

分 担 研 究 報 告 書

ヒトの感染に關与する家畜の探索

西川 禎一

平成29年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究者代表 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

ヒトの感染に關与する家畜の探索

(食中毒調査における食品中の病原大腸菌の統括的検査法の開発に関する研究)

研究分担者 西川禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科

研究要旨

平成27年度にETEC O169:H41の病原プラスミドの全塩基配列を決定した。その結果、本プラスミドはRepFIIプラスミドファミリーに属するが、他のRepFIIファミリーのETECプラスミドと比較してサイズが大きく、挿入配列の割合が高くてプラスミドの安定性に関する遺伝子が少ないこと、が明らかになった。このような特性は、本プラスミドがin vitroで容易にO169から脱落する原因になっていると推察される。しかしながら、O169は四半世紀に渡り主要なETECの地位を占めており、病原プラスミドを落とさない選択圧が野外では働いている。本プラスミドには、CS6、CS8-like、K88-like、以上3種類の腸管定着因子がコードされている。極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらずin vivoではよく維持されている理由として、異なる宿主に対応できる定着因子をコードし、O169の感染適応力の増強に本プラスミドが大きく寄与しているためとの仮説を立てた。3種の定着因子遺伝子を用いて組み換え用菌株TOP10を形質転換し、腸粘膜上皮細胞に対する付着性と宿主特異性をヒト、ブタ、ウシの培養細胞を用いて検討した。その結果、定着因子K88-like遺伝子で組み換えた株はヒトのみならずブタとウシの腸粘膜上皮細胞にも強い接着性を示した。本プラスミドは多様な宿主への感染力をO169に提供することで、野外では保持されている可能性があり、ETEC対策にはOne Healthも考慮した検討が必要と考えられる。

研究協力者

坂 瑛里香

大阪市立大学大学院生活科学研究科 修士課程

鄭 冬明

大阪市立大学大学院生活科学研究科 修士課程

大森裕子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 修士課程
中台(鹿毛)枝里子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 准教授
和田崇之	長崎大学 准教授
麻生 久	東北大学大学院農学研究科 教授
Weiping Zhan	カンザス州立大学獣医学研究科 教授

A. 目的

大腸菌(*Escherichia coli*) は、恒温動物の腸内に広く分布しており、ヒトにおいても出生と同時に腸管内へと急速に広がり常在菌として定着する(1)。しかしながら、大腸菌の一部には特殊な病原因子によって人に下痢症を起こすものがあり、行政的には病原大腸菌、学術的には下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *E. coli*, 以後 DEC と略す) と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて 腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC), 腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 以上4群に長らく大別されてきたが、2012年1月からは 腸管凝集接着性大腸菌 (Enterocoagulative *E. coli*, EAEC), も DEC に認定された。他にも分散接着性大腸菌 (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC),

細胞膨化致死毒素産生性大腸菌(CTEC), 腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1)遺伝子保有大腸菌 (EAST1EC), 細胞剥脱性大腸菌 (CDEC) など、新たな DEC の候補とされるサブグループが複数存在する。

このうち ETEC は、大腸菌によるヒト下痢症の最も一般的な原因菌である (2)。その主な感染経路は、汚染された水や食べ物を体内に摂取することであり、1~3日の潜伏期間を経て水様性下痢を主徴とする症状を発症する(2)。下痢は菌が産生するエンテロトキシンの作用によるもので、胃腸炎症状は原則として見られない(3)。しかしながら、水分や電解質の喪失による脱水症を引き起こし、死亡する場合もある(4)。ETEC は特に発展途上国において頻発し、EPEC やロタウイルスそしてクリプトスポリジウムとならぶ主要な下痢症原因菌である(5)。これらは5歳未満で死亡した下痢症患者の半数以上を占めており、ETEC だけでも年間2万人

から 7 万 6 千人の乳幼児が死亡する(6) .
これらの国を訪れる旅行者や軍人にも下痢症を引き起こすため、いわゆる旅行者下痢症の原因菌としても知られている .

ETEC の O169:H4k (以後 O169 と略す) は 1991 年に日本で初めて発見されたが(7) , 以後 , O169 感染の報告が日米で相次ぎ(8-10) , 1990 年代には ETEC による集団感染の多くが本血清型菌によるものとなった(11) . O169 はエンテロトキシン STp を産生し , 腸管定着因子 CS6 を保有する . また , 巨大なプラスミドを有し , STp もこのプラスミドにコードされていることが確認された(12) . さらに , O169 は既知の付着因子 CS6 を有しているが , 他の ETEC では見られない HEp-2 細胞への強い凝集接着性を示すことが報告された . その細胞付着像は EAEC の HEp-2 細胞への付着像に酷似しているが , EAEC の凝集接着に關与する線毛の発現を制御する遺伝子 *aggR* を保有していない(12) . O169 が 1991 年以降急激に広がったことから , その腸管定着因子が従来の定説とは異なる宿主特異性を有する可能性も否定できない . また , この接着性もプラスミドの脱落により喪失することから , 付着因子をコードする遺伝子もプラスミド上にあり , 本菌が未知の定着因子を保有

する可能性が示唆された(12) .

O169 を試験管内で培養すると , その病原プラスミドは極めて容易に脱落し , O169 は細胞付着性も毒素産生性も喪失する(13) . しかし , O169 は既に四半世紀以上に渡り主要な ETEC として数多くの集団発生を起こしており , 野外においてはプラスミドを喪失させない選択圧が働いていると考えられる . 一般に , ETEC には厳密な宿主特異性があるが , ブタやウシの ETEC はブタやウシのみに感染し , ヒトの ETEC はヒトのみに感染すると考えられている . しかしながら , 27 年度に報告した O169 の病原プラスミド (pEntYN10) 全塩基配列の解析では , CS6 以外に 2 種の接着因子候補 (CS8-like と K88-like) の遺伝子が新たに発見された . K88-like の遺伝子はブタ ETEC の腸管定着因子である K88 と一部相同性を有していた(13) . そこで , 本プラスミドが自身を維持する遺伝子が少なく in vitro では脱落しやすいにもかかわらず野外で保持されている理由として , これら 3 種の接着因子が O169 の宿主特異性を広げて感染の連鎖を保たれやすくすることでプラスミドを保持する O169 が優勢を保てるようにし , ETEC O169 の急激な流行を支えている , との仮説を立てた(13,14) .

本研究の目的は、組み換え実験用の大腸菌株に3種の接着因子候補遺伝子それぞれを組み込み、その細胞接着性と宿主特異性を検討することで、前記の仮説を検証することにある。従来の付着性試験では培養細胞への菌の接着状況を顕微鏡観察することで接着性を定性的に評価してきたが、今年度は定量的に調べるため付着菌数を測定した。さらに、昨年度の試験で強い付着像を示した接着因子 K88-like に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。

B. 方法

1. 使用菌株

下痢症患者の便から独自に分離した ETEC O169:H41 の YN10 株、大腸菌の実験室株として One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies), O169 の接着因子である CS6、K88-like および CS8-like の各遺伝子で TOP10 を形質転換した株を実験に供した。

2. 培養細胞

ヒト結腸癌由来の上皮細胞である Caco-2(15)および喉頭ガン由来の HEp-2 細胞(16)、ブタ小腸由来の上皮細胞である IPEC-1(17)およびブタ空腸由来の上皮細胞である IPEC-J2(18-20)、ウシ腸粘膜

上皮細胞である BIE(21)について、各細胞指定の組織培養液を用いて実験に供した。

3. 付着性試験

25 cm² のフラスコに細胞がフルシートになるまで HEp-2, IPEC-1, そして BIE を培養した。フルシート後は PBS で洗浄し、トリプシン処理した後 3 倍に希釈して継代した。トリプシン処理したフルシートの細胞を培養液 12 ml で懸濁し、予め直径 13 mm の丸形カバーグラスを入れた 24 穴プレートの各ウェルに 0.5 ml ずつ分注し、CO₂ インキュベータで 48 時間培養した。その後上清を除き、メチル α-D-マンノピラシド(和光純薬)を 0.5% 含む細胞培養液を 0.5 ml 加えた。供試菌株を培養した LB ブイヨンに 10 μl ずつ接種し(50 倍希釈)、3 時間培養した。細胞をメタノール固定後、10% ギムザ液で細胞を染色し、鏡検した(23)。また、付着菌数測定用のウェルからは丸形カバーグラスをピンセットで取り出し、滅菌 PBS 中で振り動かして洗浄、これを 3 本の PBS 容器中で連続した。洗浄済みのカバーグラスを 1% Tween80 溶液に浸けて細胞を溶解させ、PBS で段階希釈した。スパイラルプレート法で寒天培地に塗布し、37 °C で一晩培養した。翌日コロニー計数を行い接着していた生菌の数を算定した。

4. モノクローナル抗体の作製

K88-like の特異的な付着性に関与すると推察される遺伝子 *faeG1* と *faeG2* の塩基配列に基づきアミノ酸 9 個分の合成ペプチドを抗原としてラットの後足裏に接種し、約 3 週間飼育後に腸骨リンパ節を取り出した。細胞融合により、ハイブリドーマを作製した。96 ウェルプレートで培養し、抗原と反応する抗体を産生する細胞を ELISA 法と凝集反応試験により選別した。スクリーニングにより、抗体の産生が確認された細胞群を限界希釈、シングルコロニーとなるまで培養し、ELISA 法でモノクローナル抗体が作製されていることを確認し、以降の実験で利用した。

5. 免疫電顕

供試菌は、O169 および O169cured , Top10 , K88-like 組込み株を使用した。親水処理した炭素膜グリッドに菌懸濁液をのせて吸着させた後、1% TritonX-100 で菌体の中身を抜いた。2% BSA で 10 倍希釈した 1 次抗体および金コロイドで標識した抗ラット 2 次抗体と 1 時間反応させ、2% モリブデン酸アンモニウムで染色し、乾燥後、電子顕微鏡で観察した。

6. ウエスタンブロット

供試菌は Buffered Peptone Water で 16 時間培養後、超音波処理破碎によりタンパクを回収し、SDS-PAGE (12.5%) を行

った。1 次抗体として作製したモノクローナル抗体、2 次抗体として HRP 標識された抗ラット IgG 抗体を用いた。検出には ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いた。

7. 凝集反応試験

供試菌は Luria Broth で 16 時間培養後、1% ホルムアルデヒド添加生理食塩水で処理し、実験に供する際にはホルムアルデヒド添加生理食塩水を除き、生理食塩水で再懸濁した。96 ウェルプレートにモノクローナル抗体を段階希釈し、死菌懸濁液を加え、室温で一晩静置した。

C. 結果

1. ヒト、ブタ、ウシ由来の腸粘膜上皮細胞にに対する接着性

28 年度に顕微鏡観察で判定した結果が今回の定量試験でも再確認された。すなわち、O169 野生株と K88-like 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28K88-like で形質転換された TOP10K88-like 株は、附着試験後のヒト由来 HEp-2 細胞、ブタ由来 IPEC-1 細胞、ウシ由来 BIE 細胞から 10^7 前後の菌が回収された。一方、病原プラスミド pEntYN10 が脱落した O169cured 株、実験室株の TOP10 , CS6 遺伝子を含む領域を組み込んだ pSV28CS6 で形質転換された TOP10CS6

株，ならびに CS8-like の遺伝子領域を組み込んだ pSV28CS8-like で形質転換された TOP10CS8-like 株は 1-2 桁低い菌数にとどまった（図 1-3）．ただし，ブタ由来 IPEC-1 細胞では病原プラスミドを喪失した O169cured と TOP10CS6 株もやや高い菌数を示し，O169cured 株はウシ由来 BIE 細胞でも他と比べて高い菌数を示した．しかしながら，顕微鏡観察では 28 年度に報告したのと同様に O169 と TOP10K88-like 株のみが強い付着像を示した．

2．モノクローナル抗体の作製

ELISA 法による抗体産生チェックにおいて，抗 FaeG1 として 29 個，抗 FaeG2 として 25 個の陽性サンプルが確認された．これらについて，TOP10K88-like を抗原として凝集反応試験を行ったところ，それぞれ 2 個ずつの陽性が確認された．これらを限界希釈し，シングルコロニーとなるまで培養を繰り返し，再び ELISA 法によりスクリーニングを行った結果，FaeG1 で 1 クローン，FaeG2 で 2 クローンのモノクローナル抗体産生細胞を得ることができた．

3．免疫電顕

菌体間で金コロイド数に有意な差は見られず，抗 K88-like 抗体が強く反応している様子は見られなかった（図 4）．

4．ウエスタンブロッティング

ハウスキーピングの DnaK を 1 次抗体とした試験では，有効なバンドを確認することができた．続いて，定着因子が発現していることを確認するため抗 CS6 抗体を 1 次抗体とした試験を行い TOP10CS6 で有効なバンドを確認できた．実験手技と定着因子の発現確認ができたため，抗 K88-like モノクローナル抗体を利用した試験を行ったが 3 クローンいずれの抗体も明瞭なバンドを生じさせなかった．

5．凝集反応試験

3 種のモノクローナル抗体いずれもが TOP10K88-like を凝集したが，本来陽性と期待される O169 では確認できなかった．そこで，念のためにネガティブコントロールの Top10 を調べたところ陽性反応が見られた．このことから，今回作製したモノクローナル抗体は K88 様定着因子と特異的に反応するものではないことが示唆された．

D．考察

EPEC は宿主の腸粘膜への定着，すなわち上皮細胞への接着と局所での増殖，を果たしながらエンテロトキシンを産生して下痢症を引き起こす．したがって，接着因子

は極めて重要な病原因子であるが、Caco-2 細胞が使われるようになる前は、in vitro での接着試験に有用な培養細胞はなく(15)、赤血球凝集試験(24)や菌体疎水性試験(25)などが接着性の指標として使われていた。そのような時代に HEp-2 細胞に凝集接着する ETEC として出現した O169 は異色の存在であった(12)。

O169 の病原プラスミド pEntYN10 の全塩基配列を解析したところ、CS6, CS8-like, K88-like の 3 種の定着因子候補遺伝子群を認め(13)、ブタ ETEC の定着因子である K88 (別名 F4)は線毛を形成するが、O169 の電子顕微鏡観察では K88 様の線毛は観察されておらず(12)、しかも pEntYN10 の K88-like 遺伝子群には主要線毛サブユニットをコードする *faeG* と相同性のある配列が 2 つ保有される前例のないものであった。*faeG* 配列の系統発生樹によると、2 つの *faeG* 遺伝子は、ブタから分離された大腸菌の *faeG* よりも、ヒトから分離された *Salmonella enterica* serovar Infantis の *faeG* と近いこと

が分かった(13)。このことから、pEntYN10 の K88-like がヒトへの感染のために働いている可能性が推察された。実際に 3 種の各遺伝子で組み換えた TOP10 株を用いた実験によって定性的にも定量的にも K88-like が in vitro における O169 の特異な接着像を創り出していることが明らかになった。

ETEC はヒトのみならずブタやウシの下痢症原因ともなる。そのエンテロトキシン LT と ST の毒性は家畜とヒトに共通のものが多い。しかし、腸粘膜への定着因子が異なるため、家畜の ETEC は家畜の間で、ヒトの ETEC はヒトの間だけで感染を循環させており相互の行き来はないとされてきた(3)。しかしながら、pEntYN10 のように in vitro では脱落しやすいプラスミドが O169 に保たれているという事実は、本菌が常に効率よく感染を繰り返し in vivo に保たれていることを示唆する。本プラスミド上にコードされた 3 種の定着因子遺伝子を使い分けることによって O169 が多様な宿主に感染する能力を得ているとすれば、脱落しやすいブ

ラスミドが保持され続けるのも理解できる。K88 はもともとブタ ETEC の定着因子であり、ヒトに感染するための CS6 や CS8 などと宿主に合わせた使い分けを O169 がしているとすれば、ETEC 感染症対策について考えを改める必要も生じる。ヒト ETEC の汚染源が本当にヒトだけなのか、新しい視点で調べ直す必要がありそうだ。

K88-like 抗原を簡便に検出したり、その菌体における局在や宿主細胞との結合に重要なエピトープを決定したりする目的で今回はモノクローナル抗体の作製を試みた。しかしながら、免疫電顕でもウェスタン・ブロッティングでも明瞭な反応が出ず、凝集試験によって K88-like で組み替えた菌体のみならず TOP10 自体とも反応していることが判明した。抗原として作製した合成ペプチドと同様の抗原を TOP10 が保有している可能性を予想せず、合成ペプチドを用いた ELISA と TOP10K88-like の凝集試験でクローンの選別を進め、陰性対照として TOP10 を凝集試験に置いていなかったことが失敗の原因である。基本に立ち返り、再度挑戦する予定である。

E. 結論

ETEC O169:H41の病原 プラスミドの全塩基配列を決定したところ、本菌にはCS6, CS8-like, K88-like, 以上3種類の腸管定着因子がコードされていることが明らかとなった。極めて不安定で脱落しやすいプラスミドであるにもかかわらず維持されている理由として、異なる宿主に対応できる定着因子をコードし、O169の適応力増強に本プラスミドが寄与しているためかもしれない。今回、in vitroではあるが、K88-like 遺伝子がヒト、ブタおよびウシの腸粘膜上皮細胞への付着性に寄与することが明らかになった。ETECの宿主特異性について固定観念を取り払って考え直す価値があると考えられる。

F. 文献

1. 光岡知足. 腸内菌叢の形成、推移、分布. In: 光岡知足、editor. 腸内細菌学. 東京: 朝倉書店; 1990. p. 87-107.
2. Gastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol. 1996;4(11):444-52.

3. 甲斐明美 . ETEC (腸管毒素原性大腸菌) . In: 仲西寿男、丸山務、editors. 食品由来感染症と食品微生物 . 東京: 中央法規; 2009. p. 269-80.
4. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(3):465-83.
5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 2013;382(9888):209-22. PMID: 23680352.
6. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One.* 2013;8(9):e72788.
7. Nishikawa Y, Hanaoka M, Ogasawara J, Moyer NP, Kimura T. Heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41 in Japan. *Emerg Infect Dis.* 1995;1(2):61.
8. Ando K, Itaya T, Aoki A, Saito A, Masaki H, Tokumaru Y. An outbreak of food poisoning caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41. *Jpn J Food Microbiol.* 1993;10:77-81.
9. Beatty ME, Bopp CA, Wells JG, Greene KD, Puhr ND, Mintz ED. Enterotoxin-producing *Escherichia coli* O169:H41, United States. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(3):518-21.
10. Devasia RA, Jones TF, Ward J, Stafford L, Hardin H, Bopp C, et al. Endemically acquired

- foodborne outbreak of enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. Am J Med. 2006;119(2):168 e7-10.
11. 西川 禎一. 食生活をおびやかす食中毒と感染症. In: 山口英昌、 editor. 食環境科学入門 食の安全を環境問題の視点から: ミネルヴァ書房; 2006. p. 117-36.
 12. Nishikawa Y, Helander A, Ogasawara J, Moyer NP, Hanaoka M, Hase A, et al. Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. Epidemiol Infect. 1998;121(1):31-42.
 13. Ban E, Yoshida Y, Wakushima M, Wajima T, Hamabata T, Ichikawa N, et al. Characterization of unstable pEntYN10 from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41. Virulence. 2015;6(8):735-44.
 14. Gonzales-Siles L, Sjoling A. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2016;18(3):741-51.
 15. Darfeuille Michaud A, Aubel D, Chauviere G, Rich C, Bourges M, Servin A, et al. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Infect Immun. 1990;58(4):893-902.
 16. Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. 1991;337(8736):262-4.
 17. Lu S, Yao Y, Cheng XY, Mitchell S, Leng SY, Meng SM, et al. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. J Biol Chem.

- 2006;281(6):3473-83.
18. Fekete PZ, Mateo KS, Zhang WP, Moxley RA, Kaushik RS, Francis DH. Both enzymatic and non-enzymatic properties of heat-labile enterotoxin are responsible for LT-enhanced adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine IPEC-J2 cells. *Vet Microbiol.* 2013;164(3-4):330-5.
 19. Gonzalez-Ortiz G, Hermes RG, Jimenez-Diaz R, Perez JF, Martin-Orue SM. Screening of extracts from natural feed ingredients for their ability to reduce enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) 1038 adhesion to porcine intestinal epithelial cell-line IPEC-J2. *Vet Microbiol.* 2013;167(3-4):494-9.
 20. Zakrzewski SS, Richter JF, Krug SM, Jebautzke B, Lee I-FM, Rieger J, et al. Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. *Plos One.* 2013;8(11):e79643.
 21. Miyazawa K, Hondo T, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Itani W, et al. Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochemistry and Cell Biology.* 2010;133(1):125-34.
 22. Wajima T, Sabui S, Fukumoto M, Kano S, Ramamurthy T, Chatterjee NS, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* CS6 gene products and their roles in CS6 structural protein assembly and cellular adherence. *Microb Pathog.* 2011;51(4):243-9.
 23. Nishikawa Y, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Catabolite repression of the adhesion of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of serogroups O157 and O111. *Microb Pathog.* 1995;18(3):223-9.
 24. Old DC. Haemagglutination

methods in the study of *Escherichia coli*. In: Sussman M, editor. The virulence of *Escherichia coli*. London: Academic Press; 1985. p. 287-313.

25. Lindahl M, Faris A, Wadstrom T, Hjerten S. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1981;677(3-4):471-6.

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究発表

1. 論文発表

Wang, L., Zhang, S., Zheng, D., Fujihara, S., Wakabayashi, A., Okahata, K., Suzuki, M., Saeki, A., Nakamura, H., Hara-Kudo, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in

foods and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect Dis.*70:464-9.

Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. (2017) Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* 249:44-52.

2. 学会発表

Parvej, M. S., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Molecular characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolates from poultry. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 68. 2017/9/5-8

Takeuchi, N., Tanimoto, Y., Tamai, S., Yanagida, S., Yamaguchi, Y., Kage-Nakadai, E., and Nishikawa, Y. (2017) Diffusely adherent

- Escherichia coli* (DAEC) strains isolated from healthy carriers inhibit IL-8 secretion of epithelial cells by the type VI secretion system (T6SS). The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan, Abstract: 71. 2017/9/5-8
- Omori, Y., Zheng, D., Ban, E., Kage-Nakadai, E., Tachibana, T., Wada, T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Adhesion of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O169:H41 to porcine intestinal epithelial cells by the novel colonization factor. Vaccines for Enteric Diseases, AAU Sao Rafael Atlantico Hotel, Albufeira, Portugal, Abstract; Poster A128. 2017/10/9-11
- 柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一. 上皮細胞からのサイトカイン分泌における分散接着性大腸菌の抑制効果、第90回日本細菌学会総会、平成29年3月19-21日 仙台国際センター
- WS4-4 (P-216) 優秀発表賞受賞
鄭 冬明、坂 瑛里香、大森裕子、池崎沙耶加、中臺(鹿毛)枝里子、和田崇之、工藤由起子、西川禎一. 上皮細胞に対する腸管毒素原性大腸菌O169:H41の特異な接着性に寄与する新規付着因子、第71回日本栄養・食糧学会大会、平成29年5月19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E52(p.243)
- 柳田 咲、玉井 沙也加、能重 匠、谷本佳彦、松崎壮宏、竹内成美、中臺枝里子、山口良弘、児玉年央、飯田哲也、西川禎一. 培養細胞からの炎症性サイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制機構、第71回日本栄養・食糧学会大会、平成29年5月19-21日 沖縄コンベンションセンター 2A-E53(p.244)
- 谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、柳田 咲、中台枝里子、山口良弘、西川禎一. 上皮細胞からのサイトカイン分泌に対する分散接着性大腸菌の抑制効果に關与する因子の探索、第38回日本食品微生物学会学術総会、平成29年10月5-6日 あわぎんホール 1C02 (p.51)
- 谷本佳彦、竹内成美、玉井沙也加、

柳田 咲、中台(鹿毛)枝里子、山口良弘、西川禎一. 健康者由来の分散接着性大腸菌はVI型分泌装置によって上皮細胞からのIL-8分泌を抑制する、第70回日本細菌学会関西支部学術集会、平成29年11月25日 大阪府立大学
I-siteなんば 若手-14

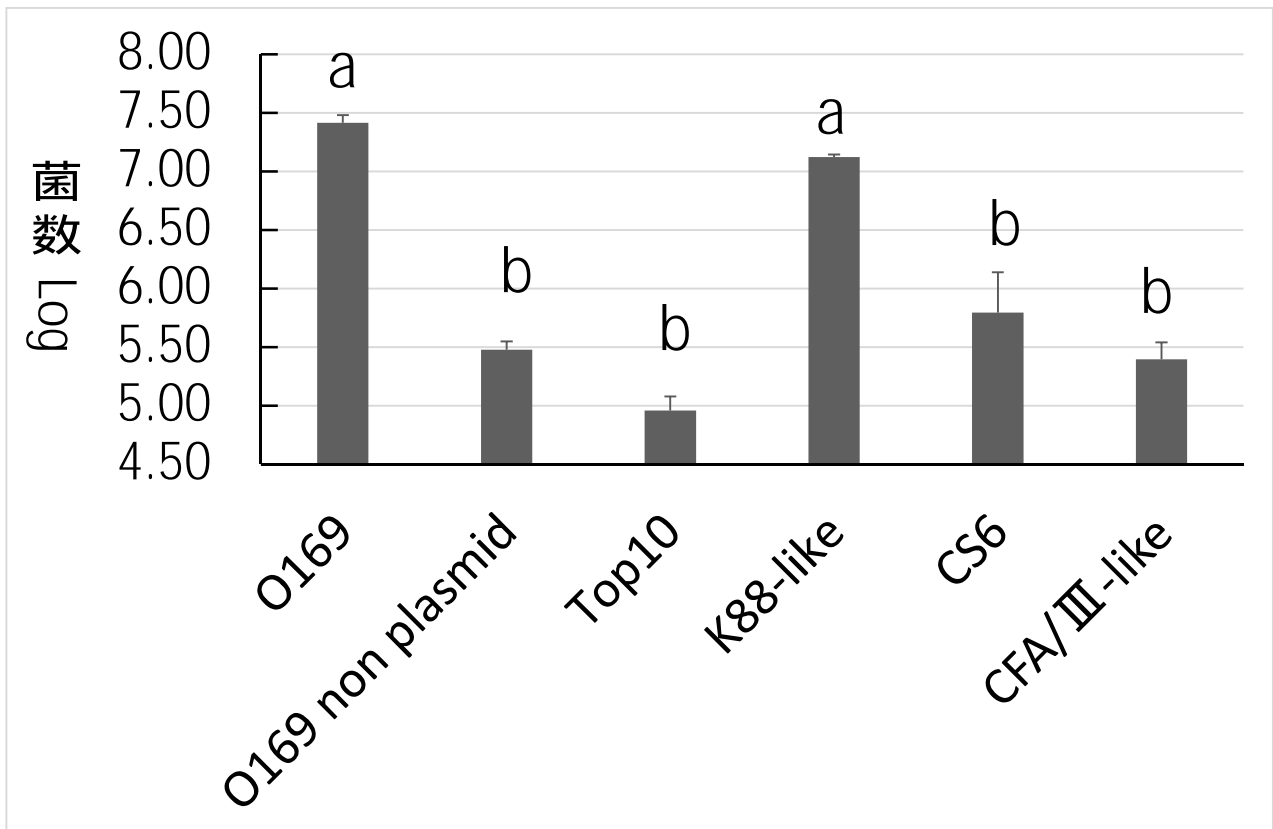


図1 . ヒト上皮細胞 HEp-2 への付着菌数 (n=5)

p<0.05: O169 と CS6 の間、 K88-like と O169 non plasmid, CS6, CFA/III-like の間

p<0.01: O169 と O169 non plasmid, Top10, CFA/III-like の間、
K88-like と Top10 の間

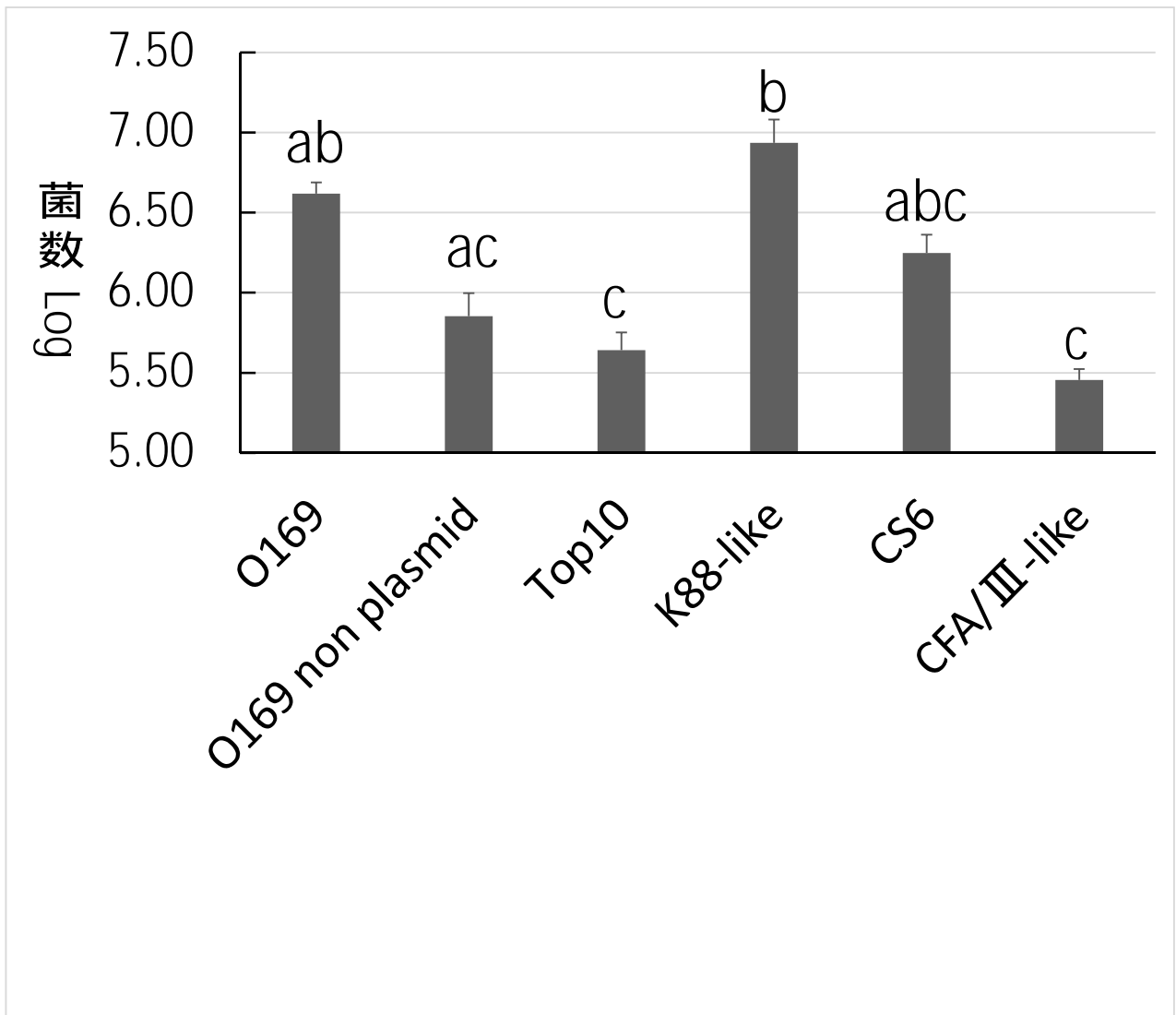


図2 . ブタ上皮細胞 IPEC-1 への付着菌数 (n=3)
 p<0.05: O169 と Top10, CFA/III-like の間、K88-like と O169 non plasmid, Top10, CFA/III-like の間

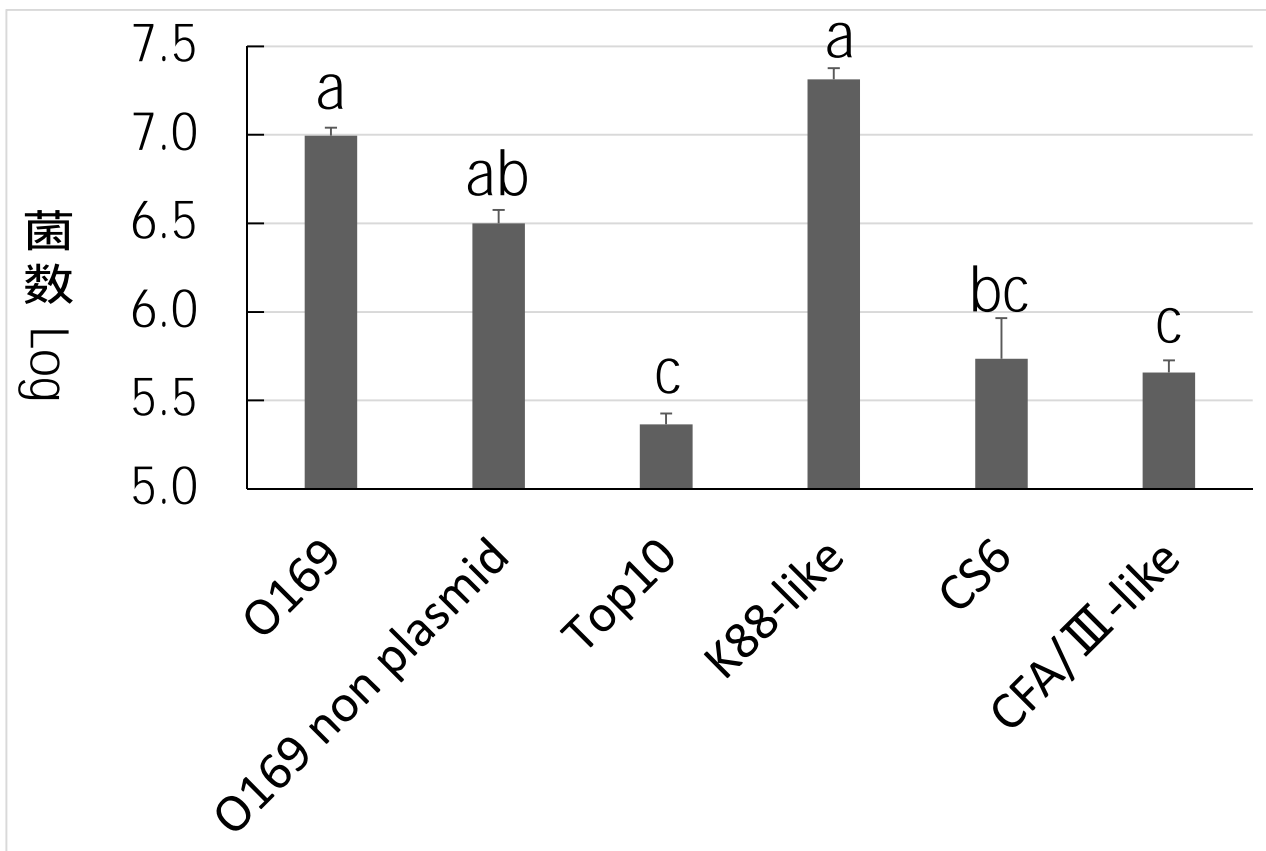


図3. ウシ上皮細胞 BIE への付着菌数 (n=3)

p<0.05: O169 と CS6, CFA/III-like の間、O169 non plasmid と Top10, CFA/III-like の間

p<0.01: O169 と Top10 の間、K88-like と Top10, CS6, CFA/III-like の間

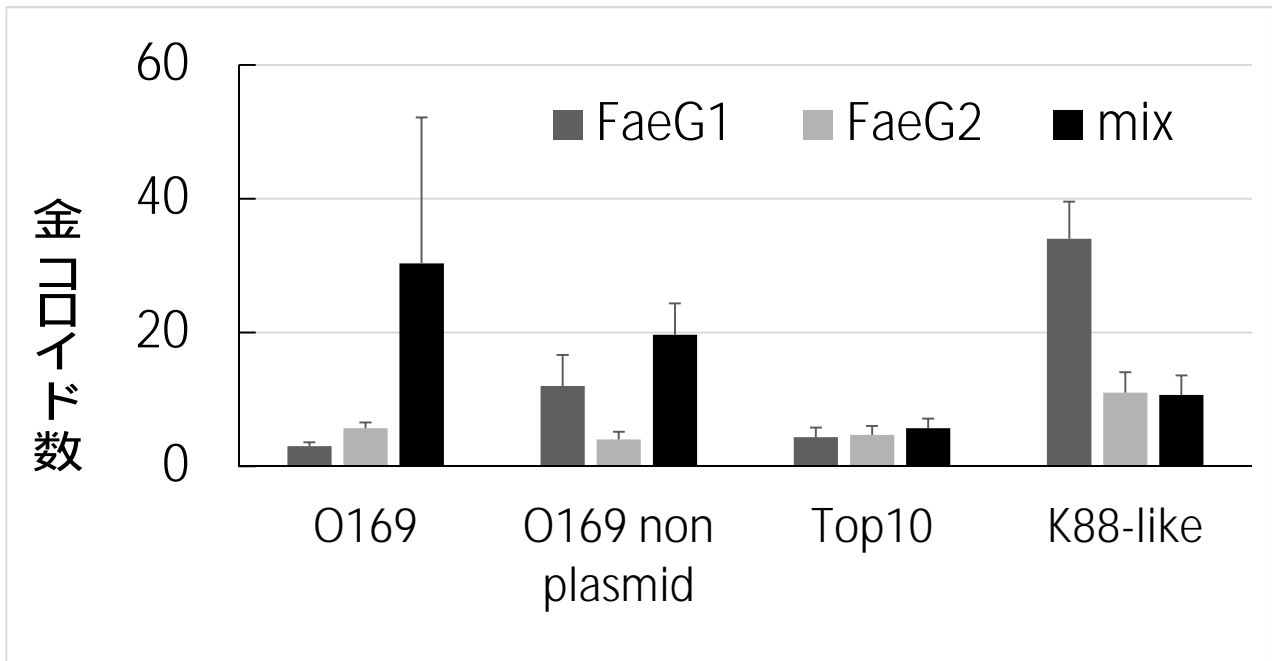


図4. 免疫電顕 金コロイド計数結果 (n=3)
 抗 FaeG1, 抗 FaeG2, 両抗体同時に反応させた結果を示している。