

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460544

研究課題名(和文) 集団食中毒事例で検出された新規Stx2ファージの機能解析と疫学研究

研究課題名(英文) Functional analysis and epidemiological survey of a novel Stx2 phage isolated from the food-poisoning outbreak

研究代表者

綿引 正則 (WATAHIKI, Masanori)

富山県衛生研究所・細菌部・部長

研究者番号：20372104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2011年集団食中毒事例において、腸管出血性大腸菌(EHEC)0111および0157が検出され、一部の重症の患者便からプラーク形成能をもつ型制限修飾遺伝子を保有するStx2ファージが回収された。型制限酵素の遺伝子を破壊したStx2ファージを作製し、解析したところ、EHEC0111およびEHEC0157の共存下で、型制限酵素が毒素産生を促進することを示唆する結果を得た。また、Stx2ファージの食品検体等から検出を試みたが検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) 0111 and 0157 were detected in the food-poisoning outbreak case in 2011, and Stx2 phages carrying a type II restriction(R)-modification (M) gene were also detected in some severe patient feces and the lysate from EHEC0111. To elucidate relation of the function of R gene and some pathogenicity of the outbreak, Stx2 phage with R gene disrupted was prepared for functional analysis of the gene. It was suggested that R gene promotes Stx2 production in the presence of EHEC 0111 and 0157. Therefore, Stx2 phage with RM gene is considered to be a key player in the outbreak. Finally, in surveillance of Stx2 phage contamination in some food specimens, Stx2 phage was not detected.

研究分野：基礎医学 細菌学 遺伝・ゲノム情報

 キーワード：食中毒 腸管出血性大腸菌 EHEC 0111 EHEC 0157 Stx2ファージ 型制限修飾酵素 遺伝子破壊
 ファージ疫学

1. 研究開始当初の背景

2011年、焼肉チェーン店を原因施設とする腸管出血性大腸菌(EHEC)O111:H8(O111)及びO157:H7(O157)による集団食中毒が富山県を中心として発生した(以下、「2011 集団食中毒事例」という)。この食中毒事例で分離されたEHEC O111と患者便から分離された志賀毒素(Stx2)をもつStx2 ファージの解析から、このファージのレプレッサー遺伝子(ファージの *cI* 遺伝子に相当)の下流に制限酵素 *PstI* の認識配列 CTGCAG を認識する型制限(R)修飾(M)酵素遺伝子 *BsuBI* の構造と極めて類似した配列が存在し、これらの遺伝子はともに発現し、機能していることを明らかにした(第87回日本細菌学会総会、東京、2014)。同年、ドイツを中心として発生したEHECO104による、多数の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者を数えた食中毒事例が発生したが、このドイツの事例で分離されたStx2 ファージの構造も、我々が分離したStx2 ファージの構造と極めて類似していた。この二つの事例では、前者ではHUS患者34名、内死亡5名、後者は、HUS患者3,814名、内死亡54名という被害者を数え、既にドイツの事例では、ゲノム配列等報告され、このRM遺伝子を含むStx2 ファージ(Stx2RM ファージ)であることが報告されているものの、このRM遺伝子に関しては一切触れられていない。従って、この二つの食中毒事例にこの遺伝子がどのような役割を果たしているのか不明のままある。

我々は、2011 集団食中毒事例に於いて分離されたEHEC O111は、機能性RMを保有するStx2 プロファージを保有し、この食中毒事例に何らかの役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌の病原性の主要な要因であるStx2は、ファージゲノム中の後期発現蛋白質の発現様式に連動しており、プロファージ誘導と伴って産生されることが知られている。本食中毒で分離された複数のStx2 ファージは、他の大腸菌に感染する能力を有しており、Stx2 変換ファージであった。本食中毒では、EHECO111とEHECO157が分離されており、二種類のEHECが検出された複数の重症患者が存在することから、お互いのStx2 ファージが相互に感染した可能性を、Stx2 ファージや分離株のStx2 プロファージの構造解析から示唆した(第19回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、東京)。また、本食中毒では、EHECが全く分離できない重症患者の存在など、これまでの知識では説明できない現象を経験していた(1)。そのため、EHECO111株のStx2 ファージに存在していたRM遺伝子が本食中毒に何らかの影響を与えていると我々は考えた。以上のことから本研究は、RM遺伝子を破壊したノックアウト

株を作製し、イン・ビトロでその効果を検討し、今回の食中毒を細菌学的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌、培養

2011 食中毒事例で分離された腸管出血性大腸菌 O111 より分離された Stx2RM ファージを溶原化した大腸菌 K-12 由来 C600 株 (*E.coli* ICN946) をノックアウト株作製の供試菌とした。また、Stx2RM ファージの指示菌として、*E.coli* C600 株を用いた。

(2) 型制限修飾酵素遺伝子を含む Stx2 ファージ (Stx2RM ファージ) の制限酵素遺伝子の破壊

大腸菌の標的遺伝子の破壊には、TargeTron[®] Gene Knockout System、pACD4 TargeTron Vector Set 及び TargeTron Vector pAR1219(シグマ・アルドリッチ・ジャパン)を使用した。

(3) Stx2 ファージ液の調製と Stx2 産生量の定量

Stx2 のファージ液の調製は、*E.coli* C600 を宿主とした Stx2 ファージの溶原菌の新鮮コロニーを、マイトマイシン C (MMC) を 0.5 µg/mL 濃度で含む LB 培地 (Select APS LB プロス、日本ベクトン・ディッキンソン) 2mL に OD600nm=0.5 に懸濁し、37 °C にて 6 時間培養後の遠心上清を 0.22 µm でフィルター濾過した濾液をファージ液とした。このファージ液のプラーク形成能の定量には、希釈液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgSO₄, 0.01% gelatin) にて段階希釈を行い、*E.coli* C600 株を指示菌として、平板重層法にてプラークを計数して、ファージ液のプラーク形成能 (pfu, plaque-forming unit/mL) を決定した。

(2) 食品及び牛肉加工工場のドリップ中の Stx ファージの検出

食品検体は、汚染実態調査のため当所に搬入された 79 検体の食品と牛肉加工工場加工中に発生するドリップ 240 検体を用いた。

食品検体は秤量後、PBS にて 10 倍乳剤とし、その 1mL を、またドリップは解凍後、1mL を 15,000 回転で 5 分遠心上清をスタート検体とした。この遠心上清は 0.45 µm フィルター濾過した 0.1mL を、TSB1mL と *E.coli* C600 を混合し、一晚培養、その遠心上清を 0.22 µm フィルター濾液を PEG-NaCl 溶液を添加し、混合後、4 °C で一晚静置した。15,000 回転、5 分遠心後、沈殿を 100 µL の希釈液に懸濁し、検体とした。

4. 研究成果

(1) 型制限酵素遺伝子を含む Stx2 ファージの制限酵素遺伝子の破壊

制限酵素遺伝子をノックアウトするための再ターゲットプラスミドの構築

今回、遺伝子破壊する遺伝子として、制限酵素と修飾酵素遺伝子の2つを想定するため、2回の遺伝子破壊操作を必要であった。一般的にはノックアウト株を選択するために使用する抗生物質耐性マーカーがそのまま残ってしまうため、抗生物質耐性マーカーが残らない方法を選択する必要がある。そのため、制限酵素遺伝子のノックアウトのために我々は抗生物質マーカーの残らない方法を提供する TargeTron® Gene Knockout System (本システム) pACD4 TargeTron Vector Set 及び TargeTron Vector pAR1219 を使用した。

このシステムは、乳酸連鎖球菌由来のグループ II イントロンの配列特異的な挿入機能 (再ターゲット) を利用して、標的遺伝子に特異的にイントロン配列を挿入することにより遺伝子破壊する。そのため、先ず、

型制限酵素及び修飾酵素遺伝子にイントロンを挿入するためのイントロン発現プラスミドを構築した。具体的には、本システムに含まれるイントロンを再ターゲットするために、3種類の特異的プライマーを、Web サービスを利用して設計した。このプライマーを用いて再ターゲットするための遺伝子特異的な DNA 断片 (~350bp) を PCR により調製、HindIII および BsrGI で消化し、その遺伝子断片を本システムに含まれる TargeTron Vector pACD4-C にサブクローニングし、型制限酵素遺伝子用として pACD4-R519 および修飾酵素遺伝子用として pACD4-M399 を構築した (図 1)。プラスミド pACD4-R519 及び pACD4-M399 は、それぞれ型制限酵素遺伝子及び修飾酵素遺伝子をターゲットするイントロン発現プラスミドである。どちらのプラスミドもクロラムフェニコール耐性で選択可能である。

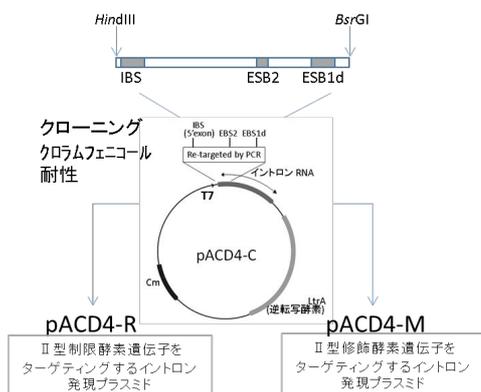


図 1. 標的遺伝子を破壊するための再ターゲットプラスミドの作製

本システムを使って再ターゲットするためには、イントロンを発現させるために、T7 RNA ポリメラーゼ (T7RNAP) が必要である。従って、T7RNAP を発現するプラスミド pAR1219 を同時に導入 (形質転換) する必要があるが、今回の標的遺伝子である型制限酵素遺伝子は制限酵素 *PstI* のアイソシゾマー (認識配列 CTGCAG と同じ特異性を有する酵素) であり、プラスミド pAR1219 中に一か所の *PstI* 部位が存在しているため、*E. coli* ICN946 の形質転換時にプラスミドは分解されて形質転換効率が極めて低いことが予想された。そこで、プラスミド pAR1219 中の *PstI* を除去したプラスミド pAR1219Pst- を構築した。本プラスミドは、アンピシリン耐性で選択可能である。

次に *E. coli* ICN946 に、プラスミド pACD4-R519 およびプラスミド pAR1219Pst- を同時に形質転換し、本システムのプロトコルに従い、再ターゲットを行った。最終的なスクリーニングでは、得られたこのコロニー 719 個から、クロラムフェニコール及びアンピシリン感受性のコロニーを 68 個選択し、制限酵素遺伝子内に約 1kb の配列が挿入されているかを PCR で調べたところ、1コロニーが目的のクローンであった。これを *E. coli* R519-2217 と命名した。この株の Stx2RM プロファージ部分の制限酵素遺伝子部分の塩基配列を調べたところ、予想通り TargeTron Vector pACD4-C 由来のイントロン配列が挿入されていることを確認した (図 2)。

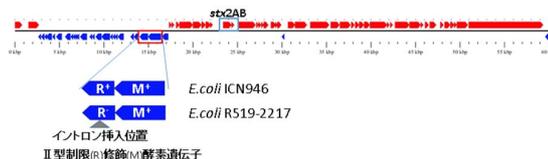


図 2. 大腸菌 ICN946 (R+M+) と大腸菌 R519-2217 (R-M+) の Stx2 プロファージ構造とノックアウトされた制限酵素遺伝子の模式図

E. coli ICN946 と *E. coli* R519-2217 から Stx2 ファージ液の調製

制限修飾酵素遺伝子の R+M+ である *E. coli* ICN946 と R-M+ である *E. coli* R519-2217 の新鮮コロニーから、MMC を含む 2mL の LB 培地で培養し、溶原化しているプロファージを誘導し、ファージ液を調製した。最終的には、*E. coli* ICN946 から 4.0×10^8 pfu/mL の Stx2 (R+M+) ファージ液、及び *E. coli* R519-2217 から 4.5×10^8 pfu/mL の Stx2 (R-M+) ファージ液が得られた。得られたファージ液を用いて、制限酵素遺伝子領域の PCR を行ったところ、Stx2 (R-M+) ファージ液を用いたときの PCR 産物は Stx2 (R+M+) ファージ液の PCR 産物よりも約 1kb 長く、イントロンが挿入されていることを確認した。

(2) Stx2 (R+M+) ファージ及び Stx2 (R-M+) フ

ファージを *E. coli* C600 株に感染させたときの毒素産生

Stx2 ファージを大腸菌に感染させると溶菌する菌と溶原化する菌の2つに分かれる。事実、今回のファージを *E. coli* C600 に感染させて、プラークを形成させ、そのプラークを白金線でプラーク内の大腸菌を分離すると、容易に Stx2 ファージが溶原化した大腸菌を分離することができる。また、プラークを形成することから、溶菌する菌も存在しており、その際、Stx2 毒素を放出していると推定される。そこで、今回、作製した制限酵素をノックアウトした Stx2(R-M+) ファージと野生型制限酵素が機能している Stx2(R+M+) ファージを感染させたときの培地中に放出される Stx2 毒素を定量することにより、制限酵素が毒素産生に及ぼす影響を調べた。

E. coli C600 の新鮮コロニーから、対数増殖期である OD600nm=0.5 を調製し、 1×10^6 pfu/mL に調整した Stx2(R+M+) ファージ及び Stx2(R-M+) ファージ液を用いて、MOI (multiplicity of infection, ファージを細胞に感染させたときの、1つの細胞に感染するファージ数の平均値) 1.2×10^{-4} 、 1.2×10^{-3} 及び 1.2×10^{-2} で各3本の試験管を用いて感染させ、37℃、OD600nmのODを継時的に記録し、20時間まで培養した(図3)。その結果、いずれの条件でも、生育曲線には差が見られなかった。培養後の培養液の遠心上清を0.22µmのフィルター濾液し、Stx2毒素量を定量した。その結果は、図4に示した。この結果から、いずれのMOIでも、Stx2(R-M+) ファージを感染させたときに約4管(16倍)ほど、Stx2(R+M+) ファージを感染させたときよりも毒素産生が低下していた。

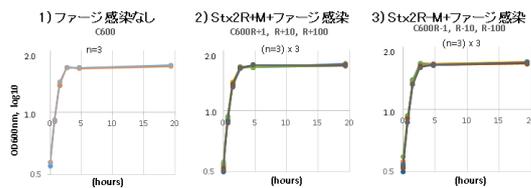


図3 .Stx2 感染実験時の宿主大腸菌 C600 の生育曲線 1) ファージ感染なし 2) R+M+ ファージ感染 3) R-M+ ファージ感染

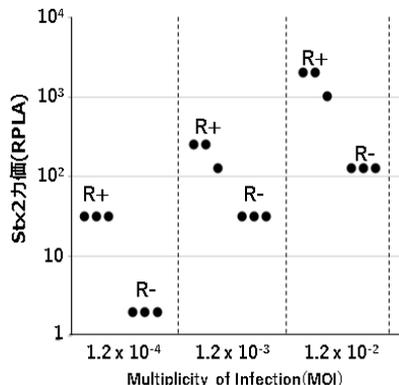


図4 . Stx2 ファージ感染による毒素産生量

2011年の集団食中毒事例の、複数の重症患者(血便、HUS、脳症)から、EHEC O111とEHEC O157を全く分離できなかった患者、どちらか一方、あるいは共に分離される患者があり(1)、Stx2 ファージの解析から、1株のEHEC O111と10株のEHEC O157分離株で、Stx2 プロファージが2コピーあることが判明した。その構造を解析したところ、大腸菌染色体の挿入部位 *argW* のプロファージはRMを持っており、もう一方の挿入部位 *wrbA* では持っていなかった(第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会、東京)。また、複数のEHECがまったく分離されなかった重症患者の便を含む複数の患者便から、Stx2RM ファージが検出されていること、分離されたEHEC O111から、MMC処理で同じくStx2RM ファージが検出されていることから、今回の食中毒事例の重症患者の消化管内で、EHEC O111とEHEC O157からStx2 ファージが放出され、相互にStx2 ファージが再感染し、このことが、毒素産生に寄与していることが示唆された。ここで、EHEC O111から放出されるStx2RM ファージで、感染した大腸菌(ここではEHEC O157)細胞内で発現した制限酵素が、宿主ゲノムに存在する *PstI* サイトを認識、切断することで宿主は死に至ると予想される。この現象は食中毒事例で観察された、EHECがまったく検出されない複数の重症患者がいたこととの関連を示唆している可能性がある。

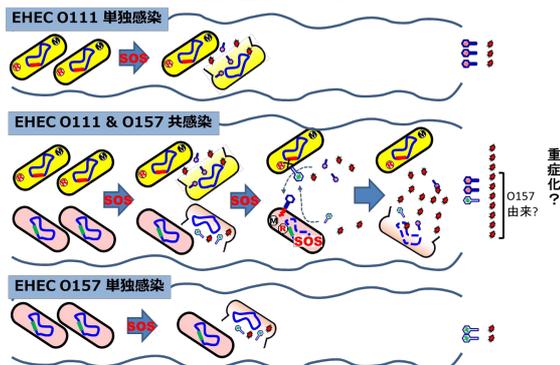


図4 . 患者消化管内で EHEC O111 と EHEC O157 の共感染時の作業仮説

EHECによる重症化要因としてもっとも重要な因子は毒素であるStx2である。今回の食中毒の重症化要因もStx2が関連していると考えられるが、死亡した患者のほとんどは発症から死亡まで極めて短時間であり(～5日程度)大量のStx2が放出された可能性が議論されていた。しかし、分離されたEHECによるMMCによる毒素産生性は、これまで報告されている他のEHECに比べて大量発現株というわけでもなく、Stx2毒素もその塩基配列から、Stx2aと呼ばれる型と同一であり、特に毒性の高いStx2ではなかった(5)。従って、2つのEHECの同時摂取とStx2ファージの再感染が毒素産生にどのように関与しているのか、申請者の注目したところである。特に申請者は、Stx2RMファージのRM遺伝

子の機能に注目した。制限酵素は、基もとの機能は、外から侵入しているファージやプラスミドの増殖を配列特異的な酵素を持つことにより、その増殖を「制限」する機能を担っている。しかし、2011 集団食中毒事例では Stx2RM ファージが、EHEC0157 に感染していた可能性が、分離株の解析から示された。このことは、外から侵入してくる役割を担うとされる酵素を保有するファージが他の細菌に感染した時、宿主細胞の挙動は大変興味深い。

EHEC の Stx2 の産生は、Stx2 プロファージの複製と運動していることが知られており、このプロファージ誘導現象は、紫外線や抗生物質による殺菌作用により誘導され、SOS 誘導あるいは SOS 反応と呼ばれている。また、この反応は、DNA の損傷等により、誘導されることが知られており、DNA の切断する活性のある型制限酵素 *EcoRI* は、SOS 反応の誘導作用があることが既に報告されている(3)。従って、我々が今回の食中毒事例で分離した Stx2RM ファージの制限酵素が、食中毒発生時に患者消化管内で、EHEC 0157 に感染し、宿主 DNA の *PstI* 部位を切断し、SOS 誘導を促進させ、尚且つ、外から感染した Stx2RM ファージ中の Stx2 及び EHEC 0157 にもともと存在した Stx2 プロファージと合わせて、大量の Stx2 が放出される可能性を考えていた。そこで、本研究では、この R 遺伝子のノックアウト株を作製して、その機能、特に毒素産生性に与える影響を調べることとした。

今回作成した *E. coli* R519-2217 や、食中毒事例で分離した大腸菌等を様々な組合せで混合して、マイトマイシン C 添加実験を行ったが、毒素産生に対する効果は全く観察されなかった。これは、食中毒事例で分離された EHEC 0157 は、EHEC 0111 や *E. coli* R519-2217 から放出される Stx2 ファージに対してすでに耐性（感染が成立しない）となっている可能性やファージのバーストサイズ（大腸菌 1 細胞から放出されるファージ数のこと）など、MMC で SOS 反応を誘導したときに考慮すべき項目が複数あり、制限酵素による影響と判断できるか、検討すべきことがまだ多いと考えられた。そこで制限酵素の役割を考慮できる簡単な実験系として、*E. coli* ICN946 と *E. coli* R519-2217 から、Stx2 ファージを分離し、このファージを感染することが知られている大腸菌 C600 を用いて、毒素産生量を比較する、実験系を考案した。

この予備実験では、MOI が高いと制限酵素遺伝子機能の有無で、毒素産生量の差が見られなかったため、低い MOI で感染させることにより、大腸菌 1 細胞に 1 ファージ粒子感染させ（図 3、培養中、溶菌による濁度の低下がみられない条件）希釈系列に応じて毒素産生が直線的に変化する条件下、制限酵素遺伝子機能の有無による比較を行った。制限酵素遺伝子をノックアウトしたファージを感染させたところ、蓄積した培地中の毒素量は

減少し、Stx2(R+M+)ファージを感染させたときの毒素量と比較して、平行して減少していた（図 4）。この毒素量の差は、感染した大腸菌内で発現した制限酵素が、大腸菌ゲノム配列中に存在する *PstI* 配列で切断し、SOS 反応を誘導した結果であることが示唆していると考えた。

今回の実験の精度は、大腸菌の菌数は予め同条件の培養実験で、OD_{600nm} の濁度と生菌数（コロニー形成能）の関係を調べ、大腸菌 C600 で計数した Stx2 ファージのプラーク形成能により、MOI を算出しており、実験場の誤差が存在している可能性は残っている。従って、この実験の精度については、まだ、様々な角度から検証する必要があるかも知れない。今後の問題として、検証していきたい。

(3) 食品及び牛肉加工工場のドリップ中の Stx ファージの検出

Stx2 プロファージ中に RM 遺伝子を持つ EHEC は、本食中毒事例の発生した同年、ドイツで発生した 0104 による大規模な食中毒事例で分離された Stx2 ファージ中にも RM が存在し、その配列から制限酵素 *PstI* のアイソシゾマーであることが既に述べた。その後、EHEC 0157 から *PstI* のアイソシゾマーと思われる RM を保有する同様の Stx2RM ファージが報告された(4)。従って、Stx2RM ファージは、既に広く世界に広がっている可能性があり、今回、食品中の Stx2RM ファージの検索を行った。食品からの Stx2RM ファージの検索方法は、広く一般的な方法はないので、予備実験として、当所に汚染実態調査目的で搬入される食品から検出を試みたところ、その 10 倍乳剤からは大腸菌 C600 を指示菌として、プラークは検出することは不可能であった。そこで、10 倍乳剤の 0.22 μm フィルターの濾液を大腸菌 C600 と混合し、一晚培養した上清をファージ検出の出発材料とした。しかし、79 検体からはプラークを検出することはできなかった。

そこで、大手の食肉加工工場から検査工程の EHEC 検査用ドリップ 240 検体の提供を受け、プラーク形成能を指標にスクリーニングを行い、そのうち 29 検体からプラークを検出した(図 5)。これらのプラークについて、Stx1 及び Stx2 遺伝子をとともに検出するプライマーを用いて、PCR を実施したが、陽性となる検体は見つけることが出来なかった。また、Stx 遺伝子の PCR はすべて陰性であったので、RM 遺伝子検出の PCR は実施しなかった。

(4) 結語

本研究の目的は、EHEC 0111 と EHEC 0157 が検出された 2011 集団食中毒事例(1,2)を、分離された EHEC を用いて細菌学的に解明することである。この食中毒の特徴として RM 遺伝子を持つ Stx2 ファージを複数の臨床検体、分離株から検出し、本食中毒事例で何らかの役割をしていることが予想された。本食

中毒事例から検出された Stx2RM ファージは、Stx2 変換ファージとしての性質を有している。単独感染では産生されている制限酵素が毒素産生を増大させることはないが(5)、本研究において、このファージに感受性を示す細菌とともに摂取すると、消化管内で放出された Stx2RM ファージが再感染した場合、制限酵素による SOS 反応の誘導により、毒素産生の増大、結果的には重症化する可能性があることが示唆された。これは新しい制限酵素の機能の一つとして、重要な発見であり、病原細菌としての EHEC の新しい特徴となるか、今後様々な検証が必要であると思われる。

今回の研究では、RM 遺伝子の遺伝子破壊実験を計画し、毒素産生の増大に関する実験ということで、遺伝子組換え実験の大臣申請に相当するかどうかの判断で時間を要した。このため、遺伝子破壊実験が予定より遅れたこと、さらに遺伝子組み換え実験において必要な、大腸菌の形質転換実験が、制限酵素を発現している宿主を対象とするなど、その効率の低い実験を強いられた。そのため、制限酵素のノックアウト株のみしか、本研究期間では作成できなかった。しかし、この Stx2(R-M+) ファージあるいはその溶原菌である *E. coli* R519-2217 は、制限酵素と毒素産生の関係を解析するための貴重な株であり、本研究の大きな成果である。今後、Stx2RM ファージを用いた精度の高い解析を行い、報告していきたい。

今回、Stx2RM ファージのサーベイランスを食品や食品加工工場施設でサンプリングされた検体(ドリップ)により実施した。しかし、Stx2 ファージの検出には至らなかった。しかし、最近、EHEC 0157 の Stx2RM ファージ(4)と Stx1RM ファージの報告(6)もあることから、RM を持つ Stx ファージが拡散している可能性があり、今後注視する必要があると思われる。

<引用文献>

(1) Watahiki, M., Isobe, J., Kimata, K., et al. (2014) Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 Strains Isolated from Outbreak Patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 52:2757-2763.

(2) Yahata, Y., Misaki, Y., Ishida, M., et al. (2015) Epidemiological analysis of a large enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111 outbreak in Japan associated with haemolytic uraemic syndrome and acute encephalopathy. *Epidemiol Infect.* 20:1-12.

(3) Heitman, J., Zinder, N.D., Model, P. (1989) Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the *EcoRI* endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 2281-2285.

(4) Yin, S., Rusconi, B., Sanjar, F., et al. (2015) *Escherichia coli* O157:H7 strains

harbor at least three distinct sequence types of Shiga toxin 2a-converting phages, *BMC Genomics* 16:733

(5) 「EHEC/O111 食中毒事例における疫学・細菌学・臨床的研究」平成 23 年度総括・分担研究報告書(研究代表 佐多徹太郎)厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業、(2012)、p113.

(6) DDBJ Accession No. KR781488

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

なし

[学会発表]

なし

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

綿引 正則 (WATAHIKI Masanori)

富山県衛生研究所・細菌部・部長

研究者番号：20372104

(2)連携研究者

磯部 順子 (ISOBE Junko)

富山県衛生研究所・細菌部・副主幹研究員

研究者番号：10421893

木全 恵子 (KIMATA Keiko)

富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員

研究者番号：50360805