

表 1

・ 外来治療を経ずに入院した *Mycoplasma pneumoniae* 感染症患者の初期治療抗菌薬別概要

	全症例	初期治療抗菌薬別 *β-ラクタムとの併用療法含む				
		β-ラクタム	マクロ ライド*	クリンダ マイシン*	フルオロ キノロン*	ミノ サイクリン*
N	176	16	96	31	6	27
年齢						
平均値(中央値)	7.2(6)	6.6(4)	6.2(4)	5.1(5)	18.3(7)	10.8(11)
範囲	0-79	0-14	0-43	1-13	2-79	5-24
初期治療抗菌薬からの変更(%)	62(35.2)	12(75.0)	39(40.6)	8(25.8)	1(16.7)	2(7.4)
発症から入院までの日数(日)	3.7	4.1	3.5	4.4	4.0	3.9
罹病期間(日)						
平均値(中央値)	11.5(11)	12.6(11.5)	11.5(11)	12.0(12)	11.3(11.5)	10.2(10)
範囲	4-23	6-23	4-22	5-20	6-17	7-16
有熱期間(日)						
平均値(中央値)	6.4(6)	6.7(7)	6.1(6)	7.5(7)	5.8(7)	5.7(5)
範囲	1-17	2-12	1-17	1-14	1-8	3-9


Infectious Agents Surveillance Report

表 2

表. わが国における NDM 型、KPC 型および OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者

(2013 年 7 月現在)

		菌種	渡航先
NDM 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無し
2	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無し
3	2011 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
4	2013 年解析依頼例	<i>Escherichia coli</i>	バングラデシュ
上記以外の学会・論文による報告例			
5	2011 年報告例 ¹⁾	<i>Escherichia coli</i>	インド
6	2012 年報告例 ²⁾	<i>Acinetobacter baumannii</i>	インド
7*	2013 年報告例 ³⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(アジア)
KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(渡航先不明)
2	2011 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	北米
3	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	中国
4	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
5	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
上記以外の学会・論文による報告例			
6	2009 年報告例 ⁴⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	米国
7	2012 年報告例 ⁵⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ブラジル
OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
上記以外の学会・論文による報告例			
2	2012 年報告例 ⁶⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	あり(東南アジア)
3*	2013 年報告例 ³⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(アジア)

* 同一症例より分離された同一菌株(本号 19 ページ参照)

1) Chihara S, *et al.*, Clin Infect Dis 52: 153-154, 20112) Nakazawa Y, *et al.*, J Infect Chemother 19: 330-332, 2013

3) 外山雅美, 他, IASR 34: 237-238, 2013

4) 諸熊由子, 他, 日臨微生物誌 19(4):136, 2009

5) 高橋里枝子, 他, 日臨微生物誌 22(4):158, 2012

6) 柴山恵吾, 他, IASR 33: 336-337, 2012

IASR

2013 年 8 月以降 12 月まで国立感染症研究所で解析依頼を受けた症例

NDM-1

E. coli 中国渡航歴あり

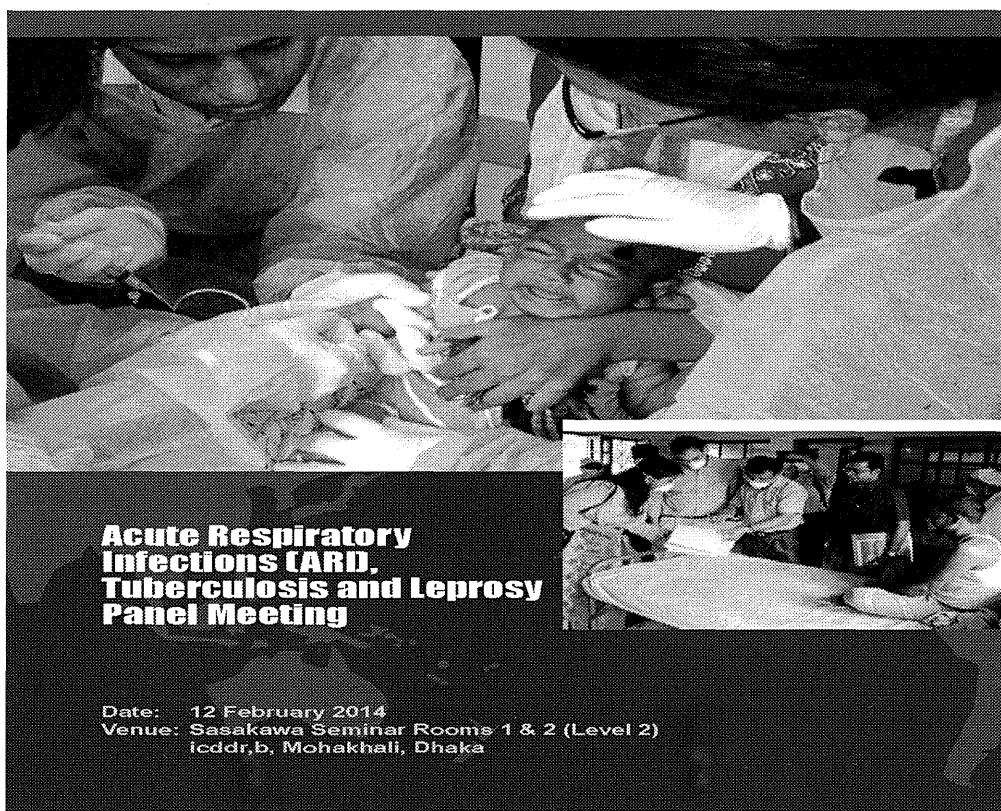
E. coli インドネシア渡航歴あり

K. pneumoniae インドネシア渡航歴あり

E. coli インド渡航歴あり

OXA-48

K. pneumoniae 海外渡航歴なし



Acute Respiratory Infections (ARI), Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting

Date: 12 February 2014
 Venue: Sasakawa Seminar Rooms 1 & 2 (Level 2)
 icddr,b, Mohakhali, Dhaka

ARI Panel Members

1. Dr. Robert F. Breiman
2. Dr. Rachelle Salomon
3. Dr. Keith P Klugman
4. Dr. Shams El Arifeen
5. *Dr. Samir Saha*
6. Dr. Katharine Sturm-Ramirez
7. Dr. W. Abdullah Brooks
8. Dr. Keigo Shibayama
9. Dr. Naruhiko Ishiwada
10. Dr. Muneki Hotomi
11. Dr. Masanobu Hiraoka
12. Dr. Tsuyoshi Kenri
13. Dr. Tsutomu Yamazaki
14. Dr. Yugo Shobugawa
15. Dr. Sachiko Takahashi
16. Dr. Kazuma Yamauchi

TB & Leprosy Panel Members

1. Dr. Steven Reed
2. Dr. Linda Adams
3. Dr. Sayera Banu
4. Dr. Patrick Brennan
5. Dr. Anil Koul
6. Dr. Timothy C. Rodwell
7. Dr. John S. Spencer
8. Dr. Zeaur Rahim
9. Dr. Yasuhiko Suzuki
10. Dr. Toshiki Tamura
11. Dr. Sohkiichi Matsumoto
12. Dr. Ikuo Kawamura

Acute Respiratory Infections (ARI), Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting

Date: 12 February 2014

Venue: Sasakawa Seminar Rooms 1 & 2 (Level 2)
icddr,b, Mohakhali, Dhaka

1. Joint Panel Meeting: Acute Respiratory Infections Panel and Tuberculosis and Leprosy Panel

ICVB Conference Room (Level 4)

Moderators for Session I: **Keigo Shibayama and Robert F. Breiman**

- 8:30-8:40 Welcome and Opening Remarks: Acute Respiratory Infections Panel
Rachelle Salomon, NIAID National Institutes of Health (USA)
Keigo Shibayama, National Institute of Infectious Diseases (Japan)
Robert F. Breiman, Emory Global Health Institute (USA)
- 8:40-9:00 Serotype Distribution and Drug Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children with Community Acquired Pneumonia in Japan
Sachiko Takahashi, Chiba University (Japan)
- 9:00-9:20 Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* XDR strains isolated from hospitalized tuberculosis patients of Bangladesh
Zeaur Rahim, icddr, b (Bangladesh)
- 9:20-9:40 Population analysis of nasopharyngeal microbiota
Masanobu Hiraoka, Wakayama Medical University (Japan)
- 9:40-10:00 Influenza surveillance and disease burden in Bangladesh
Katharine Sturm-Ramirez, Centers for Disease Control (USA)
- 10:00-10:20 Drug Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* (draft title)
Kazuma Yamauchi, Wakayama Medical University (Japan)
- 10:20-10:30 Session I: Discussion
- 10:30-11:00 Tea Break (Level 7)

Moderators for Session II: **Sayera Banu and Muneki Hotomi**

- 11:00-11:20 Development of RT-PCR Assays to Determine *Mycobacterium leprae* Viability in Tissues and Application to Drug Screening Assessments
Linda Adams, National Hansen's Disease Programs (USA)
- 11:20-11:40 Oxidative Phosphorylation - Multi-Target Drug Discovery in Tuberculosis
Patrick Brennan, Colorado State University (USA)

- 11:40-12:00 Production of recombinant P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae* and its application
Tsuyoshi Kenri, National Institute of Infectious Diseases (Japan)
- 12:00-12:20 The role of Bedaquiline, a novel MDR-TB drug, in mycobacterial energy metabolism
Anil Koul, Johnson and Johnson (Belgium)
- 12:20-12:30 Session II: Discussion
- 12:30-13:30 Lunch Break (Level 7)
- Moderators for Session III: **Keith Klugman and Patrick Brennan**
- 13:40-14:00 Current topics on *Mycoplasma pneumoniae* infections among Japanese children
Tsutomu Yamazaki, Wakaba Kid's Clinic (Japan)
- 14:00-14:20 Overcoming Barriers to TB Treatment Adherence Monitoring Via Mobile Phone Video Directly Observed Therapy in High and Low Resource Countries
Timothy C. Rodwell, University of California San Diego (USA)
- 14:20-14:40 Climate changes affected timing of respiratory syncytial virus outbreaks in Japan
Yugo Shobugawa, Niigata University (Japan)
- 14:40-15:00 Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyper-endemic city of the Brazilian Amazon Region
John S. Spencer, Colorado State University (USA)
- 15:00-15:20 Session III: Discussion
- 15:20-16:00 Tea Break (Level 7)
- Moderators for Session IV: **Steven G. Reed and Yasuhiko Suzuki**
- 16:00-16:20 Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes
Toshiki Tamura, National Institute of Infectious Diseases (Japan)
- 16:20-16:40 Blockade of PD-1 pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- γ production by antigen-specific CD4+ T cells
Ikuo Kawamura, Kyoto University (Japan)
- 16:40-17:00 Modulation of protection against *Mycobacterium tuberculosis* by different adjuvanted vaccines
Steven G. Reed, Infectious Disease Research Institute (USA)
- 17:00-17:20 Session IV: Discussion
- 17:20-17:30 Closing Remarks: Tuberculosis and Leprosy Panel
Steven G. Reed, Infectious Disease Research Institute (USA)
Yasuhiko Suzuki, Hokkaido University Japan

**Serotype Distribution and Drug Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Isolated
from Children with Community Acquired Pneumonia in Japan.**

Sachiko Takahashi¹, Naruhiko Ishiwada², Haruka Hishiki¹, Bin Chang³

¹Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

²Division of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital

³Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases

Introduction

To reveal the impact of the heptavalent pneumococcal vaccine (PCV7) and newly approved oral antibiotic for children on serotype and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* (Sp) isolated from blood and sputum samples of children admitted in hospitals with community acquired pneumonia (CAP) in Japan.

Methods

PCV7 and Tosufloxacin (TFLX) were newly approved for children in Japan in August 2008 and February 2010, respectively. The study periods were between April 2008 to March 2009 and April 2012 to March 2013. Children living in Chiba city aged <16 years admitted with CAP in 5 major tertiary hospitals were enrolled in this study. Patients with positive blood culture or cultured sputum dominant for microorganisms were diagnosed with bacterial pneumonia. Antimicrobial susceptibility was tested according to CLSI guideline M100-S23. Serotypes and sequence-types were determined with Quellung reaction.

Results

In this study, 486 and 495 patients <16 years old were enrolled between April 2008 to March 2009 and April 2012 to March 2013, respectively. There were significant reduction of the proportion of Sp pneumonia patients (16.4% in 2008 versus 8.3% in 2012, $p < 0.001$) and the PCV7 covered serotypes (62.5% in 2008 versus 18.4% in 2012, $p < 0.001$). Although MIC 50 ($\mu\text{g/ml}$) of penicillin declined from 0.5 to 0.25, the MIC 50 ($\mu\text{g/ml}$) of TFLX increased from ≤ 0.12 to 0.25 from 2008 to 2012, respectively.

Conclusions

The prevalence of pneumococcal pneumonia showed a significant reduction post 2 years of PCV7 vaccination. Serotype distribution of isolated Sp from children with pneumonia changed dramatically, which lead to decrease in penicillin resistance. Considering the worsening of TFLX resistance, we should be careful for the use of broad-spectrum antimicrobial agents for children in outpatients' clinics.

Population shift of Infants' nasopharyngeal and middle ear microbiota after antibiotic therapy.

author: Masanobu HIRAOKA

Otorhinolaryngology, Wakayama medical university

The upper respiratory tract infections such acute otitis media (AOM) are popular among children worldwide. The most common pathogens like *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* are normal and transient residents of the nasopharyngeal niche, where they are embedded in a complex microbiota of generally presumed harmless commensals.

Nasopharyngeal bacterial colonization evolves rapidly during the first year of life.

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* colonize the nasopharynx early in life and are responsible for the vast majority of acute otitis media (AOM). Our previous study revealed the dramatic changes in the nasopharyngeal pneumococcal density during the course of upper respiratory infections. And we presume that not small amount of bacteria live in the even healthy middle ear, and that middle ear microbiota should change its composition when children suffer AOM.

In the nasopharynx and middle ear, coexisting with causative pathogens and commensal form bacterial flora, recently nominated as microbiota. Members and their ratio of both microbiota will be dramatically shifted during the course of antimicrobial treatments, and acute phase of upper respiratory inflammation. Despite an abundance of data on incidence, prevalence and density of potential pathogens in NP microbiota of children and adults, the detailed composition of the NP microbial community, both during health and disease have not been studied. We, therefore, will discuss microbiota in the nasopharynx and middle ear for better understanding the change of bacterial flora during various infectious situations.

Production of recombinant P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae* and its applications

Tsuyoshi Kenri

Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

P1 is a major adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae* that is essential for attachment and colonization of this bacterium to the host respiratory epithelium. P1 is also used as a target for diagnostic detection of *M. pneumoniae*. It is expected that detailed structural analysis of this protein will provide a better understanding of infection process of this bacterium and improved diagnostic techniques. However, these attempts have been hampered by difficulty of obtaining enough amount of this protein. In this study, we produced a full length of recombinant P1 protein for the first time using synthetic gene in *E. coli*. The produced recombinant P1 protein has similar features compared to that of native protein in *M. pneumoniae*.

Current Topics in *Mycoplasma pneumoniae* Infections among Japanese Children

Tsutomu Yamazaki

Wakaba Children's Clinic¹; Department of Pediatrics, Saitama Medical University²

Infectious disease surveillance data of Japan indicates that *Mycoplasma pneumoniae* infections were epidemic during 2011 and 2012. Although the factors contributing to this epidemic remain unclear, one possible explanation may involve the high prevalence of macrolide resistance among strains of *M. pneumoniae*. Macrolide-resistant *M. pneumoniae* emerged in 2000 in Japan, and the subsequent rate of detection of these strains has increased rapidly. Macrolide-resistant rates have been reported to exceed 50% during recent years in Japan.

Guidelines for the Management of Respiratory Infectious Diseases in Children in Japan were originally published in 2004, and have since been revised twice by the Japanese Society of Pediatric Pulmonology and the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. A supplemental revision on diagnosis and treatment of pediatric *M. pneumoniae* pneumonia was issued in 2013. In this most recent version, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method is recommended as a direct detection method for *M. pneumoniae* infections. Respiratory specimens, such as throat or nasopharyngeal swabs, and sputum are applicable for pneumonia patients. Overall agreement rates of the LAMP method for culture and for the PCR method have been reported to be 95.6% (195 / 204) and 97.1% (198 / 204), respectively.

In addition to the LAMP method, two rapid antigen tests for detecting *M. pneumoniae* using immunochromatography were released and approved by Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan in 2013. One test detects the P1 protein of *M. pneumoniae*, and the other detects the *M. pneumoniae* ribosomal protein L7/L12. Sensitivity and specificity of the latter method (compared to the PCR technique) are 80% and 91%, respectively.

In the pediatric guidelines, macrolide antibiotics are recommended as a first choice for treatment of *M. pneumoniae* pneumonia in children. However, considering the high prevalence of macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains, use of tosufloxacin or tetracyclines are indicated if macrolide therapy is not effective. Tosufloxacin is the only fluoroquinolone that is approved for use in children in Japan. Usage of tetracycline is restricted for children under 8 years of age. These regimens of antimicrobials for treatment of *M. pneumoniae* pneumonia should be evaluated further.

Climate Changes Affected Timing of Respiratory Syncytial Virus Outbreaks in Japan

Yugo Shobugawa
Niigata University

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) outbreaks occur every winter season in temperate countries like Japan. Meteorological factors such as temperature and relative humidity play major roles for HRSV seasonality. In recent years, even in summer season, HRSV outbreaks occurred sporadically and timing of the start of outbreak shifted earlier in Japan. Weekly HRSV surveillance data (from 2007-2013) at each prefectural level, which is published by the Infectious Disease Surveillance Center (IDSC) in the National Institute of Infectious Diseases (Tokyo) and daily meteorological data, which is published by the Japan Meteorological Agency, were used for the analyses. We examined the association between HRSV cases and each measured climate factor on weekly basis. HRSV outbreaks occurred during lower temperature and higher relative humidity; however, even during summer season with higher temperature and higher humidity, HRSV outbreaks also occurred. Our results showed an association between climate factors and HRSV cases in Japan, and that climate change might affect the shift on timing of HRSV outbreak.

Japan Nosocomial Infections Surveillance: the National Surveillance of Antimicrobial Resistance

Keigo Shibayama
National Institute of Infectious Diseases

Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) is a national surveillance program organized by the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) of Japan designed to provide basic information on the incidence and prevalence of nosocomial infections and antimicrobial-resistant bacteria in Japanese medical settings. More than 1,000 hospitals are members, enabling us to obtain representative nation-level epidemiological data. In this presentation we introduce antimicrobial resistance of several bacterial species in Japan. Among *Staphylococcus aureus*, vancomycin and linezolid exhibited complete coverage and methicillin resistance rate was 53%. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* was 0.4%. Among *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance was 15.3%, erythromycin resistance 86.6%, and levofloxacin resistance 3.1%. Imipenem resistance rate was 0.1% for *Escherichia coli*, 0.2% for *Klebsiella pneumoniae*, and 2.0% for *Acinetobacter* spp. While macrolide resistance rates are generally high, carbapenem resistance rates are low in Japan, probably reflecting antimicrobial usage and situation of clinical settings.

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

腸管感染症の研究・米側との専門協議に関する研究

研究分担者 西渕光昭 京都大学東南アジア研究所教授

研究要旨：

腸管感染症関係では、腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素と新しい毒素 (SubAB) の構造と機能、コレラ菌、ピロリ菌、多種の腸内細菌に関する、アジアでの環境水や患者内の変動、検査法（血清型別、全ゲノム解析、簡便・迅速遺伝子検査）に関する研究が実施された。特に、魚介類からの病原性腸炎ビブリオの定量検出法は高感度で、かつ途上国でも実施可能な簡便法で、FAO が主催した validation で高い評価を受け、世界標準法の最有力候補になっている。日本－米国－アジアの協力体制の重要性を示唆する意見や状況変化が徐々に認められるようになった。

研究協力者：

江崎 孝行：岐阜大学大学院医学系研究科教授

飯田 哲也：大阪大学微生物病研究所特任教授

山崎 渉：宮崎大学農学部獣医学科准教授

山崎 伸二：大阪府立大学大学院薬学研究科教授

野田 公俊：千葉大学大学院医学研究院教授

倉園 久生：帯広畜産大学畜産衛生学研究部門教授

大澤 朗：神戸大学大学院農学研究科教授

三好伸一：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

西川 禎一：大阪市立大学大学院生活科学研究科教授

神谷 茂：杏林大学医学部感染症学教授

藤井 潤：九州大学大学院医学研究院准教授

辻 孝雄：藤田保健衛生大学医学部教授

A. 研究目的：

本事業においては、過去4年間、佐藤-ジョンソン-スピリッツを尊重しつつ、可能な限り評価委員のご指導に沿うように研究軌道を補正してきた。研究分担者はコレラ・細菌性腸管感染症のエキスパートを中心に構成されていた20名弱のチームから、過去3年

間で、比較的アジアの状況に詳しい 14 名に絞り込み、さらに最終的に 12 名に落ち着いた。「グローバル化、多様化、ボーダーレス化、変容（東・西アジアの台頭）」に対応した「多角的研究、フロンタイン/フロンティア研究」をキーワードとして、アジアにおける臨地研究と国際共同研究に漸次ウェイトをシフトしてきたが、これらを支えるために必要な優れた基礎研究も怠らないよう、総合的に研究を展開してきた。平成 24 年度は、実用的項目を柱として「日－アジアネットワーク形成」を目標にアジアの研究者との連携を強化するような組織づくりを目指した。本年度は、甲斐明美と山本友子研究協力者と入れ違いに、インドで活動されている岡山大グループの代表者として三好伸一氏（H24 事前評価に対応）およびバンコクに拠点を持っている阪大微研から飯田哲也博士に新たに研究協力者になっていた。山崎伸二氏が、研究拠点をタイから、ベトナムに変更した。

感染症菌の病原性機構等に関して、良い成果を上げてきたという評価であったので、H25 年度もこれらのテーマについて、研究を継続・展開し、日米合同会議で成果を発表し、3 者間の共同研究のありかたについて日米とアジアの代表で協議を継続し、研究を実施することを目標にした。

B. 研究方法：

米国側はアジアで大規模なワクチン開発プロジェクトを推進し、日本側は、草の根的な共同研究方式（研究者間あるいは小規模な機関レベル）で、アジア諸地域での食品や自然環境の病原菌汚染、細菌性腸管感染症の疫学、細菌学的・遺伝学的検査法、特定の腸管感染症菌の病原性メカニズム等の解明に関する研究を展開した。すなわち、①生態学・疫学、②病原性解明、③検査法に関する研究を中心として日本とアジアの研究者との連携を強化した点が H24 年度と異なるが、それら以外の研究者は、H24 年度の分担研究テーマを継続・発展させる。隣地研究実施国は、東南・南西・東アジアをカバーできており、我が国の感染症患者の減少、安全安心な食品の生産・流通、旅行者の安全確保に資する効果、米国・アジアへの貢献（成果を H25 年度の日米合同会議参加者と共有した）、および世界規模での貢献（衛生規範策定リスク解析のためのデータの蓄積など）を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究を実施するために使用する研究施設・資料等の確保、国際共同研究の相手方との合意、各種規定等の遵守には問題がない。

C. 研究結果：

- ① 生態学・疫学：発途上国においては、特に貧困層を中心に下痢症が蔓延している。中でも、環境水や食品汚染がヒトへの感染源となっている。

本研究では、ベトナム国立公衆衛生医療院と連携しベトナムにおいて食品から分離した大腸菌の病原因子及び薬剤感受性、特に ESBL 産生性について調査した。ベトナムで様々な食品から大腸菌を分離し、下痢原性大腸菌の様々な病原因子 (*eaeA*、EAF、*bfpA*、*lt*、*st*、*stx1*、*stx2*、*Eagg*、*astA*、*invE*、*daaD*) の DNA プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法にて各種病原遺伝子の分布を検出した。さらに、薬剤感受性について分離した食品由来の 387 株についてディスク法にて調べた。調べた様々な食費から、最終的に豚肉から 87 株、鶏肉から 57 株、牛肉から 32 株、魚介類から 42 株、生野菜から 9 株、加工食品から 162 株分離した。上記病原遺伝子を調べたところ、*eaeA* 遺伝子が豚肉由来 1 株で陽性、EAF 陽性が加工食品由来 2 株で陽性、*astA* は豚肉由来 22 株、鶏肉由来 21 株、牛肉由来 10 株、魚介類由来 11 株、生野菜由来 1 株、加工食品由来の 21 株計 86 株で陽性となった (山崎伸二)。

インド (コルカタ市) において、生活に利用されている池 (2 カ所) から水試料を採取した。そして、VBNC コレラ菌の分離も可能な選択培地 (0.1% ピルビン酸と 0.1% 可溶性デンプンを添加した TCBS 寒天培地) に塗抹し、ビブリオ・コレレを釣菌した。次にコレラ毒素遺伝子を標的とする PCR を行い、コレラ菌を選抜した。その結果、ビブリオ・コレレは全ての試料から検出されたが、コレラ菌は 1 つの試料のみから検出された。したがって、イン

ドの環境水はコレラ菌で汚染されているが、汚染しているコレラ菌の密度は、VBNC を含めても、あまり高くないと考えられる。また、水試料中のビブリオ・コレレの密度は、水温や水質汚濁の指標値とは相関していなかった (三好)。

コレラ患者の発病・治癒過程における腸内細菌叢の変動について次世代 DNA シーケンサーを用いた解析をバングラデシュ ICDDR,B の研究者との共同研究として行った (飯田)。

2013 年 3 月から 8 月まで、インド政府によって Sher-e-Kashmir 農工大学から派遣された准教授の Bhat Mohd Altaf 氏を受け入れ、当研究室が開発した「疎水性格子膜を用いたコロニーハイブリダイゼーション法による下痢原性大腸菌の分離」を研修した。共同して 家畜の下痢原性大腸菌保菌状況を調査しているが、腸管毒素原性大腸菌の陽性率は、非定型腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌に比べて低いために未だ疫学解析に耐えうる十分な数の菌株を収集できていない。さらに菌株の分離に勤め、家畜がヒトの腸管毒素原性大腸菌の汚染源となっているか明らかにするためのベースとする (西川)。

コレラ菌を含む細菌は一般に、凍結ストレスに弱いとされているにも関わらず、近年、インドネシアの冷凍エビなどの食品に同伴する氷からコレラ菌が分離されたという報告がなされている。また、*V. vulnificus* は貧栄養環境におかれることで、エタノールや

熱などの様々なストレスに耐性化することが報告されているが、食品に同伴する氷中のコレラ菌も凍結される前には貧栄養環境にさらされていることが十分想定される。そこで、貧栄養環境におかれることでコレラ菌は凍結ストレスに耐性化しているのではないかと考え、実験を行ったところ、供試した6株のコレラ菌において、その仮説を実証することに成功した。(大澤)。

② 病原性解明:Non-O157型の腸管出血性大腸菌が産生するSubABについて、この毒素はERストレスセンサー蛋白質の一つであるPERKの活性化を促し、ユビキチン・プロテアソーム依存性の細胞致死(アポトーシス)をおこすことを明らかにした。本研究によって、SubABの細胞致死機構等を基礎レベルで解明することができる(野田)。今後アジアでも重視されると予想される*Helicobacter pylori*感染について、感染に影響を与える口腔内細菌の検出を開始した。今後、検出された*H. pylori*の胃内定着のメカニズムを解明することで、新たな感染防御法の確立を目指す(神谷)。

腸管出血性大腸菌(EHEC)による脳症の治療に再生医療が可能か調べた。ICRマウスに、EHEC O157を経口感染させ、同時にマイトマイシンを腹腔内投与すると、マウスは急性脳症を発症して死亡する。ヒトの骨髄間葉系幹細胞から得られた Multilineage-differentiating stress ending (Muse) 細胞

と non-Muse 細胞を尾静脈から、上記の急性脳症発症マウスに移植した。ヒトの細胞を移植できるように NOD-SCID マウスを使用した。感染から4日後に脳を取り出して免疫染色を行った。Muse 細胞を移植されたマウスの脳を調べた結果、橋や延髄に Muse 細胞は生着しており、non-Muse 細胞は脳のどの部分にも生着を認めなかった。Muse 細胞や non-Muse 細胞を移植された脳のアポトーシス細胞を数えた結果、non-Muse 細胞を移植されたマウスの脳に比べ、Muse 細胞を移植された脳では、アポトーシス細胞の数は有意に減少していた。また Muse 細胞を移植されたマウスの脳では、non-Muse 細胞を移植された脳に比べ、アストロサイトの活性が抑制され、aquaporin 4 が維持されていた。このことはベロ毒素による血液脳関門の破壊が、Muse 細胞によって抑制されたことを意味する。EHEC 感染による脳症は、死因にもなりうる場合があり、その治療法は今も確立していない。また、きびしい脳症から回復しても、てんかんや精神遅滞などの後遺症を残す場合も少なくない。本研究は、EHEC 感染に伴う脳症の画期的治療法でもあり、脳症の後遺症に対しても再生医療として効果が期待できる(藤井)。

志賀毒素バリエーション Stx2e (ブタの浮腫病由来) に特化した糖鎖の結合性に依らないアフィニティ精製法を確立したが、その結合に関与するアミノ酸の変異を導入することにより、ヒトの溶血性尿毒症症候群の原因になる

Stx2 の精製にも応用できることが明らかとなったため、トキシイドワクチンや診断薬の低コストでの開発に貢献すること見込まれる（辻）。

③ 検査法に関する研究：魚介類から病原性腸炎ビブリオを定量的に検出する方法に関して、既知の全ての K 抗原に対する免疫時期ビーズ法と開発し、LAMP 法による簡便かつ高感度な *tdh* 遺伝子検出法と併用する方法を確立し、論文にまとめて出版した。この方法は、途上国を含めた世界中のいかなる国でも実施できるほど簡便かつ高感度であるので、FAO/WHO によって世界標準検査法の有力候補として認識され、第 2 回目の validation でも採用された。すなわち、2013 年 12 月の南米代表国を対象とした FAO 主催ワークショップで、本法を参加者に指導した。また、中国において本法を普及するために、京都大学と上海海洋大学との共同ワークショップを 2013 年 8 月に上海で開催し、中国国内からの参加者に本法を指導した（西淵）。

腸炎ビブリオの主要な病原遺伝子のひとつである *trh* を検出する LAMP 法（安価な迅速検出法）を開発した。さらに腸炎ビブリオとコレラ菌の主要な病原遺伝子（*tdh* ならびに *ctx*）をあわせて包括的に検出する multiplex LAMP 法の開発を完成させた。両法を既存の PCR 法と比較した結果、検出限界では PCR 法に及ばなかったが、判定所要時間ならびに費用では LAMP 法がいずれも優れた結果を示

した。（山崎渉）。

DNA クロマトグラフィー法によって、PCR 増幅産物を迅速かつ簡便に検出・識別する方法を菌の検出法として完成し、それをカンピロバクターの検出に適用して、従来法よりも高感な新たな検査法として確立し、これらを論文にまとめて出版した（江崎）。

様々なサルモネラ属菌分離株に由来する本菌に特異的な遺伝子 *stn* の遺伝子配列比較により *stn* 遺伝子内に血清型ごとに使用塩基が異なる一塩基多型様の箇所(SNP 様箇所)を複数同定した。本結果は *stn* 遺伝子配列解析に基づく迅速な血清型別法の開発の可能性を示唆するものであった。さらにそれらの SNP 箇所に対してリアルタイム PCR 法を用いた迅速な使用塩基解析法の開発を行い、現在までに少なくとも 13 種類の血清型について判別可能な迅速かつ簡便な血清型別法を構築した（倉園）。

D. 考察

本年度は、昨年度に比べて研究メンバー数がやや減少したが、研究分担者および研究協力者の一部をのぞくと、それぞれが日本以外のアジアの現地で特化した共同研究プロジェクトを実施しており、研究目標達成に近づいている。特に、日本で開発した魚介類（二枚貝）からの病原性腸炎ビブリオの定量検出法は高感度で、かつ途上国でも実施可能な安定・簡便化が特徴であり、FAO が主催した validation (2013 年 12 月、サンティアゴ) で高い評価

を受け、世界標準法の最有力候補になっており、魚介類の貿易摩擦解消に役立つ可能性がある。またタイでは、日 - タイ共同研究に米国が参加した研究が実現した。（ビブリオの生態学、発表論文参照）が実現した。

一方、日本 - 米国 - アジア諸国というトライアングルの関係については、部会内でのレベルではあるが日米の両者から賛同する声を聞くことができた。次年度もこの協力体制を維持・強化しつつ成果物を得られるように研究が展開していくよう期待したい。

E. 結論

日本 - 米国 - アジアの協力体制の重要性に関して、部会内部での意見、日米以外のアジアでの合同部会の開催、合同部会でのアジアからの発表数の増加、日米パネルメンバー（および米国の *ad hoc* パネルメンバーであるアジアからの参加者の意見、日-アジア-米が参加したアジアでの共同研究の成功例などが、このような研究協力システムの重要性を示唆している。

F. 健康危険情報

生態学・疫学研究グループの成果に腸管病原性細菌のアジア地域での分布状況が含まれるので、現地および海外からの旅行者の健康情報として役立つと期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yingkajorn M, Sermwitayawong N, Palitapongarnpimp P, Nishibuchi M, Robins WP, Mekalanos JJ, Vuddhakul, V. *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacteriophages as an indicator in cockles (*Anadara granosa*) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in southern Thailand. Microb. Ecol., in press [2014].
- (2) Tanaka N, Iwade Y, Yamazaki W, Gondaira F, Vdddhakul V, Nakaguchi Y, Nishibuchi M. An Easy and Sensitive Quantification Procedure for *tdh+* *Vibrio parahaemolyticus* in Molluscan Shellfish Using K antigen-specific Immunomagnetic Separation and LAMP J. Food Protect., in press [2014].
- (3) Hayashi M, Kubota-Hayashi S, Natori T, Mizuno T, Miyata M, Yoshida S, Jiwei Zhang, Kawamoto K, Ohkusu K, Makino S, Ezaki T. Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. International Journal of Food Microbiology 163(2013) 41-46.

- (4) Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T. A New Protocol to Detect Multiple Foodborne Pathogens with PCR Dipstick DNA Chromatography after a Six-Hour Enrichment Culture in a Broad-Range Food Pathogen Enrichment Broth. BioMed Research International Volume 2013, Article ID295050, 10 pages
- (5) Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam N. H, Nakaya T, Horii T, Ali, S. I., Iida T, and Alam M. Profile of gut microbiota in children during cholera and recovery. Gut Pathog. 5:1, 2013
- (6) Yamazaki W, Kumeda Y, Uemura R, and Misawa N. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated seafood samples. Food Microbiol 28:1238-41, 2011.
- (7) Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholera* 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, 2011.
- (8) Zaw MT, Yamasaki E, Yamamoto S, Nair GB, Kawamoto K, Kurazono H Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. Gut Pathog. 5: 13, 2013.
- (9) Nitaya Indrawattana, Orawan Sungkhachat, Nitat Sookrung, Manas Chongsa-nguan, Anchalee Tungtongchitr, Supayang Piyawan Voravuthikunchai, Thida Kong-ngoen, Hisao K and Wanpen Chaicumpa. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. BioMed Research International, 2013: 314654, 2013.
- (10) Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Toyoi H, G. Balakrish Nair, Kurazono H and Kurazono T. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. BioMed Research International. 2103: 679038, 2013.
- (11) Shibata Y, Nomoto R, Garry Cores de Vries, and Osawa R.

- Serendipitous Isolation of Non-*Vibrio* Bacterial Strains Carrying the Cholera Toxin Gene from Environmental Waters in Indonesia. International Journal of Microbiology Volume 2013, Article ID 406078, 6 pages.
- (12) Shinoda S, Furumai Y, Katayama S, Mizuno T, Miyoshi S. Ecological study of pathogenic vibrios in aquatic environments. Biocontrol Sci, 18:53-58, 2013.
- (13) Elgaml A, Higaki K, Miyoshi S. Regulation system of serine protease production in *Vibrio vulnificus* strain NCIMB 2137, a metalloprotease-gene negative strain isolated from a diseased eel. Aquaculture, 416:315–321, 2013.
- (14) Miyoshi S. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species. Front Microbiol, 4:339, 2013.
- (15) Elgaml A, Higaki K, Miyoshi S. Effects of temperature, growth phase and luxO-disruption on regulation systems of toxin production in *Vibrio vulnificus* strain L-180, a human clinical isolate. World J Microbiol Biotechnol, 30:681–691, 2014.
- (16) Komura T, Ikeda T, Yasui C, Saeki S, and Nishikawa Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. Biogerontology 14(1): 73-87, 2013.
- (17) Nakamura H, Takakura K, Sone Y, Itano Y, and Nishikawa Y. Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. J. Food Prot. 76 (7) : 1179-1186, 2013.
- (18) 菊田英明、涌嶋三津子、西川禎一. 小児の散発性下痢症から分離され、O 群 血清型分類が可能であった大腸菌の病原遺伝子保有率の評価. 小児感染免疫 25 (4) : 413-419, 2013.
- (19) Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis of the microbial ecology between *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. J Med Microbiol. 63, 129-37, 2014.
- (20) Flahou B, Haesebrouck F, Smet A, Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Gastric and enterohepatic non-*Helicobacter pylori* Helicobacters. Helicobacter. 18 Suppl, 1:66-72, 2013.

- (21) Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Ochiai K, Kamiya S. Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations. PLoS One. 6, e73301, 2013.
- (22) Osaki T, Okuda M, Ueda J, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, Yagyu K, Lin Y, Fukuda Y, Kikuchi S, Kamiya S. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 62, 761-5, 2013.
- (23) Amran MY, Fujii J, Suzuki SO, et al. : Investigation of encephalopathy caused by Shiga toxin 2c-producing *Escherichia coli* infection in mice. PloS one 8:e58959, 2013.
- (24) Amran MY, Fujii J, Kolling GL. et al. : Proposal for effective treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in mice. Microb Pathog. 65:57-62, 2013.
- (25) Arimitsu H, Sasaki K, Kojima H, Yanaka T, Tsuji T. Simple method for Shiga toxin 2e purification by affinity chromatography via binding to the divinyl sulfone group. PLoS One. 8(12):e83577, 2013
2. 学会発表
- (1) (招待講演) Nishibuchi, M.: Incidence of pathogenic strains of *Vibrio cholerae* in seafood in Japan and Malaysia. Hands on Training Workshop: MPN-PCR-LAMP-IMS-PLATING for detection of pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* (November 26, 2013. Peru-NIH)
- (2) (招待講演) Nishibuchi, M.: Clinical significance and detection methods of pathogenic population of *Vibrio parahaemolyticus*. Hands on Training Workshop: MPN-PCR-LAMP-IMS-PLATING for detection of pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* (November 26, 2013. Peru-NIH, Lima, Peru)
- (3) (招待講演) Nishibuchi, M.: Importance of international perspective and public health measures in food poisoning: lessons from the studies on the pandemic of *Vibrio parahaemolyticus* infection XXXV Congreso Chileno de Microbiología (the 3^{5th} Annual Meeting of Chilean Microbiological Society) (November 30, 2013. Hotel Marbella Resort, Maitencillo, Chile)
- (4) (招待講演) Nishibuchi, M.: What

is more important for vibrio pathogens than antibiotic resistance? United States-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. February 11, 2014. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. International Centre for Diarrheal Diseases, Dhaka, Bangladesh.

- (5) (招待講演) Okuda, J., C. Suezawa, M. Yasuda, C. Kunikata, O. R. Maldonado, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi: Relative pathogenic significance of the thermostable direct hemolysin (TDH, TDH-related hemolysin, and type 3 secretion system of *Vibrio parahaemolyticus* as evaluated by their gene sequence and penetration through the human intestinal epithelial cell Caco-2 monolayer. 48thUS-Japan Cooperative Medical Sciences Program Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. February 11, 2014. International Centre for Diarrheal Diseases, Bangladesh.

- (6) (招待講演) Nishibuchi, M. A pandemic of *Vibrio parahaemolyticus* infection: emergence, characteristics and spread of the pathogen and control of the infection. February 20,

2014. MEDLAB Asia Pacific Conference 2014. Marina Bay Sands Hotel, Singapore.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。