

200904001A

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)

グローバル化する細菌性下痢症を征圧するための多角的研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西瀨 光昭

平成 22(2010)年 3月

目次

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）

1. 平成 21 年度総括研究報告書

グローバル化する細菌性下痢症を征圧するための多角的研究・・・・・・・・・・1

代表研究者 西渕 光昭 京都大学東南アジア研究所教授

2. 平成 21 年度分担研究報告書

1) 診断法（病原菌の検出）に関する研究成果

[腸管感染症原因細菌全体・遺伝子レベルでの臨床診断]

(1) 次世代シーケンサを用いた細菌性下痢症の解析・・・・・・・・・・15

研究分担者 飯田 哲也 大阪大学微生物病研究所特任教授

(2) 下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の作成に関する研究・・・・・・・・・・20

研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学教授

[腸管出血性大腸菌・食品からの菌の検出法]

(3) 食品を対象とした下痢症起因菌の試験法に関する研究・・・・・・・・・・24

研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター参事研究員

[コレラ菌・“新型”菌株の遺伝学的検出法と分子疫学]

(4) 病原性 *Vibrio cholerae* の新規検出法の開発に関する研究・・・・・・・・・・30

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

2) 病原性に関する研究成果

[赤痢菌・病原性発現メカニズム]

(1) 赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御に関わる因子の研究・・・・・・・・・・37

研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所副所長

[腸管出血性大腸菌・病原性の解明]

(2) 腸管出血性大腸菌が産生する SubAB の作用機構に関する研究・・・・・・・・42

研究分担者 野田 公俊 千葉大学大学院医学研究院教授

[サルモネラ属菌・病原性]

(3) サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析に関する研究・・・・・・・・・・47

研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学教授

[*Providencia alcalifaciens*・病原性]

(4) *Providencia alcalifaciens* の病原性に関する研究・・・・・・・・・・53

研究分担者 山崎 伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授

3) 治療に関する研究成果

[腸管出血性大腸菌・治療と臨床診断]

(1) 腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の治療に関する研究・・・・58

研究分担者 藤井 潤 九州大学大学院医学研究院准教授

4) 疫学に関する研究成果

[カンピロバクター・分子疫学と病原性]

(1) 鶏肉を介する下痢症関連菌の分子診断と分子疫学・・・・・・・・・・76

研究分担者 山本 達男 新潟大学大学院教授

[腸管出血性大腸菌・分子遺伝学と分子疫学]

(2) 腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明・・・・・・・・・・85

研究分担者 林 哲也 宮崎大学教授

5) 病原菌の生態学に関する研究成果

[ヘリコバクター・ピロリ・生態学と病原性]

(3) ヘリコバクター・ピロリのバイオフィルム形成に関する研究・・・・92

研究分担者 神谷 茂 杏林大学教授

6) 感染予防法に関する研究成果

[コレラ菌・ワクチン開発]

(1) 粘膜ワクチンアジュバントに用いるコレラ毒素の大腸菌過剰発現系の作製・・・・・・・・・・98

研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学教授

3. 研究発表一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・104

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）
グローバル化する細菌性下痢症を征圧するための多角的研究
（H21-国医-指定-001）

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者： 西淵光昭 京都大学東南アジア研究所教授

平成 22 年 3 月

研究要旨：

本研究においては、グローバル化かつ多様化しつつある主要な細菌性下痢症の現状を掌握し、効果的な治療法・予防法の確立に資するために、重要な腸管感染症原因細菌について、それぞれのエキスパートが、現在最も必要と考えられる問題点に焦点を絞って研究を展開した。すなわち、コレラ菌については、“新型”菌株の検出法と分子疫学およびワクチン開発、腸管出血性大腸菌では菌の検出法・病原性・治療と臨床診断、カンピロバクターでは分子疫学と病原性、赤痢菌では病原性、サルモネラ菌では新たな毒素、*Providencia alcalifaciens* では病原性、ヘリコバクター・ピロリでは生態学と病原性、腸炎ビブリオでは世界的に流行している新型クローンの疫学、および下痢症原因細菌全般を対象にした網羅的検査法などについて新たな学術的知見が得られ、実用的な技術開発も行われた。これらの成果は、学会発表や論文発表を通して世界を対象に発信され、また一部については特許申請が行われた。

分担研究者：

飯田 哲也：大阪大学微生物病研究所
特任教授

江崎 孝行：岐阜大学教授

甲斐 明美：東京都健康安全研究セン
ター参事研究員

大澤 朗：神戸大学教授

渡邊 治雄：国立感染症研究所副所長

野田 公俊：千葉大学大学院医学研究
院教授

倉園 久生：帯広畜産大学教授

山崎 伸二：大阪府立大学大学院生命
環境科学研究科教授

藤井 潤：九州大学大学院医学研究
院准教授

山本 達男：新潟大学大学院教授

林 哲也：宮崎大学教授

神谷 茂：杏林大学教授

辻 孝雄：藤田保健衛生大学教授

A. 研究目的：

国内外での細菌性下痢症の主要原因菌には変化が見られ、グローバル化の傾向が認められる場合や先進国と途上国とで違いが認められる場合がある。地域によって感染症の発生状況に差が認められる場合でも、人々の活動が益々グローバル化する今日、細菌性下痢症の発生様式もその影響を免れないと考えられる。したがって、我が国は途上国や他の先進国と協力して、グローバル化かつ多様化する細菌性下痢症の現状を掌握し、現在最も必要と思われる効果的な治療法・予防法の確立に関連する研究を多角的に展開する必要がある。本研究では、我が国で細菌性下痢症研究分野の第一線で活躍している研究者が、それぞれの専門性を生かしてこれらの重要な緊急課題に取り組む。すなわち、感染症の診断および環境・食品の汚染を掌握するための菌の検出法の開発、治療の基礎となる病原性機構の解明、予防法を確立するための研究（生態学[環境・食品中の菌の分布等]、感染症の疫学、および効果的なワクチン開発）を研究対象分野とし、できるだけ多くの重要な下痢症原因細菌種（コレラ菌、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、赤痢菌、サルモネラ菌、*Providencia alcalifaciens*、ヘリコバクター・ピロリ、腸炎ビブリオ、および [菌の検出法の開発では] 下痢症原因細菌全般）をカバーするように研究を進める。

B. 研究方法：

それぞれの研究内容に適した手法（分子遺伝学、分子疫学、細胞化学、免疫学、環境生態学、生理学、病理学など）を用いて、研究が遂行された。病原性細菌はそれぞれのセイフティレベルに合致した実験施設で取り扱い、菌の移動や分与は規則に従って行われた。動物実験は、動物に不要な苦痛を与えないように配慮し、それぞれの研究者の所属する機関の倫理規定を遵守した。人体に由来するサンプルを取り扱う場合は、所属機関の倫理委員会の承認を得て、規定に従って実験を実施した。

C. 研究結果：

1) 診断法（病原菌の検出）に関する研究成果

[腸管感染症原因細菌全体・遺伝子レベルでの臨床診断]

(1) 次世代シーケンサを用いた細菌性下痢症の解析：

本研究では、急性下痢症患者より得られた糞便検体から直接細菌ゲノムDNA抽出し、得られたDNAを次世代シーケンサでハイスループットにゲノム配列の決定・解析をすることにより、細菌性下痢症の迅速診断法を構築することが可能であることを示した。また配列データを解析することにより患者糞便中に存在する細菌（病原細菌を含む）の検出を行い、細菌性下痢症の発病過程における病原菌と腸内細菌叢の動態について解析を行った。

起病菌が判明している急性下痢症由来の糞便検体を用いた場合、いくつかの検体において、従来法で検出されていた病原体（起病菌）が dominant に検出された（成功例）こともあったが、従来法によって下痢原因菌が検出されているにもかかわらず、本法では当該病原体の配列が見いだされない（あるいは対照と同程度数しか検出されない）検体もみられた（失敗例）。この一因として現在の次世代シーケンサのパフォーマンス（解析配列数）が不十分であることが考えられる。あるいは、今回糞便検体からの DNA 抽出に用いた方法（QIAamp DNA Stool Mini kit）が、特定の病原体の DNA 抽出には適していないことが考えられる。したがって、今後改良の余地があると言える

(2) 下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の作成に関する研究：

研究分担者は、感染症の迅速・簡便な診断法を目指して研究を実施してきた。これまでに重要な腸管感染症病原体 10 種類を一度に高感度で迅速かつ簡便に検出するシステムを開発してきたが、残る問題点の一つは、菌の前培養が必要であるが、それぞれの菌種ごとに適した培地を使用しなければならないという点である。標的とする菌種には、*Campylobacter*、および *Listeria* も含まれており難問であるように思えた。

しかし、本研究において、全ての被

検菌種を増殖させることができる単一の培地を確立した。すなわち、血液無添加の EZ-broth ですべての標的病原体を 406 時間で 1000 から 10000 倍まで増殖した。検体をこの培地で 4-6 時間培養検査したのち、遺伝子検査に移行する。このシステムは国際特許出願中である。

[腸管出血性大腸菌・食品からの菌の検出法]

(3) 食品を対象とした下痢症起因菌の試験法に関する研究：

主として牛肉などの食品からベロ毒素 VT (= 志賀毒素 Shiga toxin) 産生性大腸菌 (VTEC = STEC) を検出するためには、高感度な検出・分離法が必要である。研究分担者らは、そのような方法を紹介し、実際に実検体を調べ牛肉に VTEC が高頻度に分布することを証明した。

被検サンプルにノボビオシン加 mEC 培地を使用して、42°C 18~20 時間増菌培養し、培養液を免疫学的方法（酵素免疫測定法、イムノクロマト法）でスクリーニングして O157 抗原を有する菌の有無を検出、また分子遺伝学的方法（PCR 法、loop-mediated isothermal amplification assay [LAMP] 法、real-time PCR 法）でスクリーニングして VT 遺伝子 (= *stx*) を保持する菌の有無を検出した。いずれかの方法で陽性の場合には、培養液を CT-SMAC, CHROMagar O157TAM, DHL 寒天等へ塗抹し、O157 あるいは VT (VT1, VT2, あるいは VT1 +

VT2) 陽性の集落を同定して、その方法の有用性を実証した。

実際の市販食品(各種肉類および野菜)を検査して、VTEC O157 を 0% (鶏肉) ~ 52.7% (牛肉) のサンプルから検出した。同じサンプルから VTEC non-O157 を 0% (肉以外の食品) ~ 62.5% (牛肉) のサンプルから検出できた。

[コレラ菌・“新型”菌株の遺伝学的検出法と分子疫学]

(4) 病原性 *Vibrio cholerae* の新規検出法の開発に関する研究：

我が国では、コレラは検疫の対象からはずされてしまっているが、現在南西アジアや東南アジアを中心とする、アジア地域で相変わらずコレラが流行し、さらにアフリカで急速に患者が増えている。分離される毒素産生性コレラ菌株の中には、O139 血清型(コレラ毒素産生性)、*ctxB* 遺伝子に変異の起こった El Tor 型菌の variant や、多剤耐性株などが含まれており、菌は多様化しながら、流行域を拡大している。

本研究では、毒素産生性 *Vibrio cholerae* の血清型 O1 株および O139 株のゲノム DNA 上に存在する Integron Island 領域の多様性に着目し、PCR-RFLP 法を用いて解析を行った。その結果、1990 年以前と 1994 年以後に分離された株間で RFLP パターンに違いが見られる領域が明らかとなり、その原因はこの領域における約 20 kb の DNA の「欠失」によるものである

ことが明らかとなり、多様化するコレラ菌の変化の一端を遺伝学レベルで確認できた。

この約 20kb の領域には 4 つの acetyltransferase putative gene と 1 つの lipoprotein 構築に係る gene を含む 42 の open reading frame が存在するとされているが、残り 37 個の open reading frame は機能未知の hypothetical protein である。これらの病原性への関与は、今後の研究課題である。この「欠失」を検出する PCR 法を開発した。この PCR 法は、今後流行を起こす可能性のある“新型”菌株(1994 年以後に流行の原因となっている)を早期に、簡便に検出するために役立ち、分子疫学研究に有用であると言える。

2) 病原性に関する研究成果

[赤痢菌・病原性発現メカニズム]

(1) 赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御に関わる因子の研究：

赤痢菌の Type III secretion system (TTSS) 遺伝子群は温度と浸透圧によって発現が厳密に制御されており、環境中での菌の生存に貢献していると考えられる。本研究では、既知の発現調節因子 (InvE, CpxA) および新たに発見した蛋白性調節因子 (RodZ) が TTSS 制御に関わるメカニズムを遺伝学および生化学的手法を駆使して解析した。

解析の結果、*invE*-mRNA と RodZ 蛋白の相互作用が mRNA の安定性と翻訳に影響することが予想された。InvE 蛋白は Post-transcriptional なレベルで

発現が制御されている。本研究ではこの制御に、RodZ (桿菌の形態形成に関わることが知られている細胞骨格蛋白) が関与していることが明らかになった。すなわち、RodZ は、形態形成意外の機能として RNA 結合活性をもち、赤痢菌の病原遺伝子発現に作用していることが明らかになった。RodZ は新生した mRNA に強く結合することで、細胞膜近傍に転写後調節の場を提供し、それに Hfq が関与する調節が行われる機構が予想される。

[腸管出血性大腸菌・病原性の解明]

(2) 腸管出血性大腸菌が産生する SubAB の作用機構に関する研究：

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) のうちの一部の株は、全く別の毒素 (サブチラーゼサイトトキシン、SubAB) も産生する。本研究では、この新しい毒素の構造・機能を解析した。

この新規に発見された毒素は AB5 サブユニット構造を持つ細胞障害毒素である。A サブユニットはセリンプロテアーゼ活性によって、小胞体に存在するシャペロン Bip を基質として分解し、それによって生じる小胞体ストレスのため細胞死を起こすと考えられる。SubAB は HeLa 細胞に作用させると、Bak, Bax 依存的に cytochrome c の遊離を引き起こし、遊離した cytochrome c は procaspase-9、apaf1 と共に apoptosome を形成し caspase を活性化してアポトーシスを誘導し細胞死に至ると考えられた。

[サルモネラ属菌・病原性]

(3) サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析に関する研究：

サルモネラ属菌の病原性に関しては、本菌の標的細胞に対する侵襲性が重視されている。現在は特に III 型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる病原因子群を標的細胞内に注入し、標的細胞の機能攪乱による細胞骨格の構造変化が注目を集め世界中で詳細な解析が行われている。一方、研究分担者は、この現象と下痢症状との直接的な関連性に疑問を抱き、他の病原因子に着目している。すなわち、コレラ毒素や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシンの A サブユニットとホモロジーのある *stn* 遺伝子 (*Salmonella enterotoxin*) は、サルモネラ属菌に特異的に存在し、Stn タンパク質の発現性には菌株間で差がある。

分担研究者は、Stn タンパク質を確実に精製する方法の確立に取り組んできたが、過去には成功しなかった。今回は *stn* 遺伝子の 3'末端にタグをコードする遺伝子を挿入し、タグ配列を付加した Stn タンパク質を発現する変異株を作製し、抗タグ抗体カラムを用いた精製法を構築し、良い成績を得た。タグ (十残基程度の付加配列) の付加による Stn タンパク質の活性への影響はなさそうである。

さらに、分担研究者は臨床的に重要なサルモネラ菌 (血清型 *S. Enteritidis* および *S. Typhimurium* 標準株のゲノム上の *stn* 遺伝子部分を外来の薬剤耐性遺伝子と組換える事により、*stn* 遺伝

子を欠失した変異株を作製した。

上記のように精製された Stn タンパク質（タグ付き）および病原性株から *stn* 遺伝子を欠失させた isogenic な変異株は、今後適当な生物モデルとの組み合わせにより、Stn の下痢原生との関係解明に役立つであろう

[*Providencia alcalifaciens* ・病原性]

(4) *Providencia alcalifaciens* の病原性に関する研究：

大腸菌、赤痢菌、カンピロバクター属菌等に属する菌株の一部が保有することが報告されている細胞膨化致死毒素（CDT: cytolethal distending toxin）遺伝子の分布を PCR 法によって検査している時に、小児下痢症患者の分離菌から遺伝子陽性菌が分離できた。しかし、遺伝子陽性菌は大腸菌等ではなく、*Providencia alcalifaciens* に同定された。この *cdt* 遺伝子は、*cdtA*、*cdtB*、および *cdtC* から成っているが、従来から知られている *cdt* 遺伝子の 5 種類のバリエーションとは、配列が異なっていた。*P. alcalifaciens* の CDT が菌から蛋白として産生されていることはウエスタンブロット法で確認した。この CDT は、HeLa 細胞には毒性を示さず CHO 細胞に毒性を示した。国内外の下痢症患者から分離した *P. alcalifaciens*、*P. rettgeri* 及び *P. rustigianii* における *cdt* 遺伝子の分布を DNA プローブ法で調べたが、バングラデシュで分離された 1 株で陽性となったのみであり、*Providencia* 属菌の普遍的な病原因子とは言えないと結論

した。

3) 治療に関する研究成果

[腸管出血性大腸菌・治療と臨床診断]

(1) 腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の治療に関する研究：

腸管出血性大腸菌 O157 感染症による死因の 1 つである急性脳症は、この菌が産生するベロ毒素が原因とされる。そのメカニズムは正確にはわかっていないが、本研究で実施した動物モデルを用いた実験によって得られた結果および過去のヒトでの症例報告の遡及的解析結果などから、急性脳症の診断および治療に有用であると考えられる知見が得られた。

すなわち、ウサギモデルを用いた実験結果から、Magnetic Resonance Images (MRI)を用いた観察において、過去に報告された T2 強調像(T2W)よりも、ガドリニウムを用いた enhanced MRI がベロ毒素 2 型 (Stx2) による脳浮腫の検出に適していることが判明した。また、ウサギのモデルを用いた実験結果から O157 感染症で急性脳症をきたした症例には、ステロイドパルス療法が有効である可能性が示唆された。さらに、過去の症例報告とその遡及的解析結果から、ヒトの症例でもこの治療法が有用であることを示唆する記録が発見された。Stx2 による炎症の発生過程において、炎症性サイトカインの一種である IL-1 β の誘導が関与しているか否かを in vitro (ウサギの Stx2 静注モデルおよび胎児脳の初代培養細胞)で調べた結果、IL-1 β の誘

導は起こっていないと結論できた。

以上の他に、研究分担者は腸管出血性大腸菌感染症の危険性と、この菌による感染症を予防するために必要な食生活上の知識を啓蒙する活動経過の内容を紹介している。

4) 疫学に関する研究成果

[カンピロバクター・分子疫学と病原性]

(1) 鶏肉を介する下痢症関連菌の分子診断と分子疫学：

Campylobacter 感染症は 2008 年には食中毒発生件数でみると我が国の細菌性食中毒の一位を占める非常に重要な感染症であり、またギランバレー症候群 (GBS) の原因菌として恐れられている。にも関わらず、菌の病原性に関してははっきりしたことはわかっていない。本研究において、重要な病原因子とされている菌 (*C. jejuni* と *C. coli*) の運動性について、電子顕微鏡を駆使した解析により、特に本菌の運動のメカニズムと関係していると思われる特異的な菌端構造 (カップ様構造) を発見した。

また本菌 (*C. jejuni* と *C. coli*) 感染症の我が国における疫学解析を、我が国でははじめて multilocus sequence type (ST 型) 解析とパルスドフィールドゲル電気泳動解析を用いた分子レベルで行った。*C. jejuni* の場合には、世界分布型の ST22 型が鶏肉、ヒト腸炎、GBS から分離されたものの、その頻度はかなり低かった。またタイの分離株と同じ ST 型の菌が検出された。

しかし多くの分離菌 (47.4%) は新型で、我が国に分布する特有の株である可能性が考えられる。また鶏とヒトでの伝播を証明しうる同一の ST 型の菌 (ST22 型) も検出された。*C. coli* では、ヒト腸炎由来株で 4 種類の ST 型が検出された、その中で 1 種類が新型であり、我が国の土着株である可能性がある。鶏由来株とヒト腸炎由来株で同一あるいは類似する PFGE パターン (PFGE828D) が検出された。

[腸管出血性大腸菌・分子遺伝学と分子疫学]

(2) 腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明：

本研究では、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 および関連する non-O157 EHEC の全塩基配列の決定・解析に基づいて、ゲノムの特徴を明らかにするとともに、分子疫学解析に利用できるツールの開発を行った。

O157 EHEC については、Sakai 株のゲノム配列解析結果をもとに、プロファージに関する新知見を発表した。すなわち、ゲノム中には多数の defective なプロファージが存在するが、構造的に defective なプロファージであっても、プロファージ間での多様な相互作用により活性化され、病原遺伝子などの水平伝達を担いうることが明らかになった。

O157 EHEC のゲノム多様性が、IS を介したゲノムの再構成により、多型が生じることが、比較的小さなゲノム

の多様性発生の主なメカニズムであることが明らかになった。その結果に基づく O157 IS-typing kit の開発に資する基礎データを発表した。

non-O157 EHEC の代表的血清型 (O26, O111, O103) の全塩基配列の決定を行った。その結果、O157 と non-O157 EHEC は全く異なる大腸菌の進化系統に属するにもかかわらず、保持する遺伝子、特に病原性関連遺伝子については共通性が高いことが明らかとなった。その結果に基づく O26 株の IS-typing kit の開発に着手した。その他、O55:H7 菌株の産生する enterohemolysin に関する新知見や、O111 菌株で新たに発見された III 型分泌系エフェクターおよびその機能について新知見を得た。

[腸炎ビブリオ・パンデミック]

(3) 世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの伝播経路 (研究代表者の分担課題)

研究代表者らのグループは、1996 年頃にアジアのどこかで出現した腸炎ビブリオ新型クローン (O3:K6 血清型、*tdh+* *trh-*、特異的な DNA フィンガープリントを示す) が原因でアジア各地で感染症が多発し、1998 年には米国までこの感染症が拡大したことを確認し、腸炎ビブリオの歴史上はじめてパンデミッククローンという呼称を提唱した。専門家間でこの概念は受け入れられている。その後この感染症は北米、南米、ヨーロッパ、アフリカまで感染が広がり、現在も猛威をふるっ

ている。タイ南部では二枚貝中に分布するパンデミック菌株が、現地の人々の食中毒の原因となっていることを示唆するデータが得られている。国際的な伝播経路が謎であり、様々な仮説が提唱されている。研究代表者らは輸出入魚介類、特に二枚貝の可能性を提唱し、長年調査研究を行ってきたが、確たる証拠を得ることが難しかった。しかし、ついに関係者の協力により、中国から輸入された (我が国に到着した直後で無処理の) ハマグリ (加熱調理用) を、O3:K6 菌株に特異的な免疫学的スクリーニング法を用いて検査したところ、新型クローンを分離・同定できた。一方、研究代表者のラボがある中国山東省青島市で、日本のハマグリ調査とほぼ同時期に、現地で市販されているハマグリからパンデミック菌株 (O3:K6 血清型) が分離できたので、日本で輸入ハマグリから分離した菌株との近似性を、他の世界各地で分離されたパンデミック菌株 (O3:K6 血清型) も含めて、2 種の制限酵素を用いたパルスフィールド系統解析に供した。その結果、輸入ハマグリ株と青島市分離株が非常に近似していることが明らかになった。つまり、輸出入二枚貝が重要な伝播経路であることが証明できた。

中国産輸入ハマグリのパンデミック菌株汚染に関しては、厚労省の担当者に連絡した。また今年 1 月に北京で開催された中国 CDC 主催の国際フォーラムで行った招待講演において、この結果を公表し、注意を喚起したこと

に、主催者から感謝された。

4) 病原菌の生態学に関する研究成果 [ヘリコバクター・ピロリ・生態学と病原性]

(3) ヘリコバクター・ピロリのバイオフィーム形成に関する研究：

細菌が固体の表面でバイオフィームを形成するが、その形成のメカニズムやその中での細菌の活動についてあまり知見が得られていない。ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)は、慢性および急性胃炎の原因の1つであり、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃癌のリスクファクターである。この菌は胃粘膜中や環境中においてバイオフィームを形成することが知られているが、やはりそこで何が起きているかは、明らかにされていない。本研究では、仮説を立てて、それを検証するというアプローチにより、少なくとも以下のような病原性発現に関連したことが起こっていることを明らかにした。

バイオフィーム状細菌では病原性関連因子であるウレアーゼが高レベルに発現（浮遊状細菌と比較して約3倍近く）していることが明らかとなった。また病原因子遺伝子とされる *vacA* も高レベルに発現（浮遊状細菌と比較して約5倍近く）していることが明らかとなった。これらの遺伝子の発現は数少ない Global regulator の1つである CsrA を介した発現であり、さらに CsrA は quorum sensing の signaling molecule である LuxS によりその発現

が制御されているカスケード形式のコントロールの支配下にあることが明らかとなった。したがって、ヘリコバクター・ピロリは、バイオフィーム状態などのように細菌密度が高くなるような状態において、病原性発現を強めていることが明らかとなった。

5) 感染予防法に関する研究成果

[コレラ菌・ワクチン開発]

(1) 粘膜ワクチンアジュバントに用いるコレラ毒素の大腸菌過剰発現系の作製：

コレラ毒素 (CT) あるいはその無毒変異ホロ毒素は、ワクチン抗原とともに経鼻または経口投与すると、強い粘膜アジュバント活性を示すことが報告されているので有用である。しかし、CT 遺伝子 (*ctx*) を発現プラスミドに組み込んだ、リコンビナントプラスミドを大腸菌に形質転換したのから発現した蛋白を大量に発現する系が殆ど構築されていない。

本研究では、そのような方法で大腸菌内に大量に発現した CT を ハイドロキシアパタイトを用いた精製法で精製できた。得られた CT は、ニッキングに関与するプロテアーゼを欠く大腸菌内で産生されたために、Intact form であった。しかしながら、トリプシン処理で Nicked form にした rCT の CTA 及び CTB の生物活性は Native-CT と同等であるので、得られた CT は、CT の生物活性に関する研究に利用でき、有用であると言える。

CT や CTB の粘膜アジュバント効果

にはまだコンセンサスの得られたメカニズムが示されていないので、現在は、作製した rCT と塩基置換により作製した無毒 mCT そして CTB を用いて解析を行っている。

D. 考察

腸管感染症をグローバルな視点から見て、重要な問題に取り組んで様々な成果が得られた。感染症の診断のための細菌の同定はゲノムレベルでのオートメーション化の方向へ向かっているが、前培養が必要な場合もあり、そのために発見された主要な腸管病原性菌 10 菌種のいずれでも発育できる培地の発見は圧巻である。サルモネラ菌、腸管出血性大腸菌、赤痢菌の腸内細菌グループでは、まだ病原性メカニズムがはっきりとしていないことが明らかであり、この分野の研究の奥深さが示唆された。疫学は間違いなく分子遺伝学レベルで展開している。カンピロバクターは世界的にも国内でも非常に重要な感染症になっている。この菌は、一般的に国際的に取引されるブロイラーチキンに付着していると考えることが無難である。本研究で我が国でもやっと multilocus sequence type (ST 型) 解析に着手した。国際間で分離菌の比較が可能となったので、グローバル化してゆくカンピロバクター感染症に対応できるであろうと思われる。腸炎ビブリオ感染症のパンデミック (世界的大流行) に関しても、少なくとも輸出入二枚貝が、伝播経路

となっていることが証明されたので、対応策の確立に着手できる。実際には、すでに当時の厚生省が 2001 年にとった魚介類の衛生管理を強化する対応策が功を奏しているようで、以後我が国では、症例報告が激減している。腸管出血性大腸菌のゲノム解析も世界をリードするレベルとペースで進んでいることが良くわかる。その他に、ヘリコバクター・ピロリや *Providencia alcalifaciens* も研究対象に含まれており、今後の研究の発展が期待できる。コレラの予防のためのワクチンの改良は、全世界の多くの子供たちを下痢症による死亡から救う重要な手段である。このような研究のさらなる進展を期待したい。

E. 結論

総じて研究計画に沿って研究が進展し、良い成果が得られている。今後もこれらの研究が、必要に応じて軌道修正 (発展途上国でのニーズへ対応する国際共同研究も含む) を受けながら、展開していけば理想的であろう。

F. 健康危険情報

本研究において、生食用食肉の喫食による腸管出血性大腸菌 O157 などの危険性を広く国民に伝えることおよびメニューにリスク表示をさせることに関する提言があった。

また、我が国に近隣の国から輸入されている二枚貝に世界的大流行を起

こしている腸炎ビブリオパンデミッククローンが含まれることが証明されたので、輸出国および輸入国が注意を喚起して何らかの対応策をとる必要がある。現在 CODEX 委員会で、これに関する衛生規範が確立されようとしているので、参加している各国は、真摯に対応することが強く望まれる。

近年、カンピロバクター食中毒は発生件数で見ると細菌性食中毒で最も重要である。原因菌には世界分布型株も存在するが、土着株も存在する。鶏に由来する深刻な GBS 発症も認められた。さらに感染動向に注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lee, H.-Y., L.-C. Chai, S.-Y. Tang, S. Jinap, F. M. Ghazali, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, R. Son. 2009. Application of MPN-PCR in biosafety of *Bacillus cereus* s.l. for ready-to-eat cereals. Food Control, 20:1068-1071.
- 2) Zulkifli, Y., N.B. Alitheen, A.R. Raha, S. K. Yeap, Marlina, R. Son, and M. Nishibuchi. 2009. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. Int. Food Res. J. 16:53-58.
- 3) Chai, L. C., F. M. Ghazali¹, F. A. Bakar¹, H. Y. Lee¹, L. R. A. Suhaimi, S. A. Talib, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and S. Radu. Occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. contamination on vegetable farms in Malaysia. J. Microbiol. Biotechnol. 19(11):1415-1420.
- 4) Yamazaki, W., Y. Kumeda, N. Misawa, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. Appl. Environ. Microbiol. 76(3):820-828.
- 5) Tokunaga, A., H. Yamaguchi, M. Morita, E. Arakawa, H. Izumiya, H. Watanabe, R. Osawa. Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139. Mol. Cell. Probes. (in press)
- 6) Mitobe, J., T. Morita-Ishihara, A. Ishihama, H. Watanabe. 2009. Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.
- 7) Mitobe, J., T. Morita-Ishihara, A. Ishihama, H. Watanabe. 2008. Involvement of RNA binding protein hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. J. Biol. Chem. 2008 Feb 29

vol.283(9):5738-5747

8) Fujii, J., Y. Kinoshita, A. Matsukawa, S. Villanueva, T. Yutsudo, S. Yoshida. 2009. Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbit. *Microb Pathog* 46(4): 179-184.

9) Matsuda, F., J. Fujii, S. Yoshida. 2009. Autophagy induced by 2-deoxy-D-glucose suppresses intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in A/J mouse macrophages, *Autophagy* 5(4): 484-493.

10) Matsuura, G., N. Morinaga, K. Yahiro, R. Komine, J. Moss, H. Yoshida, and M. Noda. 2009. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in Vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* 77:2919-2924.

11) Nakayama, M., J. Hisatsune, E. Yamasaki, H. Isomoto, H. Kurazono, M. Hatakeyama, T. Azuma, Y. Yamaoka, K. Yahiro, J. Moss, T. Hirayama. 2009. *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284 (3): 1612-1619.

12) Takahashi, A., T. Muratani, M. Yasuda, S. Takahashi, K. Monden, K. Ishikawa, H. Kiyota, S. Arakawa, T. Matsumoto, H. Shima, H. Kurazono, S.

Yamamoto. 2009. Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis. Phylogeny, virulence factors, PAI*usp*-subtypes, and mutation patterns. *J. Clin. Microbiol.* 47: 791-795.

13) Kulkeaw, K., Y. Sakolvaree, P. Srimanote, P. Tongtawe, S. Maneewatch, N. Sookrung, A. Tungtrongchitr, P. Tapchaisri, H. Kurazono, W. Chaicumpa. 2009. Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. *J. Proteomics* 72 (2): 270-282.

14) Hinenoya, A., A. Naigita, K. Ninomiya, M. Okuda, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, K. Seto, T. Tsukamoto, T. 2009. Ramamurthy and S. Yamasaki. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan., *Microbiol. Immunol.*, 53: 206-215.

15) Yabe, S., W. Higuchi, T. Takano, O. Razvina, Y. Iwao, H. Isobe, T. Yamamoto. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Infect. Dis.* (in press)

16) Asadulghani, Md., Y. Ogura, T. Ooka,

- T. Itoh, A. Sawaguchi, A. Iguchi, K. Nakayama, and T. Hayashi. 2009. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog.* 5(5): e1000408.
- 17) Leopold, S.R., V. Magrini, N.J. Holt, N. Shaikh, E.R. Mardis, J. Cagno, Y. Ogura, A. Iguchi, T. Hayashi, A. Mellmann, H. Karch, T.E. Besser, S.A. Sawyer, T.S. Whittam, and P.I. Tarr. 2009. A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(21): 8713-8718.
- 18) Ooka, T., Y. Ogura, Md. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2009. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. *Genome Res.* 19: 1809-1816.
- 19) Ooka, T., J. Terajima, M. Kusumoto, A. Iguchi, K. Kurokawa, Y. Ogura, M. Asadulghani, K. Nakayama, K. Murase, M. Ohnishi, S. Iyoda, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method 1 for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 47(9): 2888-2894.
- 20) Yoshii, N., Y. Ogura, T. Hayashi, T. Ajiro, T. Sameshima, M. Nakazawa, M. Kusumoto, T. Iwata, and M. Akiba. 2009. Pulsed-field gel electrophoresis profile changes resulting from spontaneous chromosomal deletions in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during passage in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(17): 5719-5726.
- 21) Nakayama-Imaohji, H., H. Hirakawa, M. Ichimura, S. Wakimoto, S. Kuhara, T. Hayashi, and T. Kuwahara. 2009. Identification of the site-specific DNA invertase responsible for the phase variation of SusC/SusD family outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 191(19): 6003-6011.
- 22) Nobe, R., J.P. Nougayrède, F. Taieb, M. Bardiau, D. Cassart, F. Navarro-Garcia, J.G. Mainil, T. Hayashi, and E. Oswald. 2009. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O111 inhibits NF- κ B-dependent innate responses in a manner independent of a type III secreted OspG orthologue. *Microbiology.* 155: 3214-3225.
- 23) Ogura, Y., T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, Md. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama,

- H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, and T. Hayashi. 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(42): 17939-17944.
- 24) Yonezawa, H., T. Osaki, S. Kurata, M. Fukuda, H. Kawakami, K. Ochiai, T. Hanawa, and S. Kamiya. 2009. Outer membrane vesicles of helicobacter pylori TK1402 are involved in biofilm formation. BMC Microbiol. 9:197.
- 25) Kawaguchi K, J. Matsuo, T. Osaki, S. Kamiya, H. Yamaguchi. 2009. Prevalence of helicobacter and acanthamoeba in natural environment. Lett. Appl. Microbiol. 48(4):465-471.
- 26) Oshio I, T. Osaki, T. Hanawa, H. Yonezawa, C. Zaman, S. Kurata, S. Kamiya. 2009. Vertical *Helicobacter pylori* transmission from Mongolian gerbil mothers to pups. J. Med. Microbiol. 58(5):656-662.
- 27) Hanawa T., T. Osaki, M. Manzoku, H. Kawakami, A. Tomoda, S. Kamiya. 2009. *In vitro* antibacterial activity of Phx-3 against *Helicobacter pylori*. Biol. Pharm. Bull. (in press)
- 28) Arimitsu, H., K. Tsukamoto, S. Ochi, K. Sasaki, M. Kato, K. Taniguchi, K. Oguma, and T. Tsuji. 2009. Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 67:96-103.
- 29) Ochi, S., T. Shimizu, K. Ohtani, Y. Ichinose, H. Arimitsu, K. Tsukamoto, M. Kato, and T. Tsuji. 2009. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. DNA Res 16:299-309.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 国際特許出願済み：US12/311,217
Detection of bacterium by utilizing *dnaJ* gene and use thereof
出願国は米国、中国、ベトナム、タイ、フランス、ドイツ、イギリス
(分担研究者 江崎)
 2. 国内特許出願中：2009-152437 (整理番号 2588)
食品用殺菌剤
(同じく国際特許出願準備中)
(研究代表者 西沢)

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

次世代シーケンサを用いた細菌性下痢症の解析

研究分担者 飯田 哲也 大阪大学微生物病研究所特任教授

研究要旨：

次世代シーケンサを用いることにより、細菌性下痢症の網羅的診断のみならず、感染症の発症・治癒過程における下痢患者糞便中の病原体とフローラの経時的動態を網羅的に追跡することが可能であった。本法は原理的に細菌の種類にこだわらない検出法であり、多様な細菌を単一の原理で検出できる可能性がある。また糞便のみならず喀痰や血液などさまざまな臨床検体への応用が期待できる。今後、より多くの臨床検体を供試することにより、本法の有効性を検討していく予定である。

A. 研究目的

近年、DNA 配列決定技術の進歩は著しい。2006 年より市販が開始された、いわゆる「次世代シーケンサ」は、半日で数百メガ塩基対の DNA 配列を解読する性能を有する。このような、従来のものに比べて格段の性能をもつシーケンサの出現は、医学・生物学研究に革新的なインパクトをもたらすことが予想される。特に病原体の研究においては、従来、大きなコストと多大な手間を要した微生物のゲノム解析がごく短時間に比較的安価で行えるようになり、ひいては新興・再興感染症の病原体の同定や薬剤耐性菌の耐性獲得機構の解明など、感染症対策につながる有用な知見をより迅速に入手することが可能になると期待される。本研究では次世代シーケンサを用いて細菌性下痢症の迅速診断法を構築するとともに、原因未知症例において新規病原体の同定を目指す。さらに、細菌性下痢症の発病過程における病原体と腸内細菌叢の動態につい

て解析を行う。具体的には、急性下痢症患者より得られた糞便検体から直接細菌ゲノム DNA 抽出し、得られた DNA を次世代シーケンサでハイスループットに配列決定し、その配列データを解析することにより患者糞便中に存在する細菌（病原細菌を含む）の検出を試みる。

B. 研究方法

急性下痢症由来の糞便検体のうち、起病菌が判明している症例について、既報 (Nakamura *et al.* *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1784-1786, 2008) の方法により DNA を抽出し、直接シーケンサに供することにより unbiased sequencing を行い、病原菌の検出を試みた。糞便検体は神戸市環境保健研究所にストックされているものを用いた。本件に用いた検体はさかのぼってインフォームド・コンセントを取得することが不可能な検体であり、連結不可能匿名化されて大阪大学に提供された。

糞便検体からの DNA の抽出は、QIAGEN 社の QIAamp DNA Stool Mini kit を用いて行った。

また、海外渡航後急性下痢症を発症した患者から経時的に得た糞便検体より DNA を抽出し、1) 直接シーケンサに供し unbiased sequencing を行った。また、2) 各抽出 DNA に対し 16S rDNA をターゲットとした PCR を行い、その増幅産物をシーケンサに供した。本件に関しては研究対象者に研究内容を説明しインフォームドコンセントを得てから研究を行った。シーケンサは GS-FLX Titanium (Roche/454 Life Sciences) を用いた。得られた塩基配列の BLAST 解析を行い、トップヒットしてきた DNA 配列の由来する生物種を NCBI taxonomy データベースより検索した。検索は大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターのコンピュータシステムを用いて行った。

Unbiased sequencing については患者由来配列が読まれる可能性があるが、BLAST 解析の結果ヒット配列にトップヒットした段階でその配列はマスクしそれ以上の解析を行わないことで個人情報の保護を行った。

本研究については大阪大学微生物病研究所生命科学研究倫理委員会の審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

起病菌が判明している急性下痢症由来の糞便検体について、DNA を抽出し unbiased sequencing を行うことにより、糞便中の細菌叢を検討した。その結果、いくつかの検体において、従来法で検出されていた病原体（起病菌）が dominant に検出された（図 1、表 1）。このことは、今回のアプローチが、下痢症例における起病菌の推定診断に有効であることを示す。一方で、従来法によって下痢原因菌が検出されているにもかかわらず、本法では当該病原体の配列が見いだされない（あるいは対照と同程度数しか検出されない）検体もみられた。

海外渡航後急性下痢症を発症した患者から経時的に得た糞便検体を unbiased sequencing した結果、本症例の起病菌であった大腸菌の数が、下痢発症時に顕著に上昇することが観察された。また、病原因子である定着因子 CS6

の遺伝子が検出され、本法の診断法としての可能性が示された。16S rDNA をターゲットとした PCR 産物の配列解析では、起病菌である大腸菌のみならず、その他の腸内細菌（フローラ）の動態を経時的に観察することが可能であった。

D. 考察

本研究では、下痢患者より得た糞便検体から抽出した DNA を直接 unbiased sequencing することにより、病原体（起病菌）の検出が可能であることを示すことができた。ただし、従来法により病原体（下痢原因菌）が検出されているにもかかわらず、本法ではその病原体が検出できない検体もみられた。この一因として現在の次世代シーケンサのパフォーマンス（解析配列数）が不十分であることが考えられる。今後シーケンサの能力はさらに向上していくものと考えられるが、シーケンサ能力の向上にともない、このような問題点が解消されていくかどうか、今後検討していきたい。また、別の可能性として、今回糞便検体からの DNA 抽出に用いた方法（QIAamp DNA Stool Mini kit）が、特定の病原体の DNA 抽出には適していないことが考えられる。実際、腸内フローラの研究をしているグループから、糞便検体からの DNA 抽出の方法によって、得られるメタゲノム配列が大きく異なることがあるとの報告がなされている。この点に関しては、今後さまざまな臨床検体について検討していき、本研究の目的のために適したサンプル調整法を確立していく必要がある。

また、本研究においては、次世代シーケンサを用いたアプローチにより、感染症の発症・治癒過程における下痢患者糞便中の病原体とフローラの経時的動態を網羅的に追跡することが可能であった。従来、培養不能菌や培養困難菌も含めた腸内フローラの全貌を解析することは簡単ではなかった。本法は原理的に細菌の種類にこだわらない検出法であり、多様な細菌を単一の原理で検出できる可能性があり、今後、腸内フローラや腸管病原体の動態解析に威力を発揮するものと考えられる。また糞便のみならず喀痰や血液などさまざまな臨床検体への応用が期待できる。今後、よ

り多くの臨床検体を供試することにより、本法の有効性を検討していく予定である。

E. 結論

次世代シーケンサを用いることにより、細菌性下痢症の網羅的診断のみならず、感染症の発症・治癒過程における下痢患者糞便中の病原体とフローラの経時的動態を網羅的に追跡することが可能である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 飯田哲也. 2009. 次世代シーケンサを用いた細菌感染症のメタゲノミック診断. *JVM* 62: 819-820.

2) 飯田哲也. 2009. 次世代シーケンサーを用いた微生物・感染症解析. *医学のあゆみ* 231: 180-181.

3) 飯田哲也. 2010. 次世代シーケンサを用いた細菌感染症のメタゲノミック診断. *Medical Technology* (印刷中)

2. 学会発表

1) 飯田哲也: 次世代シーケンサの病原細菌解析への応用. シンポジウム網羅的遺伝子検索の感染症迅速診断への応用. 第147回日本獣医学会学術集会、2009年4月2-4日、栃木県総合文化センター、宇都宮

2) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of bacterial infections. 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Kolkata, India, April 6-9, 2009

3) 飯田哲也: 次世代シーケンサを用いた微生物・感染症解析. 特別講演. 日本微生物資源

学会第16回大会、大阪大学銀杏会館、2009年6月24-26日

4) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of infectious diseases. 12th ISTC-SAC Semina - Combating Global Infections -, Irkutsk, Russia, September 21-24, 2009

5) Nakamura, S., Kataoka, C., Izutsu, K., Iijima, Y., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Yasunaga, T., Horii, T., Nakaya, T., and Iida, T. : Metagenomic analysis of enteric infections. The 44th Joint Conference of U. S. - Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, San Diego, USA, Oct. 11-14, 2009

6) 飯田哲也: 次世代シーケンサを用いた下痢性細菌感染症のメタゲノミック診断. シンポジウム 結核・下痢性細菌感染症. 第50回日本熱帯医学会大会、沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日

7) 飯田哲也: 次世代シーケンサを用いた細菌性下痢症のメタゲノミック解析. 第62回日本細菌学会関西支部総会、大阪府立大学りんくうキャンパス多目的ホール、2009年11月14日

8) Iida, T. : Metagenomic analysis of infectious diseases. NSC-JST Infectious Disease Workshop "Host-Pathogen Interaction", JST Innovation Plaza Kyoto, Nov. 16-17, 2009

9) 中村昇太、片岡千鐘、井筒香織、飯島義雄、河合純、林崎良英、安永照雄、堀井俊宏、中屋隆明、飯田哲也: 腸管感染症のメタゲノミック解析. 第43回腸炎ビブリオシンポジウム、岡山大学大学院自然科学研究科棟2階大講義室 2009年11月26, 27日

10) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of infectious diseases. NSFC-JSPS 第3回日中