

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

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

研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学教授
研究協力者 有満秀幸 藤田保健衛生大学講師

研究要旨：

コレラ毒素(CT)はリコンビナント蛋白としての大量発現系が殆ど構築されておらず、コレラ菌の培養上清からも培養の手間の割に得られる量は少ない。これを解決するツールとして、大腸菌における CT の過剰発現・精製系を作製した。発現プラスミド pBSK-CT で形質転換された大腸菌は、リンコマイシンを含む CAYE 培地で培養することにより、菌体内に CT を可溶性蛋白として過剰発現した。精製した CT は A サブユニットが Intact form であった以外は構造、生物学的作用がコレラ菌由来のものと同等の性質を示した。本方法は無毒変異毒素の作製も容易であることより、CT の毒性研究だけでなく粘膜アジュバント研究のツールとしても有用である。

A. 研究目的

腸管内細菌感染症は下痢をはじめとして、腸管出血性大腸菌の HUS のように、産生された毒素が粘膜を通過して遠隔臓器に運ばれることにより、全身症状を呈するものまで多彩である。これらの感染症防御の戦略は、腸管で産生される毒素が粘膜から吸収されないようにする防御機構形成が重要であり、そのひとつである粘膜における中和抗体産生を誘導するアジュバントの選択がカギとなる。

コレラ毒素(Cholera toxin;CT)は、3量体 G 蛋白 G α サブユニットに対する ADP リボシル活性を持つ A サブユニット(CTA)と、ガングリオシド GM1 や GD1b をレセプターとして結合する B サブユニット(CTB)で構成される下痢毒素であるが、ワクチン抗原とともに

経鼻ないし経口投与すると、強い粘膜アジュバント活性を示すことが多くの論文で報告されている。この活性は CT にアミノ酸レベルで 80%の相同性を持つ毒素原性大腸菌の易熱性毒素(Heat-labile enterotoxin; LT)においても認められるが、CT はとりわけ液性免疫に重要な Th2 反応への傾倒効果が強いとされている。また CT、LT とも、その B サブユニットのみを用いた場合でも粘膜アジュバント活性を示すことが報告されているが、その効果はホロ毒素と比較すると弱いとされている。このことから CT やその弱毒ないし無毒変異ホロ毒素をアジュバントとした粘膜ワクチン開発は重要であるが、LT との高い相同性にも関わらず、大腸菌でのリコンビナント CT(rCT)発現系は報告がこれまで殆ど

なかった。

我々は最近、ホロ毒素同様に発現系の報告例の少ない rCTB の大腸菌での過剰発現系を構築した。この発現系はクローニングベクターの pBluescript SK(+) の LacZ 遺伝子内に、SD 配列を含む CTB 遺伝子全長を out of frame に挿入して作製したプラスミドで形質転換した大腸菌を、リンコマイシン添加した CAYE 培地で培養を行うことにより、IPTG の添加なしに CTB が発現誘導するものである。今回この方法をホロ毒素の発現系に応用した結果を報告する。

B. 研究方法

1) **供試菌株** : ゲノム DNA の供試菌株として *V. cholerae* 569B 株を用い、宿主大腸菌として MV1184 株を用いた。

2) **rCT 発現プラスミド作製** : CT オペロンを増幅するため、CTA 遺伝子上流の SD 配列から CTB 遺伝子のストップコドンまでの領域を増幅するプライマーセットを設計し、コレラ菌ゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。この増幅産物を pBluescript SK(+) の LacZ 遺伝子内 MCS 内の *EcoRI* と *HindIII* に切断サイトへ out of frame に挿入して作製した。この発現プラスミドは pBSK-CT と命名した(図 1)。また無毒変異 CT(mCT) を作製するため、CTA の 110 位のグルタミン酸をアスパラギン酸、または 112 位のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異毒素 (E110D 及び E112Q) 産生プラスミドを、pBSK-CT を鋳型とした Site-directed mutagenesis により作製した。

3) **rCT の発現及び精製** : pBSK-CT またはその変異プラスミドで形質転換した大腸菌 MV1184 株をリンコマイシン 90 μ g/ml を含む CAYE 培地 1L に接種

し、30 $^{\circ}$ C で 48 時間振盪培養した。遠心で回収した菌体を超音波破碎し、その遠心上清をガラクトース固定化ゲルで精製した。さらに Free の CTB を除去する目的で、この精製産物を 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラムに結合させた。溶出は 1M NaCl を含む同緩衝液、続いて 0.2M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) で行った。

4) **rCT の生物活性の評価** : CTA の活性の評価は CHO 細胞を用いた紡錘状の形態変化を指標にして評価を行った。また CTB の活性はガングリオシド (GM1, GD1b, GT1b, Asialo GM1) に対する結合活性を、Biacore2000 を用いた表面プラズモン共鳴法で解析した。

C. 研究結果

1) **rCT の発現と精製** : pBSK-CT で形質転換した大腸菌をリンコマイシンを添加した CAYE 培地にて培養したところ、rCTB と同様 CT ホロ毒素の発現が認められた。これを定法に準じてガラクトース固定化ゲルで精製すると、1L 培養あたり約 24.2mg の CT を得ることができた。このアフィニティー精製産物中にはホロ毒素を形成しない Free の CTB とわずかな夾雑蛋白の混入が認められるため、この試料を 10mM リン酸緩衝液に透析して、同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラムに吸着させて Free CTB の除去を試みたところ、CT ホロ毒素は 1M NaCl を含む同緩衝液で溶出され、Free CTB を含む残る夾雑蛋白は後の 0.2M リン酸緩衝液によって溶出されることが明らかとなった(図 2)。CT ホロ毒素が溶出される条件の緩衝液では Free CTB が溶出されないことは、rCTB を用いて確認された(図に示していな

い) ことより、本方法はガラクトース固定化ゲルでの精製のみでは避けられないコンタミした Free CTB の除去に有用な精製法であると考えられる。この方法により高度に精製された rCT の最終収量は 1L 培養あたり約 15.6mg であり (表 1)、mCT においてもその収率は変わらなかった (E110D で 12.8mg、E112Q で 13.5mg)。

精製された rCT の SDS-PAGE 像は図 3 に示されるように、コレラ菌の培養上清から精製される CT (Native-CT) と比較すると CTB は全く同一であるが、CTA については、N 末端アミノ酸配列は同じであるものの分子量が異なっていた。このニックは rCT のトリプシン処理により再現され、ガラクトース固定化ゲルで再度精製を行うことにより、トリプシンを除いた Native-CT と同等品を得ることができた。

2) **rCT の生物活性** : 上記方法で得られた rCT 及び mCT の生物活性を評価するため、CTA の活性として CHO 細胞に対する形態変化を Native-CT と比較して調べた (図 4)。rCT は Native-CT と同様に CHO 細胞の紡錘状形態変化を誘導し、50% 効果濃度 (EC_{50}) は 21.9ng/ml (Native-CT は 42.3ng/ml) であった。一方、mCT (E110D、E112Q) では陰性対照の rCTB と同様に 1,000ng/ml においても形態変化を起こさなかった。

一方 CTB のガングリオシドに対する結合は GM1 に対する強い結合、また GD1b にも結合する Native-CT と同様の性質が認められた (図 5)。

D. 考察

CT は粘膜アジュバントとしての有用性が多く報告されているが、通常の大腸菌発現系では発現成績がよくな

い上、コレラ菌の培養液から精製される量も多くないことから、材料としての入手が手軽ではないことが欠点であった。今回作製した大腸菌での発現系は既に昨年構築した CTB 発現系を CT ホロ毒素に応用したものであり、リンコマイシン添加した CAYE 培地で培養することによって菌体内に過剰に発現する特殊な発現様式をもつ。さらにこの菌体破碎遠心上清から 2 段階の精製を経て、Free CTB を含まない高純度のホロ毒素を得ることができた。得られた CT は既報でも示されている Intact form であったが、これは大腸菌がコレラ菌の保有するニックングに関与するプロテアーゼを欠くことに起因している。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 と同等であることより、CT の生物活性に関する研究がこれまでより手軽に行えることが期待される。さらに、本方法は変異毒素発現プラスミド作製が一般的な変異導入法で作製できることより、粘膜アジュバント研究にも手軽に利用できる。粘膜アジュバントとしての効果は、CTB よりもホロ毒素の方が高いことが報告されているが、従来の方法で精製されている CT の活性は Free CTB の混入度にも左右されている可能性があり、今回そのようなコンタミネーションを除去した CT ホロ毒素を得られるハイドロキシアパタイトを用いた精製法は意義がある。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おらず、現在我々は作製した rCT と無毒 mCT そして CTB を用いて解析を行っているところである。

E. 結論

大腸菌を宿主とした CT 及びその変異毒素の過剰発現及び精製系を作製した。得られた毒素は構造的、生物学的にコレラ菌の培養上清から精製されたものと同様であったことより、この方法は CT の生物活性またはアジュバント研究に有用なツールになると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 大腸菌におけるコレラ毒素及びその変異毒素の過剰発現系の作製
有満秀幸、塚本健太郎、越智定幸、佐々木慶子、辻 孝雄
- 2) 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの配列解析
越智 定幸、有満 秀幸、塚本 健太郎、

大谷 郁、佐々木 慶子、加藤 道夫、清水 徹、辻 孝雄

3) ボツリヌス D 型神経毒素と Phosphatidylethanolamine の相互作用の解析

塚本 健太郎、越智 定幸、有満 秀幸、中村 佳司、小崎 俊司、辻 孝雄

(以上第 82 回日本細菌学会(名古屋市))

4) ボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の脂質受容体に対する結合活性

塚本健太郎、田中良和、Nipawan Nuemket、越智定幸、有満秀幸、Neri Paola、佐々木慶子、中村佳司、小崎俊司、辻 孝雄

(第 56 回トキシシンポジウム(岐阜市))

5) 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの接合伝達領域

越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、一瀬休生、清水 徹、辻 孝雄

6) EC 細胞を用いたボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の機能解析

塚本健太郎、有満秀幸、越智定幸、Neri Paola、佐々木慶子、辻 孝雄

(以上第 46 回日本細菌学会中部支部総会(名古屋市))

7) Construction of over-expression and purification system of cholera toxin and its mutants in *Escherichia coli*

Hideyuki Arimitsu, Kentaro Tsukamoto,
Sadayuki Ochi, Keiko Sasaki, Michio
Kato and Takao Tsuji

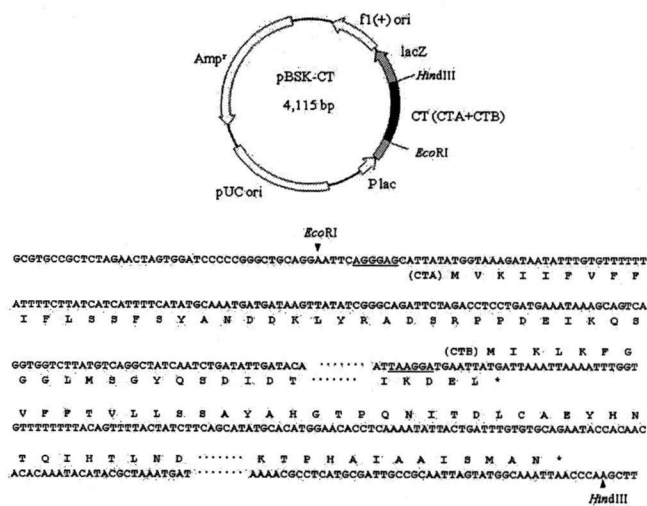
44th Joint Meeting and Conference of the
United States-Japan Panel on Cholera and
Other Bacterial Enteric Infections in San
Diego.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

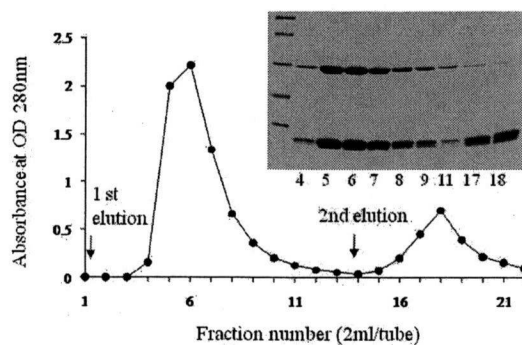
1. 特許取得
なし

1. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

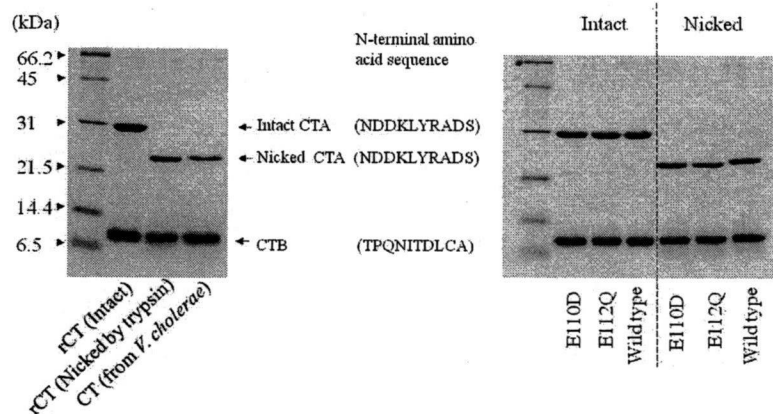


【図1 CT発現プラスミドの構造】



Binding buffer : 10mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)
1st elution buffer : 10mM sodium phosphate buffer (pH7.0)+ 1M NaCl
2nd elution buffer : 0.4M sodium phosphate buffer (pH 7.0)

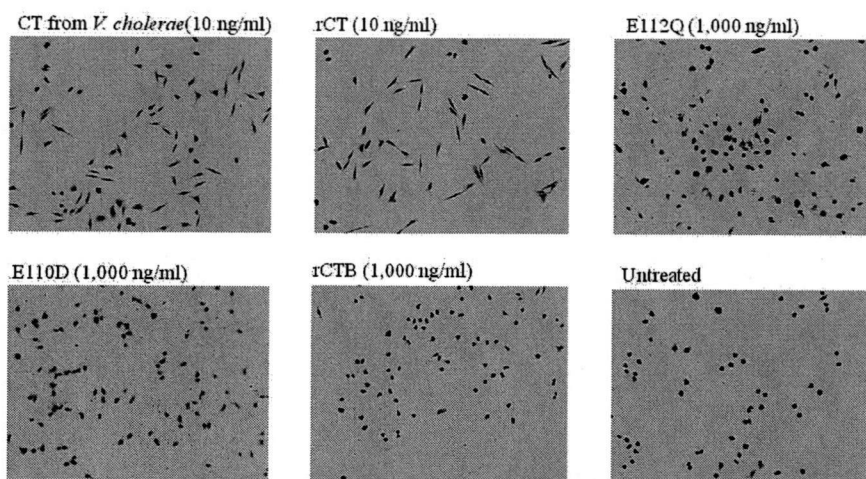
【図2 ハイドロキシアパタイトによるrCTの分離】



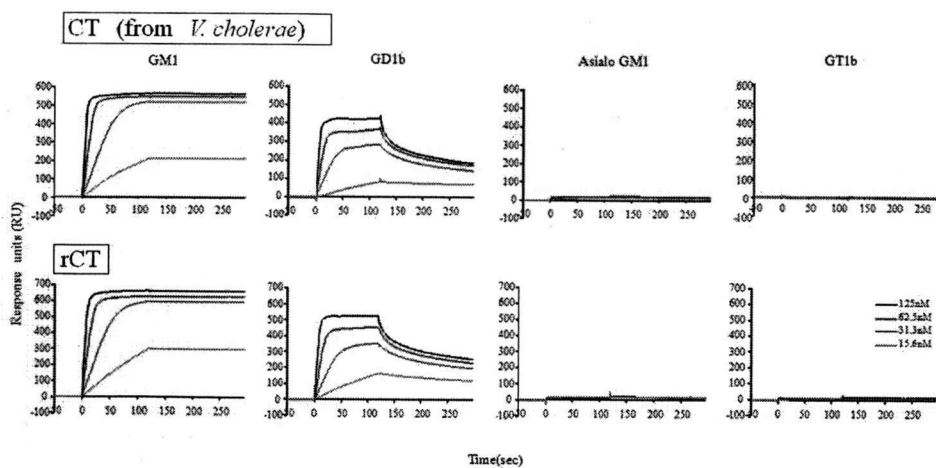
【図3 精製rCT(左)と変異CT(右)のSDS-PAGE像及び各バンドのN末端アミノ酸配列】

【表1 CAYE培地1L培養におけるrCTの回収率】

	Total protein (mg)	Recovery (%)
Cell extract (from liter of culture in CAYE medium)	1760.5	100.0
D-galactose gel eluent	24.2	1.4
Hydroxyapatite eluent	15.6	0.9



【図4 rCT, mCT及びNative-CTのCHO細胞に対する伸長活性】



【図5 rCT及びNative-CTのガングリオシドに対する結合性】

研究発表一覧

A. 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. 2008. 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) 西瀨光昭. 2009. 腸炎ビブリオ食中毒. 食品安全の辞典 (日本食品衛生学会編, 朝倉書店). 109-114 頁.
- 6) 西瀨光昭. 2009. 気候変動と感染症: 医学研究と地域研究のクロスオーバー. 東南アジア研究 46: 646-659 頁.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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)
- 10) Tokunaga, A., H. Yamaguchi, M. Morita, E. Arakawa, H. Izumiya, H. Watanabe, R. Osawa.

(in press) Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139. Mol. Cell. Probes.

- 11) 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.
- 12) 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
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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,
- 17) 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.
- 18) 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.

- 19) 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.
- 20) 藤井 潤. 2009.ベロ毒素に関する新たな知見, 化学療法の領域 25(5):39-48.
- 21) 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)
- 22) 矢部 静、岩尾泰久、高野智洋、西山晃史、山本達男。2009.*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の ST 型別 –グローバル分子疫学解析–。日本カンピロバクター研究会誌 vol.2: 60-66.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.

- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也. 2009, ゲノム解析から見えてきた腸管出血性大腸菌の毒素及び病原因子の新知見, 化学療法の領域 25(5): 767-777.
- 32) 森宙史, 林哲也, 黒川顕. 2009, メタゲノム研究の最前線-454 とメタゲノム解析, 蛋白質核酸酵素, 54(10): 1264-1270.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.

- 36) 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)
- 37) 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.
- 38) 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.

B.学会発表

- 1) Marlina, Delfi Marina, Abdul A. Djamal, Yuherman, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi. Detection of Shiga Toxin (*stx*₁ and *stx*₂) Genes on *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Meat in Padang, Indonesia. The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. パングラン・ビーチ・ホテル、パダン (インドネシア) . 平成 21 年 8 月 19 日 .
- 2) Marlina, Nila Sari, Emma Susanti, Yuherman, Yoshitsugu Nakaguchi, Son Radu, Mitsuaki Nishibuchi. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in *Scylla serrata* Determined by Polymerase Chain Reaction. The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. パングラン・ビーチ・ホテル、パダン (インドネシア) . 平成 21 年 8 月 19 日 .
- 3) Yuherman, Aziz Jamal, Marlina, Son Radu, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi. Antibiotic Resistance Pattern, Plasmid Profiling, and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seawater in Padang, West Sumatera. The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. パングラン・ビーチ・ホテル、パダン (インドネシア) . 平成 21 年 8 月 19 日 .
- 4) Yuherman, Marlina, Aziz Jamal, Son Radu, Mitsuaki Nishibuchi. Genetic Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Coastal Water by Using ERIC-PCR and PFGE. The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. パングラン・ビーチ・ホテル、パダン (インドネシア) . 平成 21 年 8 月 19 日 .
- 5) Rattanama, P., J. Mekalanos, M. Nishibuchi, V. Vuddhakul. Evaluation of pathogenic role of a *Vibrio cholerae* hemolysin gene (*hlyA*) homologue using a shrimp model. 44th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. カリフォルニア州サンディエゴ(米国). 平成 21 年 10 月 12 日 .
- 6) Chai, L. C., J. Ponniah, F. M. Ghazali, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, S. Radu. Quantitative exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables. 44th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. カリフォルニア州サンディエゴ(米国). 平成 21 年 10 月 12 日 .
- 7) Shimada, K., K. Seo, Y. Nakaguchi, W. Yamasaki, Y. Iwade, A. Sugiyama, P. Sukhumungoon, V. Vuddhakul, L. Feng, T. Koitabashi, M. Nishibuchi. Pandemic spread of infections by the new clone of *Vibrio parahaemolyticus*: a vehicle for international spread in Asia is molluscan bivalve.

44th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. カリフォルニア州サンディエゴ (米国). 平成 21 年 10 月 13 日.

- 8) Radu, S. C. L. Ching, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. Biosafety of thermophilic *Campylobacter* spp. from vegetable farms to consumption level. 44th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. カリフォルニア州サンディエゴ (米国). 平成 21 年 10 月 14 日
- 9) 岩出義人, 永井佑樹, 杉山明, 河村誠, 瀬尾晃司, 中口義次, 西瀨光昭. 畜養前後におけるハマグリの細菌数の変化. 日本食品微生物学会 30 周年記念学術総会. 東京都江戸川区. 平成 22 年 10 月 20 日 .
- 10) Sukhumungoon, P., 中口義次, 岩出義人, 勢戸和子, J. Pradutkanchana, S. Radu, 西瀨光昭, V. Vuddhakul. タイ南部で市販されている牛肉 (マレーシアからの輸入牛肉を含む) に含まれる *stx2* 遺伝子陽性大腸菌 O157 の解析. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会. 大阪府. 平成 21 年 11 月 14 日 .
- 11) Pharanai Sukhumungoon, Yoshitsugu Nakaguchi, Yoshito Iwade, Kazuko Seto, Jintana Pradutkanchana, Son Radu, Mitsuaki Nishibuchi, Varaporn Vuddhakul. Isolation of Shiga toxin gene-bearing *Escherichia coli* O157:H7 from beef marketed in Southern Thailand including the import from Malaysia and the relationship among the isolates. The 2nd Thai-Japan International Academic Conference (TJIA2009). 京都市. 平成 21 年 11 月 20 日
- 12) 山崎渉, 久米田裕子, 中口義次, 西瀨光昭. LAMP 法による腸炎ビブリオ *tdh*, *trh1*, *trh2* の簡易迅速検出法の開発. 第 43 回腸炎ビブリオシンポジウム. 岡山市. 平成 21 年 11 月 27 日.
- 13) Pharanai Sukhumungoon, Yoshitsugu Nakaguchi, Yoshito Iwade, Kazuko Seto, Jintana Pradutkanchana, Son Radu, Mitsuaki Nishibuchi, Varaporn Vuddhakul. Molecular relationship of *stx2+*, *eae+* strains of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from beef produced in Thailand and those imported from Malaysia to Thailand. 第 43 回腸炎ビブリオシンポジウム. 岡山市. 平成 21 年 11 月 27 日.
- 14) 瀬尾晃司, 権平文夫, Pharanai Sukhumungoon, Varaporn Vuddhakul, 山崎渉, 中口義次, 杉山純一, 西瀨光昭. 腸炎ビブリオの 2 種類の新 K 抗原型: 臨床株および環境株におけ

る分布とパンデミッククロンの系統解析への応用. 第 43 回腸炎ビブリオシンポジウム. 岡山市. 平成 21 年 11 月 27 日.

- 15) 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
- 16) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of bacterial infections. 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Kolkata, India, April 6-9, 2009
- 17) 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
- 18) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of infectious diseases. 12th ISTC-SAC Semina – Combating Global Infections -, Irkutsk, Russia, September 21-24, 2009
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) Iida, T. : Metagenomic analysis of infectious diseases. NSC-JST Infectious Disease Workshop“Host-Pathogen Interaction”, JST Innovation Plaza Kyoto, Nov. 16-17, 2009
- 23) 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

- 24) Iida, T. : Metagenomic diagnosis of infectious diseases. NSFC-JSPS 第3回日中科学フォーラム、Wuhan, China, March 15-16, 2010
- 25) Iida, T. : Metagenomic analysis of infectious diseases. The 10th Japan-Korea International Symposium on Microbiology、Pacifico Yokohama, March 26, 2010
- 26) Iida, T. : Metagenomic analysis of intestinal microbiota in infections. 国際シンポジウム Gut defense and microbial infections, 第83回日本細菌学会総会 パシフィコ横浜、2010年3月27-29日
- 27) 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、上原さとみ、齊木 大、新井輝義、門間千枝、高橋正樹、仲真晶子、甲斐明美：食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出と分離菌株の性状、第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、大阪、2009
- 28) Osawa, R.: Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 strains, The 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, in Kolkata, India (2009. 4).
- 29) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール O1, O139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析」日米コレラ国内総会(2009. 7)
- 30) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール O1, O139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析」第43回腸炎ビブリオシンポジウム (2009. 11)
- 31) 三戸部治郎、渡邊治雄. 赤痢菌 Type III Secretion system の Post-transcriptional な発現制御に関わる新規 RNA 結合蛋白の解析. 第82回日本細菌学会総会. 名古屋国際会議場. 2009年3月12-14日.
- 32) Jiro Mitobe. Bacterial cytoskeletal protein RodZ (YfgA) involves expression of Type III secretion system in *Shigella sonnei* through the post-transcriptional processing. US-Japan Cooperative Medical Science Program 44th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. P. 122 . San Diego California. Sept. 12-14 2009.
- 33) Kinno Suke Yahiro, Naoko Moringa, Masatoshi Noda. Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells via mitochondrial membrane damage. Cholera and other bacterial enteric

infections. 44th annual joint panel meeting. San Diego, USA. 136-140, 2009.

- 34) 島 綾香、日根野谷 淳、杉本典彦、朝倉昌博、山崎伸二：下痢症患者から分離した *Providencia alcalifaciens* が産生する細胞膨化致死毒素の性状 第62回日本細菌学会関西支部総会 2009年11月、大阪
- 35) Shima, A., A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, Shah M. Faruque, and S. Yamasaki. Cytolethal distending toxin: a novel virulence factor produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patients. 44th Annual Joint Panel Meeting on cholera and other bacterial enteric infections. October 12-14, 2009, San Diego, USA.
- 36) Shima, A., A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, and S. Yamasaki. *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patient produces cytolethal distending toxin. One hundred ninth of General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Pennsylvania, USA.
- 37) 藤井 潤, 吉田真一 腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究 第82回日本細菌学会総会 日本細菌学会誌 Vol.64 No.1 98頁 演題番号 P1-098 132頁 2009年3月12日 名古屋
- 38) 藤井 潤. レジオネラ感染細胞の運命 第82回 日本細菌学会総会 日本細菌学会誌 Vol.64 No.1 98頁 演題番号 WS17-4 2009年3月14日 名古屋
- 39) 藤井 潤 Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbits. 日米コレラ部会 (日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会) 日本側総会 プログラム会務報告2番 3頁 2009年7月29日 京都
- 40) 藤井 潤, 松田史子, 吉田真一 A/J マウスマクロファージにおいてレジオネラは、オートファジーによって殺菌される 第62回日本細菌学会九州支部総会 プログラムおよび抄録集 4頁 2009年9月4日 佐賀
- 41) 藤井 潤. 牛レバーやユッケなどの生食の危険を伝えることによる腸管出血性大腸菌感染予防対策の実現性を考える 第13回腸管出血性大腸菌シンポジウム プログラム抄録集 6頁 2009年10月16日 大阪
- 42) Yabe, S., Y. Iwao, T. Takano, A. Nishiyama, O. Razvina, T. Yamamoto. Multilocus sequence typing

of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* –global molecular epidemiology-. 44th US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (San Diego, USA), 2009(10月)

- 43) Yabe, S., Y.Iwao, W.Higuchi, H.Isobe, T.Takano, T.Yamamoto. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken stools and from patients with gastroenteritis and Guillain-Barré syndrome in Japan. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)
- 44) Iwao, Y., S.Yabe, W.Higuchi, T.Takano, T.Yamamoto. Characterization of the motility of *Campylobacter jejuni*, a spiral rod with a single polar flagellum at both ends. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)
- 45) Nishiyama, A., S.Yabe, W.WHiguchi, T.Takano, T.Yamamoto. Potent anti-*Campylobacter jejuni* activity of carbapenems and the mode of action. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)
- 46) 矢部 静、岩尾泰久、高野智洋、西山晃史、山本達男。(シンポジウム：血清型別および遺伝子 (DNA) 型別) *Campylobacter jejuni* と *C. coli* の ST 型別 –グローバル分子疫学解析-。第2回日本カンピロバクター研究会 (新潟), 2009 (9月)
- 47) 岩尾泰久、矢部 静、高野智洋、西山晃史、山本達男。わが国で分離された *Campylobacter jejuni* の ST 型解析。第2回日本カンピロバクター研究会 (新潟), 2009 (9月)
- 48) Mainil J., Ooka T., Bardiau M., Ogura Y., Itoh T., and Hayashi T. : IS detection in O26 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 49) Asadulghani Md., Ooka T., Islam Md. R., Ogura Y., Iguchi A., Nakayama K., and Hayashi T.: Generation of new Stx1 phages by recombination of Stx2 and Stx1 phage genomes. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 50) 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Md Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における LEE 領域の多様性解析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.

- 51) Islam Md. R., Ogura Y., Asadulghani Md., Ooka T., Nakayama K., Iguchi A., Murase K., and Hayashi T.: Functional analyses of unknown genes of Stx2 phage (Sp5) from O157:H7 Sakai. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 52) 立山直, 小椋義俊, モハメド・アサドルゴニ, 松岡博史, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲・非侵襲性疾患と環境分離 *Aeromonas* 株の系統分析と表現型病原因子の分布. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 53) 小椋義俊, 安倍裕順, 黒川顕, モハメド・アサドルゴニ, 井口純, 大岡唯祐, 中山恵介, 服部正平, 戸邊亨, 林哲也: Fosmid mapping 法と Whole genome PCR scanning 法を用いた腸管病原性大腸菌 B171 株の genomic island の網羅的な同定と配列決定. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 54) Hayashi T.: Whole genome sequencing analysis of O26, O111, and O103 EHEC. VTEC2009 (7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)- Producing *Escherichia coli* Infections), 5/12, 2009, Buenos Aires. (Invited Speaker)
- 55) Murase K., Ooka T., Iguchi A., Asadulghani Md., Ogura Y., Nakayama K., and Hayashi T.: Variation of hemolytic activities in the O55/O157 *Escherichia coli* lineage. VTEC2009 (7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)- Producing *Escherichia coli* Infections), 5/12, 2009, Buenos Aires.
- 56) Hayashi T.: Systematic analysis of small-size structural polymorphisms in EHEC O157 genomes: inference of the impact of IS elements on bacterial genome diversification and application to the development of a rapid strain-typing system for O157. 日米コレラ部会日本側総会、7/29, 京都
- 57) 大岡唯祐, 小椋義俊, 村瀬一典, Islam Md. Rakibul, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における III 型分泌系コード領域 (LEE) の構造比較解析. 若手研究者育成のためのワークショップ～若手コロセウム (III) in 宮崎～. 10/27, 2009. 宮崎
- 58) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, Asadulghani, Islam Md Rakibul, 山崎和子, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌 O55/O157 系統における溶血因子の解析. 若手研究者育成のためのワークショップ～若手コロセウム (III) in 宮崎～. 10/27, 2009. 宮崎

- 59) Hayashi T.: Genomic view on the parallel evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nov. 26, 2009. Nagasaki. (Invited Speaker)
- 60) 林哲也: 大腸菌をはじめとする細菌の大規模比較ゲノム解析.九州微生物研究会, 12/11, 福岡
- 61) 林哲也 (招待講演): 病原性大腸菌のゲノム解析からみた細菌の進化・多様化と遺伝子水平伝播の役割. Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology, 1/19, 2010, Osaka
- 62) 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 病原性大腸菌 O157:H7 の志賀毒素変換ファージの比較解析.第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 63) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 病原性大腸菌における3型分泌系(T3SS)の進化.第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 64) 村瀬一典, 大岡唯祐, Islam Md Rakibul, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 種々の大腸菌株を用いた溶血毒素遺伝子の解析. 第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 65) 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素ファージの比較解析.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 66) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における3型分泌系(T3SS)の進化.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 67) 村瀬一典, 大岡唯祐, Islam Md Rakibul, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 種々の大腸菌株における溶血毒素遺伝子の保有状況とその活性.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 68) Islam Md. R., Ogura Y., Asadulghani Md., Murase K., Ooka T., akayama K., Iguchi A. and Hayashi T.: Functional analyses of the late region genes of Stx2 phage from O157: H7 Sakai. 第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.

- 69) 立山直, 小椋義俊, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲 (劇症型を含む)・非侵襲性疾患と環境分離 *Aeromonas* 株の系統分析と表現型病原因子の分布.第 83 回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 70) 神谷 茂: プロバイオティクスの医学における可能性、東京内科会消化器セミナー「腸機能とプロバイオティクス」(平成 21 年 6 月 6 日、東京)
- 71) 大腸菌におけるコレラ毒素及びその変異毒素の過剰発現系の作製
有満秀幸、塚本健太郎、越智定幸、佐々木慶子、辻 孝雄
- 72) 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの配列解析
越智 定幸、有満 秀幸、塚本 健太郎、大谷 郁、佐々木 慶子、加藤 道夫、清水 徹、辻 孝雄
- 73) ボツリヌス D 型神経毒素と Phosphatidylethanolamine の相互作用の解析. 塚本 健太郎、越智 定幸、有満 秀幸、中村 佳司、小崎 俊司、辻 孝雄. (以上第 82 回日本細菌学会(名古屋市))
- 74) ボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の脂質受容体に対する結合活性
塚本健太郎、田中良和、Nipawan Nuemket、越智定幸、有満秀幸、Neri Paola、佐々木慶子、中村佳司、小崎俊司、辻 孝雄
(第 56 回トキシシンポジウム(岐阜市))
- 75) 毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの接合伝達領域
越智定幸、有満秀幸、塚本健太郎、大谷 郁、佐々木慶子、加藤道夫、一瀬休生、清水 徹、辻 孝雄
- 76) EC 細胞を用いたボツリヌス神経毒素重鎖 C 末端領域の機能解析
塚本健太郎、有満秀幸、越智定幸、Neri Paola、佐々木慶子、辻 孝雄
以上第 46 回日本細菌学会中部支部総会(名古屋市)
- 77) Construction of over-expression and purification system of cholera toxin and its mutants in *Escherichia coli*. Hideyuki Arimitsu, Kentaro Tsukamoto, Sadayuki Ochi, Keiko Sasaki, Michio Kato and Takao Tsuji. 44th Joint Meeting and Conference of the United States-Japan Panel on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections in San Diego.