

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249038

研究課題名(和文)世界的に重要な腸管病原性細菌を食品から容易に定量検出できる高感度法の開発

研究課題名(英文)Development of easy, sensitive, and quantitative detection methods for enteric pathogens of world importance from food

研究代表者

西淵 光昭(Nishibuchi, Mitsuaki)

京都大学・東南アジア研究所・教授

研究者番号：50189304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸炎ビブリオでは、免疫磁気ビーズ法および遺伝子検査法としてLAMP法を採用し、病原性(tdhまたはtrh遺伝子陽性)株を魚介類から高感度・簡便・迅速に定量検出する方法を確立した。乾燥タイプLAMP試薬は、熱帯地域でも保管・移動が可能で、結果判定に煩雑な電気泳動法を不要にしたことをアジアや南米の発展途上国7カ国において実地検証した。trh遺伝子陽性株では、環境株に高頻度塩基置換による溶血活性陰性化を多数発見したので、LAMPプライマーの調整による完成化にとりかかった。腸管出血性大腸菌については、一度の検査で世界的に重要な12種のO型抗原型菌を牛肉から検出できる同様な定性検査法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We have established a sensitive, easy, rapid, and quantitative method by incorporating an immunomagnetic method and a genetic method so-called the LAMP method to detect pathogenic (tdh- and/or trh-positive) strains of *Vibrio parahaemolyticus*. We demonstrated the dried-type LAMP reagent made possible the maintenance and transportation of the reagent and eliminated the need for gel electrophoresis to judge the result in the workshops held in seven developing countries in Asia and South America. We found loss of hemolytic activity of the trh gene product due to frequent base substitutions in this gene of environmental strains, and thus we are adjusting the LAMP primers for this gene to improve this detection method.

Regarding the enterohemorrhagic *Escherichia coli*, we developed a similar qualitative detection method for the strains belonging to 12 important O serotypes in the world from beef at once.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ 腸管出血性大腸菌 免疫磁気ビーズ法 LAMP IMS

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、これまでの基盤研究において、3種の重要な腸管病原性細菌(腸炎ピブリオ、腸管出血性大腸菌 [以下 EHEC と略す] O157、およびコレラ菌)の病原性株・非病原性株が、アジアの発展途上国の環境中に分布し、頻度は低いが、病原性株が食品の輸出入を介して国境を越えてアジア内外に移動していることを明確に示した。特に、腸炎ピブリオについては、二枚貝の輸出入を介して病原性株が国境を越え、世界レベルでの大流行をおこしていることを明らかにして、FAO/WHO による魚介類中の病原性ピブリオ属細菌種のリスクアセスメントの開始を促した。

(2) 輸出入食品の安全性評価には、必要以上に厳しい基準を設定しないようにするために、定量リスクアセスメント(どれぐらいの菌量までなら大丈夫)が必要である。しかし、食品中の食中毒菌の定量データが乏しいため、定量リスクアセスメントはまだほとんど普及していない。定量データ欠乏の理由は、関係者が納得できる標準定量検査法が確立されていないからである。タイ国内で人気があり、また輸出入商品でもあるハイガイ (*Anadara granosa*) 中の腸炎ピブリオの病原性株について、かつて研究代表者が定量リスクアセスメントを実施した。このような熱帯地域には、リアルタイム PCR 解析装置が使用できる環境はなく、一般的な最確数 (most probable number [MPN]) 法と PCR 法を組み合わせた検査法により目的菌の定量検出を実施した。この方法は感度が低くかつ操作が煩雑なので、大変苦労をした。後に実施した予備的研究において、MPN 法に免疫磁気分離 (Immunomagnetic separation [IMS]) 法の変法および Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法(簡便かつ高感度な DNA 増幅・検出法、)を組み込むことにより操作が簡便になり、かつ感度が良くなることが示された。

2. 研究の目的

(1) 本研究の第1目的は、上記3菌種の病原性株を対象にして、この新しいによって、高感度かつ簡便な定量検査法を確立し、その方法が熱帯地域の発展途上国でも使用可能であることを実証することである。

(2) 第2の目的は、この過程で集積するデータと菌株を解析して、各菌種で早急に回答が必要な病原性に関する重要な疑問に取り組む。すなわち「以下の毒素遺伝子のペアで(前者の遺伝子と後者の遺伝子が、それぞれ患者と環境から頻繁に分離される理由は? : 腸炎ピブリオ *tdh*⁺ 株 vs. *trh*⁺ 株; EHEC O157 vs. non-O157; *Vibrio cholera* O1 vs. O139」

3. 研究の方法

(1) 研究代表者と研究分担者の指導のもと

に、大学院生3名のうち各1名が各菌種を専門に担当し、その菌種について新たな検出法を確立するために積極的に研究に協力する。大学院生は民間の研究協力者から IMS 法および LAMP 法に関して、専門的技術協力を得て、これらの技術をそれぞれの食品サンプル処理に応用するために、それぞれの菌種に適した技術を開発することに協力する。その際必要になる由来が確かな食品サンプルの入手・輸送には、研究協力者の協力を必要とする。連携研究者や研究協力者は専門技術(菌の型別など)も提供する。

(2) 大学院生は、菌の汚染度が低い食品(国内フィールド)および高い食品(国外フィールド)を材料として、従来法および新法による検査に積極的に協力する。地方自治体や国外の大学の研究協力者は食品サンプル入手、サンプル解析用実験室の提供、特殊技術の提供、現地実験補助者の紹介などで協力する。すべての研究参加者は国外のフィールドでの食品サンプルの検査結果の解析にも協力する。新法が従来法よりさらに優れた結果をもたらすように、その都度必要と判断される改良点を新法に追加する。最終的に確立した新法と従来法を国内・国外のフィールドの食品検査に供し、データを蓄積・比較・解析し、新法の優劣を明らかにする。3菌種の毒素遺伝子のペアについて、遺伝子の病原的意義の解明と LAMP 法の改良のために、代表分離株の遺伝子と蛋白を比較・解析。

4. 研究成果

(1) 腸炎ピブリオに関しては、3ステップで研究をすすめて、目標を達成できた。第1ステップで、基本的な定量検査法の第1モデルを作成し、腸炎ピブリオ病原性菌株の二枚貝中に蓄積される濃度(すなわち環境沿岸水中の分布頻度)がそれぞれそれほど高く温帯地域、およびかなり高い熱帯地域の代表として日本(三重県)と国外(タイ南部)で、性能を比較した。さらに発展途上国で実施可能な従来法(PCR法)や先進国ならば、実施可能なリアルタイム PCR 法などと評価(validation)しながら、必要な2地域で性能を比較し、またこの期間中に、発展途上国でのワークショップで、参加者に意見を聞いて、改良を重ねて第2モデルを考案して、さらにこの方法に関する日本(三重県)と国外(タイ南部)の比較実験およびワークショップでのコメントを参考にして、最終法を確立した。

第1モデル: すでに臨床分離株から報告されている69種類のK抗原のそれぞれに対する抗ウサギ抗体10種類前後を混合した多価抗体で磁気ビーズをコーティングして、これらのK抗原を発現する菌を標的とする方法で二枚貝の消化管に濃縮・蓄積した菌の中から、腸炎ピブリオ選択的に分離した。IMS

法を効率良く実施するために、PickPen(磁気を帯びたロッドを8チャンネルのピペッターに組み込んだ装置)および96穴マイクロタイタープレートを活用したことが本研究の特徴の1つである。標的菌の定量のために、目的菌の増菌液をMPN方式で希釈・分配して、試験管に分配した菌液をLAMP法で、標的毒素遺伝子(*tdh/trh*)の有無を調べ、MPN方式で標的菌のオリジナル濃度を推定した。日本とタイにおいて、本法を用いて市販の二枚貝中の*tdh*⁺腸炎ピブリオ菌株の濃度を推定したところ、それぞれ、相当低い値(0.3~11)とかなり高い値(930~110,000)MPN/10gが得られた。タイ南部の貝サンプルは、地方の朝の魚市場で市販されているものであったので、この種の貝は微生物学的リスクに注意を払わねばならないと言える。*tdh*⁺菌を検出するためのLAMP法は幅広い濃度範囲に分布する標的菌を検出できて、検出感度は従来のPCR法に比べて同等かより高感度であった。PickPenを用いたIMS法の有利性は、MPNの値に反映されていた。すなわち、PickPen-IMSは貝の中の*tdh*⁺菌株を32倍濃縮する事に匹敵する作用が確認できた。本研究で確立した方法は、二枚貝中の*tdh*⁺腸炎ピブリオ菌株を定量検出のための世界標準法になりうると考えられた。

第2モデル: 上記第1モデルは腸炎ピブリオおよびその他の菌が高濃度で分布する熱帯の沿岸環境では、*tdh*⁺菌株の濃度を過小評価する可能性があることがわかったので、本モデルでは、この点を改良した。食塩ポリミキシン培養液を用いた増菌段階とPickPen-IMS処理段階において、処理条件を微調整した。さらにDNA増幅酵素を含むLAMP試薬を乾燥標品に差し替えることによって、検査の感度を維持しながら、キットの輸送・保および結果の肉眼判定が可能となったので、図1に示すような究極的なLAMP変法可能であろうと考えられる。



図1. 屋外でも可能な究極的LAMP法

trh 遺伝子検出用 LAMP 法

すでに臨床分離株を試験菌株として、LAMP法を1度確立した。一方で、*trh* 遺伝子にはかなり菌のばらつきが多いことを過去に報告していたので、最近になって、菌の病原性に関わる因子として、*trh* 遺伝子の塩基配列のばらつきが重要であると思われたので、環境分離株を中心に、塩基配列のバラツキと溶血活性が大きく影響していることを明らかにした(対照として、病原性の明確な(溶血性が強い)菌株に特異的な塩基配列を対象と

する LAMP プライマーを設計して、*tdh*用 LAMP 法と組み合わせれば、より病原性株に特化した LMP 法が完成できると確信した。

(2)EHEC: EHEC に関しては、non-0157 O 抗原型が臨床的に重要視されるようになってきたので、それらを標的として含むように IMS 法の標的抗原とする検査法を開発した。世界的には、現在 15 種類の O 抗原型に属する EHEC による症例報告が多い。0157 以外に我が国では 6 種の O 抗原型 (026,091, 0103, 0111, 0121, 0145); その他に世界の他の国では、8 種類 (015, 045, 055, 0104,0113, 0118, 0128, 0153)が重視されるようになってきた。この中で、13 種類に対する抗血清が入手可能であったので、とりあえずこれらを用いて 13 種類の EHEC を同時に標的にした PickPen 方式の IMS 法を採用した。LAMP 法の標的は *stx* 遺伝子である市販の LAMP キット(栄研化学)を採用した。人為的に汚染させた国産牛肉を用いた in vitro 実験の結果、IMS 法および LAMP 法を組み込んで新たに開発した定性検査法の感度は 91 CFU/ml であった。タイおよび日本で市販牛肉を本法で検査したところ、それぞれ、55.4%および 0% のサンプルが陽性を呈した。陽性を呈したタイの牛肉サンプルから分離した菌株(典型的な形状を示したコロニーの中から、PCR 法を用いて *stx* 遺伝子を確認)の O 抗原型を決定したところ、IMS を使用した場合標的とする O 抗原型の菌株 (0103, 0111, 0157) が分離されたのに対し、IMS 未使用の場合に、非標的 O 抗原型の菌株 (071, 0140, 0144) が分離されたことが確認でき、特異性は 100%であることが示された。

したがって、本法は目的にふさわしい定性検査法であると判断した。今後は、増菌培養-MPN 法方式の定量検査方式が本法をベースとする方法に適用できること、および世界の他地域でも標的とする O 抗原型菌が本方法で特異的に検出できることを確認することにより目標を達成できるであろう。

(3)コレラ菌: O 抗原を標的とする IMS が目的に合うように適用できなかった。おそらく、O 抗原の外部に存在するであろうと言われる荚膜様物質(0139 型菌株で顕著)による阻害が原因であろうと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

Escalante-Maldonado, O., A. Y. Kayali, W. Yamazaki, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2015. Improvement of the quantitation method for the *tdh*⁺ *Vibrio parahaemolyticus* in molluscan shellfish based on most-probable-number,

immunomagnetic separation, and loop-mediated isothermal amplification. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2015.00270.

New, C. Y., H. K. Kantial, M. T. H. Tan, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and R. Son. 2014. Consumption of raw oysters: A risk factor for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Int. Food Res. J.* 21(6):2459-2472.

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, V. Vuddhakul, K. Seto, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2015. Development of a method for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Immunol. Immunother.* 2(1):1-7.

Kongrueng, J., N. Tansila, P. Mitraparp, P. Mitraparp-arthorn, M. Nishibuchi, G. J. Vora, V. Vuddhakul. 2015. LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquacult. Int.* DOI 10.1007/s10499-9874-3.

Themphachana, M., Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, K. Seto, P. Rattanachua, K. Singkhamanan, P. Sukhumungoon. 2014. First report in Thailand of a *stx*-negative *Escherichia coli* O157 strain from a patient with diarrhea. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 45(4): 1-9. 2014.

Pannuch, M., Sirikaew, S., Nakaguchi, Y. Nishibuchi, M., Sukhumungoon, P. 2014. Quantification of enteropathogenic *Escherichia coli* from retailed meats. *International Food Research Journal* 21(2): 547-551.

Yingkajorn M., N. Sermwitayawong, P. Palitapongarnpimp, M. Nishibuchi, W. P. Robins, J. J. Mekalanos, and V. Vuddhakul. 2014. *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacteriophages as an indicator in cockles (*Anadara granosa*) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in southern Thailand. *Microbil. Ecol.* 67(4): 849-856. Doi:10.1007/s00248-014-0382-9.

Tanaka, N., Y. Iwade, W. Yamazaki, F. Gondaira, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. 2014. Most-probable-number loop-mediated

isothermal amplification-based procedure enhanced with K antigen-specific immunomagnetic separation for quantifying *tdh*⁺ *Vibrio parahaemolyticus* in molluscan shellfish. *J. Food Protect.*, in press. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-536.

Elexson, N., L. Afsah-Hejri, Y. Rukayadi, P. Soopna, H.Y. Lee, Y.C. Tuan Zainazor, M. Nor Ainy, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, R. Son. 2014. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Food control* 50: 378-385. Doi:10.1016/j.foodcont.2013.07.020.

Elexson, N., Yaya, R., Nor, A. M., Kantilal, H. K., Ubong, A., Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. 2014. Biofilm assessment of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using Random Amplified Polymorphism DNA-PCR. *Int. Food Res. J.* 21(1):59-65.

Thongchan, J., P. Bhoopong, M. Yingkajorn, M. Nishibuchi, V. Vuddhakul. 2013. Total number, virulence genes, and heterogeneity of *Vibrio parahaemolyticus* in a single shellfish. *ScienceAsia* 39:230-235. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.230.

Noorlis, A., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Tuan Zainazor, T. C., Wong, W. C., Tunung, R., Pui, C. F., M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, S. Radu. 2011. Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. *International Food Research Journal* 18:1523-1530.

Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noorlis, A., Tang, Y. H., Sandra, A., Ghazali, F. M., Noranizan, M. A., Lesley, M. B., Hareesh, K. K., Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi and Son, R. 2012. Biosafety of *Vibrio parahaemolyticus* from vegetables based on antimicrobial sensitivity and RAPD profiling. *International Food Research Journal* 19: 467-474.

Thongchankaew U., P. Mitraparp-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.

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): 294-306. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/294>

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.

Lesley, M. B., L. Velnetti, Y. K. Cheah, R. Son, A. Kasing, L. Samuel, V. Micky, and M. Nishibuchi. 2011. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles (*Anadara granosa*) at Tanjung Karang, Kuala Selangor. Int. Food Res. J. 18(3): 1129-1134.

Noorlis, A., F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, T. C. Tuan Zainazor, J. Ponniah, R. Tunung, J. Y. H. Tang, M. Nishibuchi, Y. Nakaguchi, 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.

Sukhumungoon, P., Y. Nakaguchi, N. Ingviya, J. Pradutkanchana, Y. Iwade, K. Seto, S. Radu, M. Nishibuchi, and V. Vuddhakul. 2011. Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. Int. Food Res. J. 18:381-386.

[学会発表](計 17 件)

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, K. Ozawa, F. Gondaira, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important O serotypes by an IMS-LAMP-based method in the retailed beef. 49th US-Japan Conference Cholera & Other Enteric Bacterial Infections. Florida, USA. 2015 年 1 月 14 日-16 日. 口頭発表.

Escalante-Maldonado, O., A. Y. Kayali, S. Yamada, W. Yamazaki, V. Vuddhakul, F. Gondaira, C. Maeda, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Improvement of the IMS-and

LAMP-based Detection Method for Virulent Strains of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood. 49th US-Japan Conference Cholera & Other Enteric Bacterial Infections. Florida, USA. 2015 年 1 月 14 日-16 日. 口頭発表.

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, F. Gondaira, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. Optimization of the LAMP-IMS-based method for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* from beef. 第 88 回日本細菌学会総会. 岐阜県. 2015 年 3 月 26-28 日. ポスター発表.

Escalante-Maldonado, O., A. Y. Kayali, W. Yamazaki, F. Gondaira, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. Improvement of IMS-LAMP-based Detection Method for Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood. 第 88 回日本細菌学会総会. 岐阜県. 2015 年 3 月 26-28 日. ポスター発表.

Escalante-Maldonado, O., A. Y. Kayali, S. Yamada, W. Yamazaki, F. Gondaira, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Development of *trh* gene LAMP primers and establishment of IMS-LAMP based method for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会. 兵庫県. 2014 年 11 月 22 日. 口頭発表.

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, K. Ozawa, F. Gondaira, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Prevalence of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to enterohemorrhagic O serotypes (O157 and non-O157) in the beef marketed in southern Thailand in years 2013 and 2014. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会. 兵庫県. 2014 年 11 月 22 日. 口頭発表.

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, K. Ozawa, F. Gondaira, V. Vuddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Prevalence of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to enterohemorrhagic O serotypes (O157 and non-O157) in the beef marketed in southern Thailand in years 2013 and 2014. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会. 兵庫県. 2014 年 11 月 22 日. 口頭発表.

Nishibuchi, M. Recent understanding and progress in the technologies on the risk of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. 7th international seminar, Indonesian society for microbiology. Padang, Indonesia.

October 13-18th. 2014. 口頭発表.

Escalante-Maldonado, O., A. Y. Kayali, S. Yamada, W. Yamazaki, F. Gondaira, A. Ohshima, V. Uddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Improvement of the immunomagnetic separation (IMS)-and loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based detection method for virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会. 東京都品川区. 2014 年 9 月 24 日 - 25 日. ポスター発表.

Kayali, A. Y., O. Escalante-Maldonado, K. Ozawa, F. Gondaira, A. Ohshima, V. Uddhakul, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. Confirmation of the excellence of the LAMP-IMS-combined detection method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* and of the modified system using a dried reagent mix. 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会. 東京都品川区. 2014 年 9 月 24 日 - 25 日. ポスター発表.

藤井愛音, 國方千菜美, 安田仁, 中口義次, 西瀨光昭, 末澤千草, 奥田潤. 腸炎ビブリオの病原機構の解析 I. 腸管上皮細胞層透過活性と溶血毒遺伝子型との関連性. 第 9 回日本臨床検査学教育学会学術大会. 東京都大田区産業プラザ. 2014 年 8 月 20 日 - 22 日. 口頭発表.

末澤千草, 坂元真美, 藤井愛音, 國方千菜美, 安田仁, 中口義次, 西瀨光昭, 奥田潤. 腸炎ビブリオの病原機構の解析. 腸管上皮細胞層透過活性と TTSS 遺伝子群との関連性. 第 9 回日本臨床検査学教育学会学術大会. 東京都大田区産業プラザ. 2014 年 8 月 20 日 - 22 日. 口頭発表.

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. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. International Centre for Diarrheal Diseases, Dhaka, Bangladesh. 2014 年 2 月 11 日. 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. 招待講演.

Nishibuchi, M. A pandemic of *Vibrio parahaemolyticus* infection: emergence, characteristics and spread of the pathogen and control of the infection. MEDLAB Asia Pacific Conference 2014. Marina Bay Sands Hotel, Singapore. February 20, 2014 年 2 月 20 日. 招待講演.

Nishibuchi, M. Recent developments in seafood safety with respect to *Vibrio parahaemolyticus*. VIBRIO2014. Edingburgh, Sctln. 2014 年 4 月 3 日. 基調講演.

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*. Peru-NIH, Lima, Peru. 2013 年 11 月 26 日. 招待講演.

〔その他〕

ホームページ:

http://www.cseas.kyoto-u.ac.jp/about/staff_all/division1/nishibuchi/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西瀨 光昭 (NISHIBUCHI Mitsuaki)
京都大学・東南アジア研究所・教授
研究者番号: 50189304

(2) 研究分担者

中口 義次 (NAKAGUCHI Yoshitsugu)
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号: 70378967

(3) 連携研究者

勢戸 和子 (SETO Kazuko)・主任研究員
大阪府立公衆衛生研究所
研究者番号: 70211323