子 ppGpp の役割、第 86 回日本感染症学会総会、平成 24 年 4 月 25－26 日、長崎
- 22) 大崎敬子、米澤英雄、Zaman Cynthia、北条史、花輪智子、蔵田訓、神谷茂. Interaction between *Helicobacter pylori* and Caco-2 cells in the co-culture system. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日.
- 23) 北条史、大崎敬子、花輪智子、蔵田 訓、山口博之、神谷 茂. Analysis of symbiotic conditions between *Helicobacter pylori* and protozoa. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27 日-29 日.
- 24) 蔵田訓、大崎敬子、花輪智子、米澤英雄、田口晴彦、神谷茂. Induction of a Th17 response by *Mycoplasma pneumoniae* antigens. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日.
- 25) 和田薫子、高橋志達、大崎敬子、花輪智子、蔵田訓、米澤英雄、岡健太郎、稲松考思、神谷茂. 本邦における NetB 毒素遺伝子産生性 *Clostridium perfringens* の検討. 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日.

- 26) 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, Zaman Cynthia, 神谷茂. *Helicobacter pylori* バイオフィルム形成が及ぼすクラリスロマイシンへの抵抗性、および耐性菌出現への影響の解析. 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 平成 24 年 3 月 27-29 日.
- 27) 山崎伸二, 亀井数正, Srinuan Somroop, 日根野谷淳, 名木田 章, 朝倉昌博, 中川晋作: PCR-RFLP によるカンピロバクター属 6 菌種の検出、同定、第 9 回日本小児消化管感染症研究会 2013 年 2 月 9 日、大阪
- 28) 朝倉昌博, 山崎伸二: カンピロバクターの迅速検査法とその応用、シンポジウム、第 5 回日本カンピロバクター研究会 2012 年 11 月 30 日-12 月 1 日、大阪
- 29) 柴田裕介, 野本竜平, 大澤朗 (2012.11.16) 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 46 回腸炎ビブリオシンポジウム、抄録集 p.26 (大分県日本文理大学湯布院研修所)
- 30) Yusuke Shibata, Ryohei Nomoto, Garry Cores de Vries, and Ro Osawa (2012.12.12-14) Genotypic and phenotypic characterization of non-Vibrio cholerae Strains carrying CtxAB genes isolated from Indonesian environmental waters、第 47 日米コレラ部会合同会議、予稿集、p.153-157 (千葉大学亥鼻キャンパス 120 周年記念講堂)
- 31) Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J.Ogasawara, C.Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2012. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 47th Conference, Chiba, Japan, Abstract:163-167. 2012/12/12-14
- 32) Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第 85 回日本細菌学会総会ワークショップ 細菌における遺伝子発現制御の普遍性と特異性 長崎ブリックホール: Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of Shigella type III secretion system. 2012 年 3 月 27 日
- 33) Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ. 2012 Dec.12-14

- 34) Yamamoto, T. 2012. For a successful application of Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI). 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.
- 35) Sato, Y., Takaya, A., Yamamoto, T. 2012. Bioinformatics-assisted identification of effectors based on feature analysis of secretion signal. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.
- 36) Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. The antibiotic mechanism of telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.
- 37) Shibata, T., Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. Mechanism of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.
- 38) Sato, Y., Takaya, A., Yamamoto, T. 2012. A study on the *Salmonella* secreted protein STM1670 identified by machine learning approach. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.
- 39) Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. Identification of *Salmonella* novel effectors by bioinformatic approach. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. Buyeo, Korea.
- 40) Sato Y., Takaya A., Houry, WA, Yamamoto, T. 2012. Theoretical and Biochemical study reveals a novel bipertite cooperative recognition mode of AAA+ protease ClpXP for the degradation of its substrate FlhD₄C₂. 第 35 回分子生物学会年会. 福岡.
- 41) Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. The SPI1-flagellar regulatory circuit of *Salmonella*: negative regulation by YdiV, a dual-function protein induced under nutrient starvation conditions. US-Japan Cooperative Medical Science Program: 47th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. Chiba
- 42) Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro, Takeshi Shimizu and Masatoshi Noda Inhibitory effect of subtilase cytotoxin on LPS-induced nitric oxide production by macrophages. THE 33rd NAITO CONFERENCE ON Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases.2012.6-26-29.
- 43) 八尋錦之助、津々木博康、小倉康平、野田公俊 腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の PERK を介したアポトーシス制御機構 第 59 回トキシシンポジウム 2012.8.30-31.

- 44) Masatoshi Noda. Shiga toxin and a novel toxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012.9.14.
- 45) 八尋錦之助、津々木博康、小倉康平、野田公俊. 腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素以外の毒素 第95回日本細菌学会関東支部総会 2012.10.10-12.
- 46) Hiroyasu Tsutsuki and Masatoshi Noda. Inhibitory effect of SubAB cytotoxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* on LPS-induced nitric oxide production by macrophages 2012 IEIIS in National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan. 2012,10-23-26.
- 47) Kinnosuke Yahiro, Hiroyasu Tsutsuki, Kohei Ogura, Sayaka Nagasawa, Takeshi Shimizu, Joel Moss, Masatoshi Noda. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells. 47th US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting.2012. 12.12-14.
- 48) Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro, Takeshi Shimizu, Masatoshi Noda. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation. 47th US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2012. 12.12-14.
- 49) 越智定幸、Martin Bundi、Sora Suka、有満秀幸、塚本健太郎、佐々木慶子、清水利康、一瀬休生、辻孝雄. ケニアのマンデラ東県で発生した下痢症アウトブレイクの原因菌の疫学調査. 第49回日本細菌学会中部支部総会（金沢）平成24年11月9日（金）、10日（土）
- 50) 藤井潤. 腸管出血性大腸菌感染症による急性脳症の発症機序・診断と治療法の展望、シンポジウム「腸管出血性大腸菌の現状—その病態と疫学—」、平成23年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会（北海道），札幌，2月，2012. 講演要旨集 p121
- 51) Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Mechanism of encephalopathy caused by enterohemorrhagic *E. coli* O157 infection in mouse model.日本細菌学雑誌、2012, Vol. 67. P36.
- 52) Fujii J, Mizoue T, Nakada Y, Ugajin S, Naya Y, Nakamura T, Saitoh K, Maruyama Y, Tada Y, Okabe N and Yoshida S : Risk factors for hemolytic uremic syndrome caused

by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Japan. 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection. Amsterdam, The Netherlands, May, 2012. Abstract p213.

53) Amran MY, Fujii J, Yoshida S: Effectiveness azithromycin and/or Chinese medicine in the early and late stage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-infected mouse models. 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infection, Amsterdam, The Netherlands, May, 2012. Abstract p212.

54) Fujii J, Amran MY, Yoshida S: Investigation of acute encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing enterohemorrhagic *E. coli* O157 in mice. U.S.-Japan cooperative medical science program, Chiba Japan, December, 2012. Abstract p34-38.

