

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

細菌性バイオテロに対する迅速同定法・診断法
およびワクチンの開発

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学・畜産学部
江崎孝行 国立大学法人岐阜大学・医学部
川本恵子 帯畜大・動物・食品衛生研究センター

研究要旨 2001年にアメリカで起こった炭疽菌芽胞を使ったバイオテロにより、生物兵器による無差別攻撃に速やかに対応し、安全・安心な社会を構築することが求められている。危険病原体による感染症の蔓延を防ぐ技術開発も危機管理体制の強化の一つとして急務の課題である。本研究では細菌性バイオテロに焦点をあて、危険病原体およびその毒素の迅速同定法・診断法および予防法としてワクチンの開発研究と、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。また、植物毒素であるリシン毒素の迅速検出法開発についても併せて行う。

A．研究目的

2001年9月11日の米国ニューヨーク世界貿易センタービルへの航空機テロ後に、炭疽菌芽胞混入郵便物によるバイオ（生物）テロが起こり、世界的に関心が高まった。わが国では‘白い粉’による多数の摸倣事件が起こり、その後、2004年の「国民保護法」の制定、2006年の感染症法改正による「特定病原体等」の管理などをはじめとした内閣危機管理室を中心として関係省庁で対応体制が構築されてきた。病原体等の入手と取扱いそして迅速診断・同定法に関する科学的情報は、バイオテロの脅威に対抗する上で、当初より管理ないし制限されてきた。一次対応機関で用いる検査キットの多くはブラックボックス状態で使用せざるを得ない状況にある。病原体等の由来を知るには塩基配列の情報が必要であるが十分公開されていない。対応のアルゴリズムは米国や英国の関連機関からも公表されているが、わが国の実情に即したものを、わが国独自に開発していくことが必要となる。バイオテロは病原体等が散布されて患者発生まで

に潜伏期があり、稀な疾患であるため、早期検知には一次医療機関の医師等への臨床診断支援が必須で、環境中および患者検体から原因病原微生物の迅速な検出と同定、かつ確認のために患者の血清抗体検査や病原体等の分離同定が必要となる。BSL4病原体以外は地方衛生研究所や国立感染症研究所の設備で可能である。さらに病原体の由来を知るためには塩基配列の解析とデータベースが重要である。現在までに多くの病原体等（毒素を含む）の迅速診断法を開発し、臨床診断支援のマニュアルやバイオテロ対応ホームページを作製した。またプロトタイプの網羅的迅速診断法も開発した。しかし病原体の入手が困難なことから特異性の検討は十分とはいえず、鑑別診断とその普及および検査ネットワーク整備に問題を残している。ホームページの活用には、画像が有力な情報となるがいまだ少なく、疾患の追加、治療法や除染法を含めた内容のアップデートそして実際の対応体制の整備も不十分である。当分担研究班では、バイオテロ関連病原体等の迅速診断検査、抗体検査、病

原体分離同定法、特に特定病原体等の中の細菌性感染症を中心として、網羅的な検出・検査法を確立し、広く社会に還元することを目的として研究を遂行する。

対象として各種ウイルス、リケッチア、細菌、毒素等のバイオテロに使用される可能性がある病原体が想定されるが、特に炭疽菌は芽胞としての安定性、乾燥や熱に対する抵抗性、比較的簡単に培養ができることなどから生物兵器の最有力候補として常に注目をあびてきた。炭疽菌は危険度レベル3に属する細菌で、他にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、結核、チフス、ブルセラが細菌としてこのレベルに入る。その中で、生物兵器として使用可能なものは炭疽以外にペスト、鼻疽/類鼻疽、野兔病、チフス、ブルセラが想定されるが、検査法や治療法、さらには診断法がまだ確立されていない菌種は鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラである。そこで、本研究では、危険度を考慮して炭疽菌の検出法の更なる改良・開発、および鼻疽/類鼻疽、野兔病、ブルセラ症などの危険度3に属する病原体に対する検出・診断法の確立及び治療・予防法の開発や改良を行い、患者検体および環境中からの迅速な検出および診断法の開発を行う。診断法の実用化に当たっては事件発生現場での利用が可能な方法と、検査室における方法の両面からの実用化を目指す。さらに、種々の化学物質および薬剤に対する病原体の感受性に関する検討を行い臨床利用に備える。また、従来のワクチンを基盤とした免疫誘導能が高いワクチンの開発を検討する。

今年度、本研究班では、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの持続期間および気道チャレンジにおける発症予防効果の検討と抗分泌型組換えリシン抗体の作製、複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発、細菌性毒素の検出系のキット化への取り組みを行なった。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は、グラム陽性の芽胞形成桿菌で、人獣共通感染症の炭疽を引き起こす微生物である。炭疽は、感染経路の違いにより、皮膚炭疽、肺炭疽、腸炭疽の3つの病型をとる。そのうち、肺炭疽は本菌芽胞の吸入によって引き起こされる致死率の高い感染症である。現在、米国や英国で用いら

れているヒト用ワクチンは、毒素産生株の培養上精を用いた成分ワクチンであり、その接種対象は限られている。また、十分な免疫効果を維持するために、複数回の筋注投与と年1回の追加投与が必要であり、接種による副作用も報告されるなど、簡便性および安全性が問題視されている。そのため、有事の場合の大量免疫に使用できず、より安全で、より有用なワクチンの開発が必要とされている。

昨年度の研究で、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞と栄養体の両方に発現するEA1を同定し、これを免疫抗原とした経鼻免疫により炭疽の発症が予防できることを見出した。本年度は実際の感染ルートを模して経鼻的に炭疽菌をチャレンジした場合の予防効果について検討するとともに、粘膜免疫の持続期間について検討した。

リシンは、トウゴマ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク毒素で、分子量約 30 kDa のAサブユニットと分子量約 32 kDa のBサブユニットからなり、天然有機化合物のなかでも毒性の強い化合物の一つである。リシン毒素はA、B二つのサブユニットから構成される。毒素活性を持つのはAサブユニットで、Bサブユニットは標的細胞の受容体に結合し、Aサブユニットを細胞内へと輸送する。リシンの致死量は、成人の場合、20-30 µg/kg で、吸入で約4-8時間、経口投与では、約10時間で中毒症状が現れる。現在のところ、本毒素に対する有効な解毒剤は存在しない。また、これまでにテロや犯罪における使用歴がある。そのため、本毒素の迅速検出法は、安心・安全な社会構築のため急務である。毒素の致死量が低く、リシンと同様の症状を示すその他の細菌毒素も存在することから、高感度で、類症鑑別も可能となる検出法の開発が望ましい。本研究では、細菌毒素検出に加え、テロ使用での危険性が高い植物毒素であるリシンの検出法開発も併せて行う。

細菌毒素に関しては、CDCの生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素 (CT) と LT (カテゴリーB: Enteric Pathogens)、黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン (SEA&SEB、カテゴリーB: Enteric Pathogens) 及び TDH (カテゴリーB: Enteric Pathogens) 等に対する免疫学的迅速同定法を確立して検査・診断マニュアルを作成し、その普及を目的としている。研究対象の細菌毒素は食中毒の原因となるた

め検査キットが市販されているものもあるが、本研究では食品を用いたバイオテロに対する網羅的迅速同定法を国産で供給できるような体制作りを目的とする。CT および LT に対する家兎抗血清を作製して各毒素に対する ELISA 系及び Immunochromatography (IC) を構築し、それぞれの抗血清の特異性の検証を行った。一方で富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生より供与された 2011 年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件（ユッケを原因食品とする）の患者便を試料とし、高感度免疫学的検出法を用いた患者便からのシガ様毒素(Stx1 および Stx2)の直接検出系について検討した。

B . 研究方法

B - 1 . リシン毒素検出系の構築

1. リシン毒素検出系の構築 :

リシンのトウゴマからの抽出は、化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律に抵触するため、実験室レベルの検討に使用することは困難である。そこで、毒素活性は持たないが毒素の構成成分として必須である B サブユニットの組換え体を作製し、これを抗原として高親和性抗体の作製を行っている。

昨年度は *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行い、シグナルペプチドを組み込んだ N 末 His タグを付加した分泌型 RTB 発現株の作製に成功した。本年度はこの株を 2SLN 培地で 30、2 日間培養し、得られた上清から His タグカラムを用いて分泌型 RTB の精製を行った。これを抗原として家兎（雌、日本白色種、3 kg）にアジュバント（TiterMax）と共に皮下免疫した。免疫は 2 週間毎に 3 回繰り返し、抗体価は ELISA により得られた抗血清から IgG 抗体画分を精製した。

B - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H24 年度の研究において炭疽菌芽胞と栄養体の両者の表層に存在する EA1 を免疫抗原に利用した粘膜免疫ワクチンが炭疽発症予防効果をもつことを実証した。本年度は、EA1 粘膜免疫の持続期間について検討し、さらに実際の感染経路のひとつである気道感染を行い、EA1 の粘膜免疫によるワクチン効果を検討した。

実験動物は 8-10 週齢の BALB/c マウス（ ）を用い、イソフルラン麻酔後、鼻孔より 10 µg となるように 5 ~ 10 µl の組換えタンパクを投与することで経鼻免疫した。粘膜アジュバントとして合成二本鎖 RNA の poly (I:C)（InvivoGen, San Diego, CA, USA）を用いた。EA1 を既知の炭疽菌ワクチン分子である PA（List Biological Laboratories）とそれぞれ単独、あるいは組み合わせて、Poly(I:C)アジュバント併用下で週 3 回、計 3 週間、経鼻投与した。アジュバントのみの投与群を対照群とした（表 1）。免疫開始時および最終免疫から最大 15 週間までの期間、定期的に各群のマウスから血液、糞便、唾液を採材し、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。抗体価が十分上昇したのを確認後、ブースト免疫をかけ、3 日後に全採血した。得られた免疫血清から Protein A カラムを用いて IgG を精製した。感染実験には、*B. anthracis* Pasteur II 苗（pXO1⁺, pXO2⁺）を使用し、培養には BHI あるいは TSA を用い、37°C で培養した。炭疽菌芽胞は栄養体の混入のない高純度の芽胞を精製した。炭疽菌芽胞液（約 7.6 × 10⁴ CFU/mouse）は PBS に懸濁して調整した。投与に使用した芽胞液は、10 倍段階希釈した後、L-agar に塗布し、37 で一晚培養後、出現したコロニー数を計測し、正確な投与菌数を算出した。20 µl の芽胞液を BALB/c マウスの鼻腔から 2 回に分けて投与した。投与後、マウスの臨床状態を定期的に観察し、生存率を測定した。各群の生存率曲線はログランク検定により有意差の有無を解析した。

B - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24 年度までに作製した抗 CT 抗体を用いてコレラ毒素に対するイムノクロマトを作製した。イムノクロマトの作製は（株）日本ハム中央研究所にて行った。作製したイムノクロマトについて精製組換え CT タンパク質および CT 発現コレラ菌株を用いた検出感度の検証を行った。本研究ではコレラ毒素の発現を惹起するために AKI 培地を用いた 2 層培養法（4 時間の静置培養の後に 6 時間の振とう培養を行う）を採用した。また精度の検定を目的として、CT と高い相同性を持つ大腸菌の易熱性下痢毒素 LT タンパク質および LT 産生大腸菌株、さらにコレラ菌と同じビブリオ属菌である腸炎ビブリオを用いた検定を行った。

B - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

2011年に発生した腸管出血性大腸菌による広域食中毒事件(ユッケを原因食品とする)の患者便からStx1およびStx2の直接検出を試みた。試料は富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生と綿引正則先生より供与された。試料はリン酸緩衝液に懸濁したのちに直接試験に供した。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いたBead-ELISA法(検出限界はStx1: 500 pg/ml、Stx2: 250 pg/ml)を利用した。

B - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

複数の病原体を同時検出できる核酸クロマトの開発を行った。病原体を含む検査材料100 μlをジルコニアビーズが充填されたチューブに加え、100℃で3分間加熱後、1分間ボルテックスし、遠心後上清を回収し核酸を抽出した。5 μlを鋳型として、処理特異的プライマー領域に非特異的な共通配列のタグ配列を付加したプライマー、タグ配列プライマー、ビオチン標識配列を混合し、PCR反応を行った。続いて増幅産物とストレプトアビジン標識ラテックスビーズを混合し、核酸クロマトにて増幅を確認した。原理を図7に示す。

(倫理面への配慮)

病原体の使用は、病原体等安全管理委員会規則に従って、使用、保管等を行った。動物実験は所属研究機関の動物実験委員会の審査許可を受けて行われ、DNA組換え実験や病原体の取り扱いには法令に従い安全性を考慮して実験を実施した。

C . 研究結果

C - 1 . リシン毒素検出系の構築

分泌型組換えRTBの免疫により、目的の特異抗体を得ることができた。この抗体は相同性の高いその他の毒素に対して交差反応を示さなかった。

C - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

表1に実験群を示す。PAとEA1をそれぞれ単独、あるいは組み合わせて、Poly(I:C)アジュバント併用下で週3回、計3週間、経鼻投与した(B群:PA, C群:EA1, D群:PA+EA1)。

アジュバントのみの投与群を対照群とした(A群)。経鼻免疫によりB-Cの免疫群における血中IgGおよびIgA、粘膜中IgAの抗体価が上昇していた。すなわち、B群ではPA、C群ではEA1、またD群ではPAおよびEA1に対する血中および粘膜中の特異抗体価がそれぞれ誘導されていた(図1,2)。抗体価の上昇を確認後、最終免疫以降の抗体価の推移を調べたところ、血中IgGについては最終免疫時と同程度の抗体価が維持されていた。しかし、血中IgAは最終免疫後経時的に減少し、15週目では最終免疫時の抗体価を示す吸光度が半分以下にまで減少した。一方、粘膜中IgAは唾液では13週目までは経時的に漸減し、15週目ではピーク時(4週目)の1/4にまで吸光度は減少した。糞便IgAは唾液IgAに比べ抗体価は大きく減少し、15週目では対照群との間に有意差が認められないほどであった。15週目に抗原を1回だけ経鼻投与したところ、全ての群において4週目より高い吸光度が観察されるなど、強いブースト効果が認められた。

続いて、肺炭疽の感染経路である気道感染による感染実験をこれらの実験群で行った。図3に生存曲線を示す。対象群のA群では、気道チャレンジ後3日目からマウスは死亡し、最終的な生存率は20.0%であった。PA免疫群(B群)、EA1免疫群(C群)およびEA1とPA免疫群(D群)の生存率はそれぞれ、37.5%、83%、75%であった。ログランク検定による生存率曲線の統計解析の結果、A群に比べ有意差が認められたのはC群とD群で、B群では有意差はなかった。また、EA1単独のC群がEA1とPAの2重投与したD群より高い生存率を示したが、ログランク検定では両群間に有意差は認められなかった。

C - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

H24年度までに作製した抗CT抗体を用いて作製したコレラ毒素に対するイムノクロマト(CT-IC)の感度について明らかにする目的で段階希釈した精製組み換えCTタンパク質について検査を行い、CT-ICが10ng/ml濃度(サンプル量: 100μl)のCTを検出可能である事を明らかにした(図4)。また、特異性の検証を目的としてCTと非常に高い相同性を有する大腸菌のheat-labile toxin(LT)について同様の検証を行った結果、CT-ICは100ng/mlのLTに対して

も擬陽性を示さず、CT-ICが高い特異性を持つことが示された。さらに*ct*遺伝子(+)コレラ菌株15株及び、*ct*遺伝子(-)コレラ菌株5株について検査を行った結果、*ct*遺伝子(+)株すべてにおいてCT-ICによるCTの検出が可能であった。一方で*ct*遺伝子(-)株において偽陽性は検出されなかった(図5)。

特異性の検証を目的としてLT産生大腸菌および腸炎ピブリオについて検査を行った(図6)。LT産生大腸菌株は検査に供した12株のうち3株で非常に弱いシグナルが検出されたものの9株では擬陽性は検出されなかった。また腸炎ピブリオでは検査に供した7株全てで偽陽性の検出は観察されなかった。

C - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒事件は本邦において大きな社会問題となる事が多い。本年度の研究では2011年に5名の死者を出し大きな社会問題となったユッケを原因とした広域食中毒事件の患者便からのStx1およびStx2毒素タンパク質の直接検出を試みた。検出系としては抗Stx1抗体結合ビーズおよび抗Stx2抗体結合ビーズを用いた高感度免疫学的検出系(Bead-ELISA法)を利用した。9名の患者より採取された便について検査を行ったところ、それぞれ4名の患者便よりStx1およびStx2の検出が可能であった(表2)。このうちStx1を検出した検体番号OB4においては、大腸菌の検出がなされておらず、また検体番号OB5においては遺伝子検査において*stx*遺伝子が検出されていたにもかかわらずStxタンパク質の検出には至らなかった。これらの結果から病原性大腸菌の毒素産生性検査を含む細菌感染症の原因物質の同定において原因菌の分離培養に加え遺伝子検査やタンパク質をターゲットとした免疫学的検査を併用することの重要性が示された。

C - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

今年度はボツリヌス菌検出用の核酸クロマトを作成した(図8)。核酸クロマトの検出感度は従来のPCR法に比べ約10倍高く、かつ1時間以内で検出可能であった。

D . 考 察

D - 1 . リシン毒素検出系の構築

H23に作製した大腸菌による組換えRTBを抗原として得られた特異抗体は検出感度が低く、組換え蛋白は大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、様々な手法でリフォールディングを試みたが、凝集を完全に抑制することは困難であり、このような状態では立体構造に変化が生じている可能性がある。天然型リシンと反応する抗体を得るために、昨年度はシグナルペプチドを付加した分泌型RTBの発現株を作製し、今年度の研究において立体構造を保持したRTBを認識する特異抗体を得ることができた。現在、本抗体を利用したイムノクロマトの作製に着手している。

D - 2 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

炭疽菌の病原性は、芽胞の発芽、栄養体の増殖、毒素の産生、の3つの段階から成り立っている。炭疽菌は増殖速度が早く、血中で劇的に菌数が増加する。現行のヒト用炭疽ワクチンは炭疽菌が産生する毒素の一つである防御抗原(PA)を主成分とし、炭疽菌の産生する毒素の作用を阻害することはできるが、芽胞の発芽や栄養体の増殖を防ぐことは難しい。EA1は炭疽菌の栄養体と芽胞の両者の表層に発現していることから、EA1を標的とした免疫により、芽胞及び栄養体に対する2重の防御効果が期待できる。我々は、これまでの侵襲性のワクチンで問題となっていた接種部での副作用を回避し、接種を簡便化するため、EA1の経鼻投与による粘膜免疫誘導による炭疽防御効果について検討してきた。粘膜免疫は全身免疫と粘膜免疫を誘導できる。炭疽菌は気道や消化管、創傷部位の粘膜を介して感染するため、粘膜免疫の誘導は効果的な感染防御に重要である。

EA1粘膜免疫の持続期間について検討したところ、血中特異抗体価については最終免疫から3ヶ月後も高い抗体価を維持しており、特に血中IgGについては最終免疫時とほぼ同程度の抗体価を示していた。一方で、粘膜中の特異抗体価については経時的な減少が見られた。免疫部位の鼻粘膜から遠位にある腸管粘膜中の特異的IgAは最終免疫から3ヶ月後は非免疫群の対象群と同程度にまで減少した。一方、免疫部位から近位粘膜である唾液中の特異的IgAの抗体価はピーク時より半減していたが、比較的高い抗体価が維持されていた。

また、抗体価が減少しても追加免疫することで以前より高い抗体価を短時間に誘導できることから、初回免疫後は約3ヶ月おきの追加免疫で十分高い抗体価を維持できると思われる。米国で使用されているヒト用炭疽ワクチンは、4週間隔で2回筋注して初回免疫を誘導し、6, 12, 18ヶ月後に追加の皮下接種を行う。その後は1年毎の追加免疫という煩雑で外科的侵襲性のある接種プロトコルである。今回の我々の粘膜ワクチンにおいても抗体価の維持には約3ヶ月毎の追加免疫が必要であることが示唆されたが、経鼻免疫は簡便で被接種者にストレスがなく、状況によっては自分で接種することも可能である。今後は、持続的に接種部位の免疫応答を刺激できるような除放性キャリアを利用することで投与間隔の延長や効果的な免疫誘導を検討する必要がある。

またPA単独免疫では肺炭疽の発症が予防できないことが以前から指摘されていたが、今回の検討においても同様の結果が得られた。おそらく、PAを標的とした免疫応答では、体内に侵入した炭疽菌芽胞の発芽と栄養体の増殖を抑制することができないため、増殖した菌により産生される毒素量を十分に中和できる抗体価が誘導されていない場合、毒素の作用を完全に阻害することが難しいと思われる。一方で、EA1は単独免疫で炭疽菌感染に対する有意に優れた防御効果を示した。EA1の経鼻免疫は粘膜および全身免疫を刺激し、気道内に侵入した炭疽菌を効果的に排除することで、感染個体における炭疽の発症を予防したと考えられる。

D - 3 . コレラ毒素に対するイムノクロマトの精度検定

コレラ菌の中でコレラ毒素を産生する株のみが病原性を発揮するため、コレラが疑われる患者に対する検査においては菌の検出に加え、検出された菌の毒素産生性を明らかにする事が重要となる。本年度の研究においてはコレラ毒素に対する免疫学的迅速検査法を開発しその特異性および感度の検証を行った。開発された方法は大腸菌の易熱性下痢毒素(コレラ毒素と80%以上の相同性を持つ)とコレラ毒素を10倍以上の感度で判定可能な非常に特異性の高い方法であった。感度においては10 ng/ml程度を検出限

界としており食品や糞便からのコレラ毒素の直接検出に十分な感度とは言い難かった。今後、培養法との併用を含め開発されたイムノクロマト法の使用法および用途についての検討が必要である。

D - 4 . 患者糞便からのシガ様毒素直接検出

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒事件は大きな社会問題となる事が多く、また過去の事例では風評被害などの問題もみられるなど、より慎重な原因物質の特定が求められる場合が多い。本年度の研究では実際に本邦において大きな社会問題となった食中毒事件の患者より分離された株を用いた検査を行い、複数の検査法を用いて原因物質の特定することの重要性を示した。本研究で用いたBead-ELISA法は免疫学的検出系の中でも特に高い検出感度(数十~数百pg/ml程度)を実現する事が可能となっており、前述のCDCが指定する生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素に対する検出系の構築も可能である。我々は現在様々なタンパク毒素に対する特異的抗体の構築を進めており、今後、作出される抗体を用いた高感度免疫学的検出系の構築を進めていく予定である。

D - 5 . 複数の病原体を検出できる核酸クロマトの開発

単独プライマーは高感度であるが、複数の病原体を一つ一つ増幅して検査しなければならず、手間と時間がかかる。複数の病原体を同時に調べる方法としてmultiplex PCR法があるが、プライマーの組み合わせに制限があり、単独プライマーに比べ感度は劣る。本技術では多種類のプライマーを混合しても単独プライマーと同等の感度を達成でき、かつ特異的増幅をDNAクロマトで目視により5分で確認できるため、増幅の有無に高価なリアルタイムPCR装置や面倒な電気泳動などを必要としない(図9)。そのため本システムは生物剤の現場での検出に適用できるだけでなく、検査や感染症の集団発生時にも利用できる。

E . 結 論

1. 天然型リシンの認識が可能と思われる抗リシン B サブユニット特異抗体を作製し

- た。
2. マウス肺炭疽モデルにおいて EA1 は現行ワクチンの主成分である PA 単独に比べ優れた防御効果を示した。
 3. 粘膜中の EA1 抗体価を維持するためには 2-3 ヶ月毎の追加免疫が必要である。
 4. コレラ毒素に対して特異性の高いイムノクロマト法を開発した。
 5. 腸管出血性大腸菌感染症患者便から免疫学的迅速同定法 (Bead-ELISA法) により直接、シガ様毒素の検出を行った。
 6. 現場や野外で使用できる迅速・簡便な核酸クロマト法を開発した。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表

論文発表

1. Firew Kassa Esho, Budbazar Enkhtuya, Akiko Kusumoto and Keiko Kawamoto. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan, *BioMed Research International*. 2103: 205801, 2013.
2. Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *BioMed Research International*. 2103: 295050, 2013.
3. Kusumoto A, Miyashita M, Kawamoto K. Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella enterica* into a viable but non-culturable state. *Res Microbiol*. 164(4):335-41, 2013.
4. Ohji S, Yamazoe A, Hosoyama A, Tsuchikane K, Ezaki T, Fujita N., The Complete Genome Sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164T Confirms High Intraspecies Variation. *Genome Announc.* ; 2(1). pii: e00029-14, 2014.
5. Mori S, Imamura F, Koga Y, Uramoto H, Ezaki T, Sugimoto M., Pulmonary Mycobacterium abscessus disease in a patient receiving low-dose methotrexate for treatment of early rheumatoid arthritis. *J Infect Chemother*. 19(6):1146-51, 2013.
6. Ogura M, Yano H, Sato M, Nakamura A, Wakimoto Y, Ohkusu K, Ezaki T., Comparative analysis of MRSA strains isolated from cases of mupirocin ointment treatment in which eradication was successful and in which eradication failed. *J Infect Chemother*. 19(2):196-201, 2013.
7. Zaw MT, Yamasaki E, Yamamoto S, Nair GB, Kawamoto K, Kurazono H: Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. *Gut Pathog*. 5: 13, 2013
8. Nitaya Indrawattana, Orawan Sungkhachat, Nitat Sookrung, Manas Chongsa-nguan, Anchalee Tungtongchitr, Supayang Piyawan Voravuthikunchai, Thida Kong-ngoen, Hisao Kurazono and Wanpen Chaicumpa: *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. *BioMed Research International*, 2013: 314654, 2013.
9. Eiki Yamasaki, Ryuta Sakamoto, Takashi Matsumoto, Fumiki Morimatsu, Hiroko Toyoi, G. Balakrish Nair, Hisao Kurazono and Takayuki Kurazono: Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *BioMed Research International*. 2103: 679038, 2013.
10. Shin Sukegawa, Yasuhiro Ihara, Kaoruko Yuge, Shengbin Rao, Kentaro Oka, Fumihiko Arakawa, Tatsuya Fujimura, Hiroshi Murakami, Hisao Kurazono, Motomichi Takahashi, Fumiki Morimatsu: Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal*, in press, 2014.

H . 知的財産の出願・登録状況
特になし

