

ることで、新規候補分子を得た。図 1 に示すように、イムノブロット解析により、抗炭疽芽胞抗体と反応する 3 つのバンドが、それぞれ分子量約 100-250, 100 および 75kD に相当する位置に観察された。これらのタンパクは炭疽菌芽胞表層に局在し、かつ免疫原性を有すると考えられた。そこで、これらの分子を特定するため、質量分析計により該当するバンドの MS スペクトルを解析し、タンパクを同定した。その結果、分子量 100-250 kDa のタンパクは BclA、100 および 75 kDa のタンパクは EA1 であった。図 2 に EA1 の MS スペクトラムを示す。

BclA は既報でワクチン候補分子として有用性が低い事が報告されているので、本研究では EA1 を標的として研究を行った。

EA1 が実際炭疽菌表層に存在しているかを検討するため、組換え EA1 タンパク（以下 rEA1）を作製し、さらに rEA1 に対する特異抗体を作製した。抗 EA1 抗体で炭疽菌を免疫染色した結果を図 3 に示す。

この結果から、EA1 は炭疽菌芽胞だけでなく栄養体の表層にも局在することが明らかとなった。また、フローサイトメーターにより同様の解析を行った（図 4）。その結果、EA1 は炭疽菌芽胞表層に高発現していた。

また、炭疽の近縁種である *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringensis* には EA1 の発現はほとんど観察されなかった。

本研究では、簡便なワクチン投与方法として粘膜免疫によるワクチン開発を目指している。rEA1 が粘膜免疫においても抗原性を有し、十分な抗体産生を誘導しうるかどうかを検討した。その結果、週 3 回×3 週間の経鼻投与で、血中だけでなく、糞便および唾液などの粘膜においても抗体産生を誘導できることが分かった（図 5）。

H25 年度には既知のワクチン候補分子である PA と組み合わせて粘膜投与した場合の感染防御効果についてマウスを用いた感染実験で検討した。

PA と EA1 をそれぞれ単独、あるいは組み合わせ、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。免疫群における血中および粘膜中特異抗体価を調べた結果、経鼻免疫により EA1 および PA に対するそれぞれの血中 IgG および IgA、粘膜中 IgA の抗体価が上昇していた（図 6）。対照群では EA1 あるいは PA に対する特異抗体は検出されな

かった。

続いて、炭疽に対する防御効果についてマウス感染実験により検討した。各群とも n=8 匹とした。対照群では、免疫群に比べ、臨床症状の発現が早く、感染後 4 日目に全頭死亡した（図 7）。これに対し、PA 単独免疫群、EA1 単独免疫群、および EA1+PA 免疫群の感染後 10 日目の生存率は、それぞれ 62.5%、82.5%、および 100%であった。いずれの群においても、非免疫群に比べ、免疫群では生存率は改善されていたが、対照群である非免疫群と比較した場合、統計的に有意な生存率を示したのは、EA1 単独免疫群と EA1+PA 群で、棄却率はそれぞれ  $p=0.0128$ ,  $p=0.0020$  であった。EA1 免疫群と PA 単独免疫単独免疫群間には有意差は認められなかった。

感染 2 日目の各臓器について HE 染色による病理組織所見を調べた（図 8, 9）。対照群の肺では、出血や著しい毛細管うっ血が認められた。また、血液中および間質に夥しい数の莢膜に覆われた栄養体（発芽した炭疽菌）が見られた。しかし、間質における炎症性細胞反応はほとんど観察されなかった。これは炎症性細胞の浸潤などの炎症反応が起こる前に、極めて短時間で病気が進行したためと考えられる。脾臓や肝臓においても出血やうっ血病変が観察され、炭疽菌の全身性感染による急激な循環不全が起こったと思われる。このような病変は程度が改善されているものの、PA 単独投与群でも認められ、臓器には多数の炭疽菌が観察された。これに対し、EA1 単独免疫群や EA1+PA 免疫群などの EA1 免疫群では病理学的に異常な所見はほとんど認められず、炭疽菌もほとんど検出されなかった。

感染 2 日目および 3 日目の各群のマウスから肺、肝臓、脾臓を回収し、臓器中菌数を調べた。この実験による臓器中菌数の検出限界は、 $1.00 \times 10^2$  CFU/g である。感染 2 日目および 3 日目の対照群における各臓器中の菌数は約  $10^7 \sim 10^9$  CFU/g と高い値を示した（図 10）。これに対し、免疫群では、臓器中の菌数は対照群と比較して有意に減少していた。特に、EA1 投与群では、臓器中菌数の著しい減少がみられた。感染 2 日目の各臓器の菌数は、EA1 単独投与群で、それぞれ、肺： $3.67 \times 10^2$ 、肝臓： $2.00 \times 10^2$ ,  $1.33 \times 10^2$  CFU/g であり、EA1+PA 投与群では、肺： $2.33 \times 10^2$ 、肝臓： $2.00 \times 10^2$ 、脾臓： $1.00 \times 10^2$  CFU/g であった。すなわち、EA1 免疫群における臓器中菌数は、対照群に比べ約  $10^5 \sim 10^7$  分の一にまで減少

していた ( $p < 0.0001$ )。さらに感染3日目においては、検出限界以下となった。一方、PA単独投与群でも対照群に比べ、臓器中菌数は減少していた。感染2日目の各臓器中の菌数は、肺： $2.97 \times 10^5$  CFU/g、肝臓： $6.23 \times 10^5$  CFU/g、脾臓： $3.83 \times 10^6$  CFU/gで、3日目では  $2.50 \times 10^5$ 、 $4.87 \times 10^5$ 、 $4.07 \times 10^5$  CFU/gであった。2日目と3日目の菌数には有意差はなく、EA1免疫群に比べ、有意に高い菌数を示した。各臓器中の菌数において、EA1単独免疫群とEA1+PA免疫群で有意な差が認められなかった。

H25年度には、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。

表2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11, 12)。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13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-2. 細菌毒素検出キットの開発

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の中で本研究にてターゲットとした毒素の一覧およびそれぞれの毒素に対する検出キット開発の進捗状況について表3にまとめた。各毒素に対して進捗状況は様々であるが、最も開発が進んでいるコレラ毒素検出キットに関しては精製組換えCTタンパク質を用いた検出感度検証において、CT特異的イムノクロマト(CT-IC)が10ng/ml濃度(サンプル量: 100 $\mu$ l)のCTを検出可能であった(図15)。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。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16)。さらに特異性の検証を目的としてLT産生大腸菌および腸炎ビブリオについて検査を行った(図17)。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。また腸炎ビ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。以上の結果から開発されたCT特異的イムノクロマトの高い特異性が示された。

## C-3. リシン毒素検出系の構築

H23年には組換え大腸菌内で発現させたrRTBの精製を行い、これを抗原として抗rRTB抗体を獲得した。抗rRTB免疫抗体を用いたイムノプロットの結果を図18に示す。レーン1は、発現大腸菌のペレット、レーン2はそこから精製したrRTBを示す。図中の矢印で示すように、rRTBの分子量である約25 kDaの位置に陽性バンドが検出された。天然リシンのBサブユニットの分子量は約33 kDaで、rRTB

との分子量に違いがあるが、これは大腸菌発現系により糖鎖の付加がないためと考えられる。

続いて、リシンと相同性の高い細菌毒素を用いて、本抗体の反応特異性について検討した。アミノ酸配列から、リシンBサブユニットと最も近縁である志賀毒素 Stx1, Stx2 および志賀毒素の亜型である Stx2e の他、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B、コレラ毒素の各毒素を還元条件で SDS-PAGE で分離し、抗 rRTB 抗体を用いてイムノプロットを行った。図 19 に示すように、抗 rRTB 抗体は、rRTB にのみ特異的な反応を示した。

H23 年度までに得られた rRTB が大腸菌内で不溶性の封入体を形成しており、立体構造に変化が生じている可能性があった。H24 年度には天然型リシンと十分に反応する抗体を得るために、立体構造を保持した抗原を得ることを目的として *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。

得られた形質転換体のコロニーを釣菌して、液体培地にて培養した。数日間培養後、培養上清を回収し、SDS-PAGE にて発現確認を行った結果、His タグを C 末、N 末に付加したいずれの場合においても、27 kDa の RTB の分子量を示す位置にバンドが認められたが、N 末に His タグを付加した場合により強い発現が見られた (図 20)。また 4 種のシグナルペプチドのうち C タイプが最も強い発現を示した。続いて、同じ培養上清について、抗 His タグ抗体を用いたイムノプロット法を行ったところ、C 末 His-RTB については、CBB 染色では微弱なバンドが確認されたものの、イムノプロットでは確認出来なかった (図 21)。一方、N 末 His タグ付加した株では B タイプのシグナルペプチドを除き、全ての株由来の培養上清で 27 kDa のバンドが検出された。

H25 年度には H24 年度に得られた上記の形質組替え株より分泌型 rRTB を精製し、これを免疫することで、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-4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

遺伝子増幅機器を現場で使用できるようにポータブルで小型の高性能機器遺伝子増幅機器を開発した (図 22)。この機器は反応量 10  $\mu$ l と少量で、30 サイクルで 25 分、40 サイクルで 30 分と短時間で遺伝子増幅ができる。重量

は 4.5 kg でキャリーバックに入れて現場に持ち運びができる簡便化された遺伝子増幅機器である。実際、野外やモンゴルなどの海外途上国においても使用可能で、移動中の衝撃を軽減するため内部にクッションを置いたキャリーバッグで持ち運びができ、女性 1 人でも負担なく運搬できることを確認した。

また現場での簡便な遺伝子抽出法を検討した結果、炭疽菌やボツリヌス菌などの芽胞菌に対しては、検査材料 100  $\mu$ l をジルコニアビーズが充填されたチューブに加え、100°C 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。非芽胞菌に対しては、100°C、3 分間の加熱抽出で十分であった。

また核酸クロマト用の遺伝子増幅ができるプライマーを開発した。検出原理を図 23 に示す。本プロジェクト期間中に、主に CDC による生物剤分類カテゴリー A (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Clostridium botulinum*) とカテゴリー B (*Brucella* spp, *Burkholderia pseudomallei*) の細菌を中心に開発を行った。また、肺炭疽や肺ペスト、野兔病菌感染でみられる呼吸器症状と細菌性の市中肺炎を類症鑑別可能なキットも開発した (図 24) 一例としてボツリヌス菌検出用の核酸クロマトを示す (図 25)。上述の加熱抽出液 5  $\mu$ l を鋳型として PCR 反応を 40 サイクル行った。反応後、PCR 反応液をストレプトアビジン標識青色ビーズの入ったクロマト展開液と混合し、増幅産物の有無を核酸クロマトストリップにより目視で検出した。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、10 fg の DNA を検出でき、かつ 1 時間以内に目視で結果を判定することができた (図 26)。

#### D. 考 察

##### D-1. 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 (図 14)。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-2. 細菌毒素検出キットの開発

本研究班ではバイオテロに使用される可能性の高い細菌毒素の網羅的検出系の開発とそれら検査法の安定供給を目指し、様々な細菌毒素に対する免疫学的迅速検査法の開発を行っている。免疫学的検出法は本研究班でも開発を行っている核酸クロマト等の遺伝子をターゲットとした遺伝子検出法と並び、迅速な細菌検査法として様々な現場で使用されている。免疫学的検出法は一般的に遺伝子検査法と比較して検出感度の面で劣るものの、本研究班でターゲットとしている毒素タンパク質の様な菌の存在無しでも存在しうる外毒素を検出する際には非常に有効な手段である。また、遺伝子検査法と免疫学的検査法の併用によって診断の精度上昇が見込まれるとの指摘については H25 年度の本研究班の報告書内で本研究事業の研究分担者の 1 人である富山県衛生研究所の佐多徹太郎先生との共同研究 (腸管出血性大腸菌感染症患者糞便からのシガ様毒素の高感度免疫学的迅速検出法 Bead-ELISA を用いた直接検出) でデータを示したところである。

本研究期間に開発を行ったイムノクロマト法については電源等を必要としないためオンサイトでの検査を可能にする点でも非常に有益である。表 3 に示す様に現在、様々な細菌毒素に対して平行して免疫学的迅速同定法の開発を行っている。H23 年度から H25 年度までの研究期間内でコレラ毒素に対してはイムノクロマトの作製までを完了しており、非常に特異性の高い方法が構築された事を確認している。現在、他の細菌毒素についても同様に高感度・高特異性のイムノクロマトの開発を進めている。

#### D-3. リシン毒素検出系の構築

H23 年度までに作製した大腸菌で発現させた rRTB 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、H24 年度にはシグナルペプチドを付加した分泌型 rRTB の発現株を作製し、H25 年度には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。今後、本抗体を利用したイムノクロマトの作製を行う。

#### D-4. バイオテロ病原体を多項目で迅速にスクリーニングする方法の開発

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 27)。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、検疫や感染症の集団発生時にも利用できる。また、肺炭疽や肺ペスト、野兎病菌感染でみられる呼吸器症状と細菌性の市中肺炎を類症鑑別可能なキットも開発した。現在、上気道の細菌感染症の病原体検査は培養法に依存しており、*Mycoplasma*, *Chlamydomphila*, *Legionella*, *Streptococcus* など特殊な培養と選択培地を要求される病原体が多く、一般細菌培養検査では対応できない。今回我々が開発した核酸クロマト法は生物テロ対応だけでなく、通常は臨床現場で微生物検査が行われない市中肺炎の原因菌を診察外来の待ち時間を利用して検出でき、感染症外来においてよりの確な診断に貢献できる。風邪、咽頭炎あるいは肺炎症状を訴える患者に対するバイオテロを想定した遺伝学的迅速診断法は市中で起こる呼吸器感染症に対する類症鑑別法としても期待できる。

課題としては 10  $\mu$ l の反応液を low profile tube で増幅するポータブルな遺伝子増幅装置を開発したが、作業現場でバッテリー駆動型、あるいは自動車の電源を使い作動させる必要性があり、より小型化へと改良する必要がある。

また、本研究開発では、PCR 増幅産物の蓋をあけて核酸クロマトろ紙を挿入して増幅産物を識別しているが、操作者によってはコンタミの可能性もあるため、蓋を開けずにクロ

マトを展開できるようなチューブや技術の開発が必要かもしれない。

さらに、我が国では BSL3 や特定病原体の感染症の頻度は低いため、疾病が蔓延している発展途上国で、環境水、土壌、動物及び人からの検出ができるかどうかの現地検証が必要になる。現在、様々な感染症が問題となっている海外の途上国における実証試験を計画している。

本研究で開発したクロマトの性能は、リアルタイム PCR と比べて約 10~100 倍感度が高く特異性も高かった。核酸クロマト法は DNA 抽出から 1 時間以内に判定ができ、1 反応で 4 菌種を同時に検査できるため、コストの削減や検査時間の短縮が可能である。また、イムノクロマトと同様バンドの有無を目視判定して増幅産物の判定ができるため、臨床外来はもとより、生物剤散布現場やインフラの整わない場所などでも利用可能である。

医療現場で原因不明の感染症を本研究で開発した多項目遺伝子検査法でスクリーニングする方法として利用される道を作らなければならない。バイオテロを最小限の被害で食い止めるには、頻度の高い一般感染のスクリーニング試薬の中にマウントして見逃しのない医療ができる体制を構築する必要がある。核酸増幅用のプライマーは長期乾燥に耐えるので普段から備蓄しておく必要がある。

#### E. 結論

1. マウス肺炭疽モデルにおいて現行ワクチンの主成分である PA に比べ優れた防御効果を示す EA1 を同定し、EA1 が次世代炭疽ワクチンの候補分子として有用である可能性を示唆した。
2. 植物由来毒素であるリシンの検出系に利用できる特異抗体を得ることに成功した。
3. バイオテロに使用される可能性の高い複数の細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の開発に必要な抗原、抗体、免疫学的迅速同定法の作製を行った。特にコレラ毒素に対しては特異性の高いイムノクロマトの作製を完了した。
4. リアルタイム PCR と比べ約 10~100 倍感度が高く、目視により検体入手から約 1 時間で多検体項目をスクリーニング可能な検出法を開発した。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino S, Hamabata T, Sawada K, Kato K. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. *Transgenic Res.* 20(4):735-48, 2011.
2. Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, and Kohno S. *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci*, 56: 999-1006, 2011.
3. Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-nguan M, Indrawattana N, Sookrung N, Tapchaisri P, Yamazaki S, Bodhidatta L, Eampokalap B, Kurazono H, Hayashi H, Nair GB, Takeda Y & Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand, *Indian J Med Res*, 133: 387-394, 2011
4. Murakami T, Inoshima Y, Watanabe K-I, Kobayashi Y, Matsui T, Kurazono H, Ishiguro I: Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid*, 18: 112-118, 2011.
5. Chulanetra M, Sookrung N, Srimanote P, Indrawattana N, Sakolvaree Y, Chongsa-nguan M, Kurazono H, Chaicumpa W. Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. *Toxins*. 3:1249-1262, 2011.
6. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada-K. J, Nakamura K, Moss J, Hirayama T and Kurazono H: *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*, 5(4):515-21, 2012.
7. Van Hung P, Zhang J, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on dnaJ, 16SrDNA, groEL, and rpoB gene sequences. *Microbiol Cult Coll*, 27: 1-12, 2011.
8. Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. DnaJ sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 307-315, 2011.
9. Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70: 395-398, 2011.
10. Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K, Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. *Butler R.: Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61: 1927-1932, 2011.
11. 大楠清文, 江崎孝行: 肺炎 臨床と研究の最新動向 遺伝子解析技術を用いた肺炎の起炎菌診断の実践、*医学のあゆみ* 237:193-199, 2011.
12. 江崎孝行, 水野卓也, 林将大, 吉田滋, 張継偉, 大楠清文: 【新たなゲノムベースの感染症診断-開発の現状、応用と展望-】 臨床所見から原因病原体を絞り込めない不明感染症の検査、*化学療法の領域* 29:2006-2020, 2011.
13. Oie S, Obayashi A, Yamasaki H, Furukawa H, Kenri T, Takahashi M, Kawamoto K, Makino S. Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. *Biol Pharm Bull*. 34(8):1325-9, 2011.
14. Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol*. 56(4):228-37, 2012.
15. Chaisowwong W, Kusumoto A, Hashimoto M, Harada T, Maklon K, Kawamoto K. Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: Its potential for public threat. *J Vet Med Sci*. 74(1):43-50, 2012.
16. Asakura H, Kawamoto K, Okada Y, Kasuga F, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evol*. 12(1):94-101, 2012.
17. 大楠清文, 江崎孝行. 遺伝子解析技術の新たな潮流と感染制御への適応、*日本化学療法学雑誌* 59:441-453, 2011.
18. Uchida M., Harada T., Enkhtuya J., Kusumoto A., Kobayashi Y., Chiba S.,

- Shyaka A., Kawamoto K. Protective effect of Bacillus anthracis surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 421(2):323-8, 2012.
19. Okamoto M, Kyutoku Y, Sawada M, Clowney L, Watanabe E, Dan I, Kawamoto K. Health numeracy in Japan: measures of basic numeracy account for framing bias in a highly numerate population. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. 12(1):104, 2012.
  20. Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino SI, Igimi S, Yamamoto S. Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochem Biophys Res Commun*. 426(4):654-658, 2012.
  21. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada KJ, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, and Kurazono H. *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis Model Mech*. 5:515-521, 2012.
  22. Ezaki T, Hayashi M, Zhang J, Mizuno T, Natori T, Ohkusu K. Role of Culture Collections in Disasters. *Disaster Research*. 7:768-774, 2012.
  23. Hayashi M, Kubota-Hayashi S, Natori T, Mizuno T, Miyata M, Yoshida S, Zhang J, Kawamoto K, Ohkusu K, Makino S, Ezaki T. Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. *Int. J. Food Microbiol*. 163(1):41-46, 2013.
  24. Esho FK, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed Research International*. 2103: 205801, 2013.
  25. 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.
  26. 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.
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsanguan M, Tungtongchitr A, Voravuthikunchai SP, Kongngoen T, Kurazono H, Chaicumpa W. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: Antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. *BioMed Research International*, 2013: 314654, 2013.
  32. Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Toyoi H, G. Nair B, Kurazono H, Kurazono T. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. *BioMed Research International*. 2013: 679038, 2013.
  33. 大楠清文, 江崎孝行. 感染症診断における遺伝子解析技術の有用性. *小児科*. 54(7):1001-1010, 2013.
  34. Sukegawa S, Ihara Y, Yuge K, Rao S, Oka K, Arakawa F, Fujimura T, Murakami H, Kurazono H, Takahashi M, Morimatsu F. Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets. *Animal Science Journal*, in press, 2014.
2. 学会発表
    1. Takayuki Ezaki. Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water. International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011



2. Takayuki Ezaki. Shall We Spin out Classical Taxonomy of High Risk Pathogens Even after Complete Genome Era? International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011.9.7
3. Akiko Kusumoto, Toshihiko Harada, Keiko Kawamoto. The role of general stress factor RpoS in *Salmonella* VBNC state. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo) 2011.9.7
4. Takayuki Ezaki, Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete Genome Era. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections; Speaker US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kolkata, India, 2011
5. Takayuki Ezaki, Takuya Mizuno, Masahiro Hayashi, Asami Mori, Shigeru Yoshida Izumi Kanazawa, and Kiyofumi Ohkusu. Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete genome era US-Japan Cooperative medical science program cholera and other bacterial enteric infections. 46<sup>th</sup> Conference, Kolkata, India. 2011.
6. 宮下 雅行、楠本 晃子、川本 恵子. サルモネラ VBNC 変異株の単離と解析. 第 152 回 日本獣医学会、大阪、9 月 19 日、2011.
7. Takayuki Ezaki Reconstruction of Taxonomy of family *Enterobacteriaceae* after Genome wide Analysis of House Keeping Genes. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting Molecular Biology Society of Japan, Hakata, Japan, 2012.
8. 江崎孝行. dnaJ 遺伝子を用いた食中毒起炎菌の検査法. *Campylobacter* の検査・診断の最前線. 第 3 回日本カンピロバクター研究会総会プログラム、宮崎、12 月 3-5 日、2012.
9. 内田 信, Anselme Shyaka, 川本恵子. 新規炭疽ワクチン候補分子 EA1 の経鼻投与による炭疽発症予防効果. 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、3 月 18 日、2013.
10. Akiko Kusumoto, Masayuki Miyashita, Keiko Kawamoto. Isolation and analysis of *Salmonella* VBNC mutant. 第 85 回日本細菌学会、長崎、3 月 28 日、2012.
11. 楠本 晃子, 朝倉 宏, Esho Firew Kassa, 川本 恵子. 帯広近郊の野鳥由来カンピロバクター分離株の MLST 解析. 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、3 月 18 日、2013.
12. 百瀬 愛佳, 川本 恵子, 五十君 静信, 山本 茂貴, 朝倉 宏. サルモネラの 3 型分泌装置エフェクター SipB 膜上移送は浸透圧抵抗性に寄与する. 第 86 回日本細菌学会総会、千葉、3 月 18 日、2013.
13. Kassa Esho Firew, Enkhtuya Budbazar, 楠本晃子, 川本恵子. Microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
14. 楠本 晃子, 川本 恵子. 魚病細菌 *Tenacibaculum maritimum* の滑走運動はプロテアーゼ分泌に関与する. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
15. 朝倉宏, 川本恵子, 倉園久生, 岡田由美子, 五十君 静信. *Listeria monocytogenes* 1/2b 株間に認められる遺伝学・形質学的多様性. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
16. 倉園久生, 廣井豊子, 倉園貴至, 山崎栄樹. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
17. 山崎栄樹, 山本新吾, 倉園久生. Uropathogenic specific protein gene encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
18. 水野卓也, 名取達矢, 福永肇, 大楠清文, 江崎孝行. 全ゲノムシーケンス解析から見えた *Mycobacterium* 属内の系統分類に有効な遺伝子群. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
19. 江崎孝行. House keeping gene をつけた新しい分類指標と肺炎診断への利用. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
20. 大楠清文, 江崎孝行. ハウスキーピング遺伝子シーケンス解析による感染症診断. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.
21. 福永肇, 江崎孝行, 水野卓也. M 細胞タイトジャンクションの開閉による *Campylobacter jejuni* 感染症の成立. 第 87 回日本細菌学会総会、東京、3 月 26-28 日、2014.



H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特許出願

核酸クロマトグラフ法を利用した肺炎原因菌の検出方法（特許出願番号  
2011C6262 PCT/JP2011/001934）

Group	Antigen	Adjuvant
A	None	+
B	PA	+
C	EA1	+
D	PA + EA1	+

表1 粘膜免疫の投与群 (n=8)

Group	Antigen	Adjuvant	n
A	None	+	8
B	PA	+	8
C	EA1	+	6
D	PA + EA1	+	8

表2 粘膜免疫の投与群 (n=6-8)

菌種	毒素	クローン株	精製法	精製毒素	抗血清	特異的IgG	ELISA	イムノクロマト
コレラ菌	CT	○	○	○	○	○	○	○
毒素病原性大腸菌	LT	○	○	○	○	○	○	×
腸炎ピブリオ	TDH	○	○	○	×	×	×	×
ボツリヌス菌	A型(重鎖)	○	×	×	×	×	×	×
	B型(軽鎖)	×	×	×	×	×	×	×
ウェルシュ菌	エンテロトキシン	○	○	×	×	×	×	×
黄色ブドウ球菌	SEA	○	○	○	×	×	×	×
	SEB	○	○	○	×	×	×	×

表3 各毒素に対する免疫学的検出キット開発の進捗状況

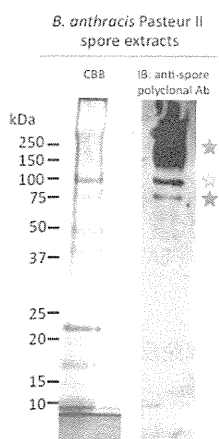
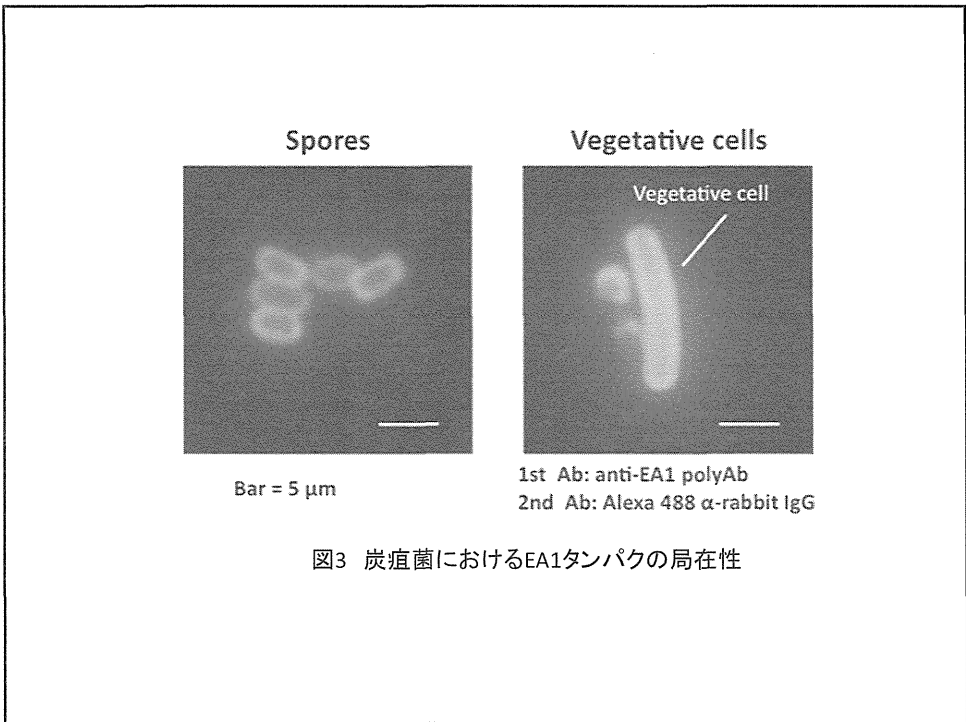
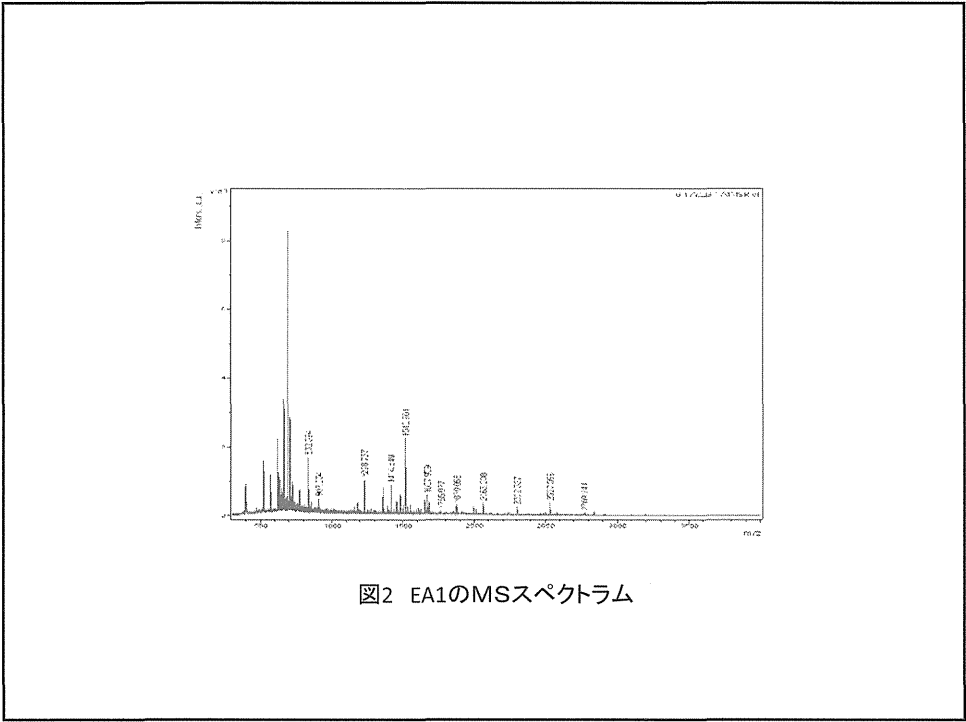


図1 抗炭疽菌芽胞抗体と反応する芽胞表面タンパク



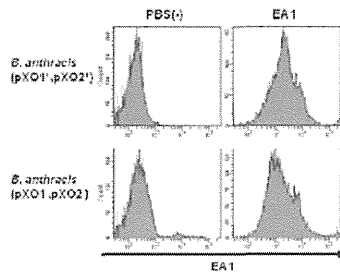


図4 フローサイトメーターによる解析

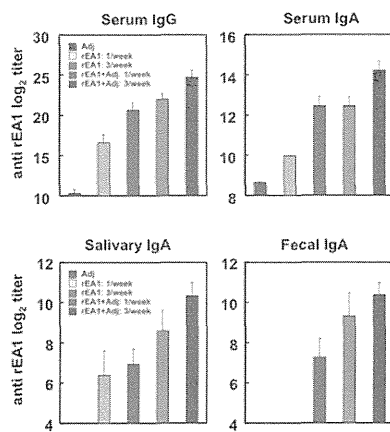
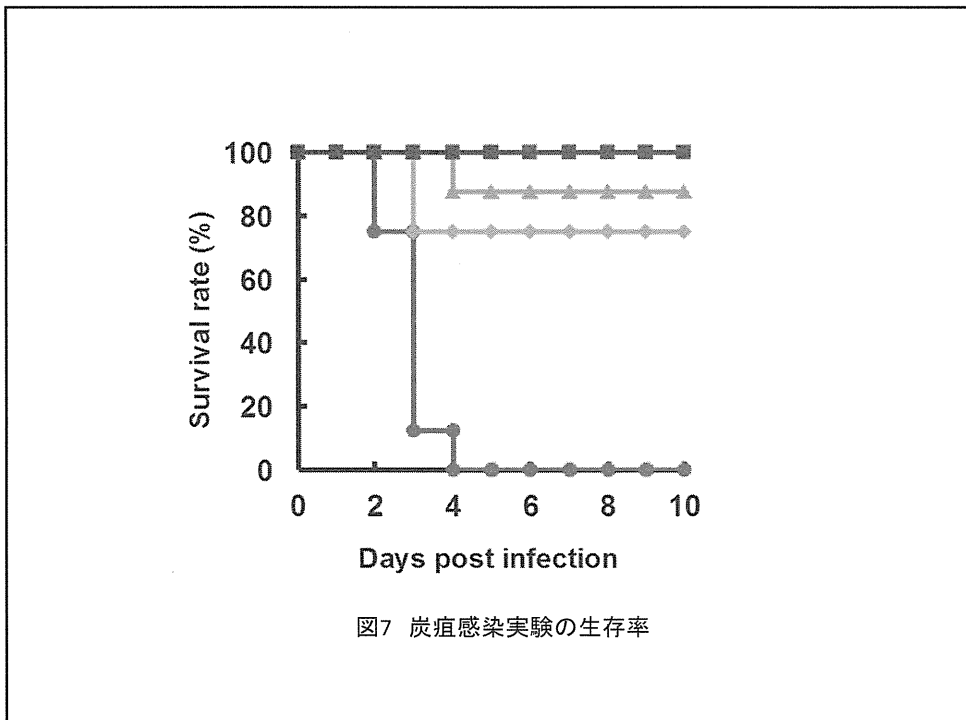
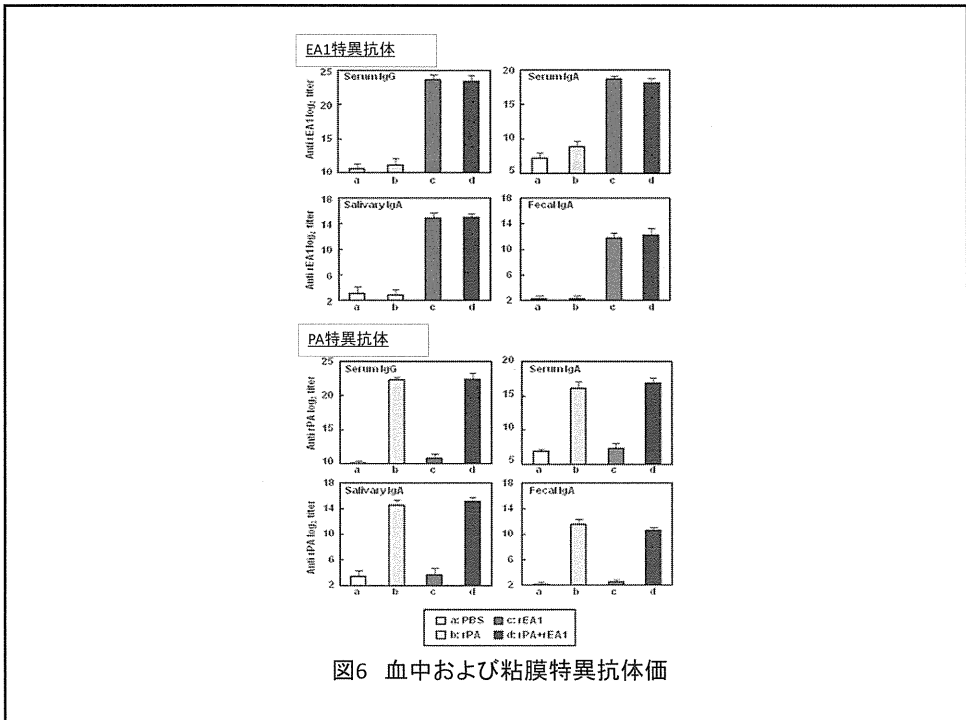


図5 rEA1経鼻免疫による抗体産生誘導



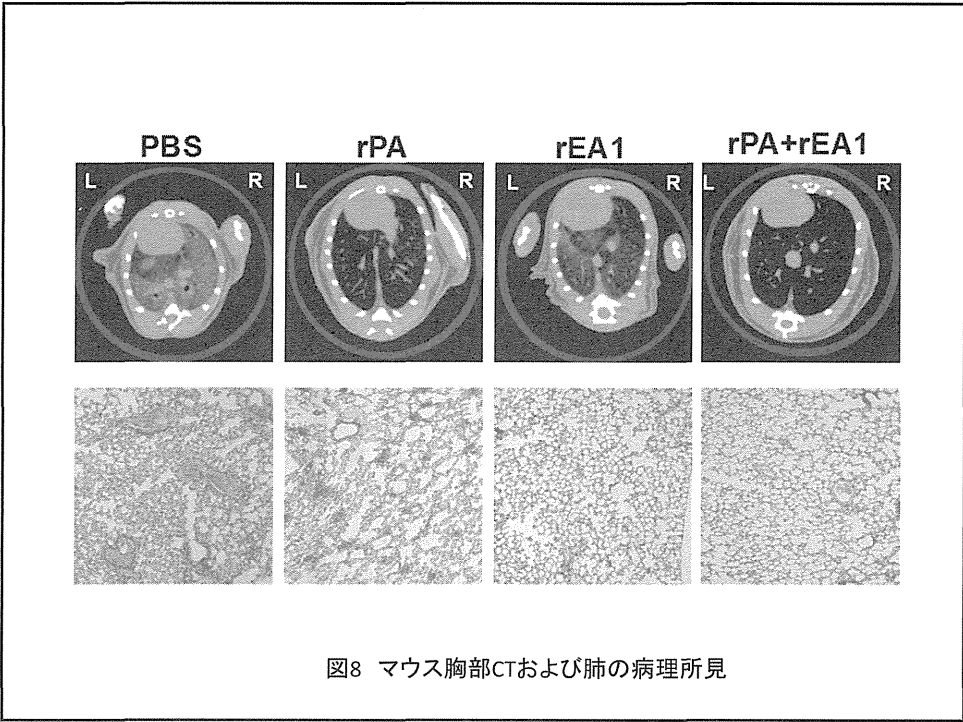


図8 マウス胸部CTおよび肺の病理所見

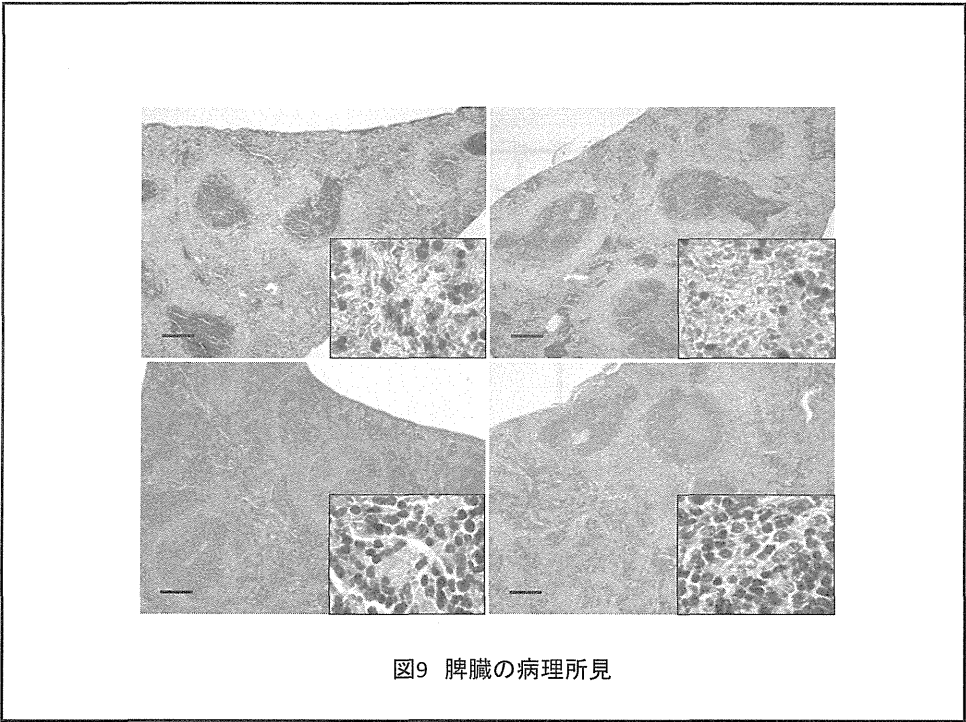


図9 脾臓の病理所見



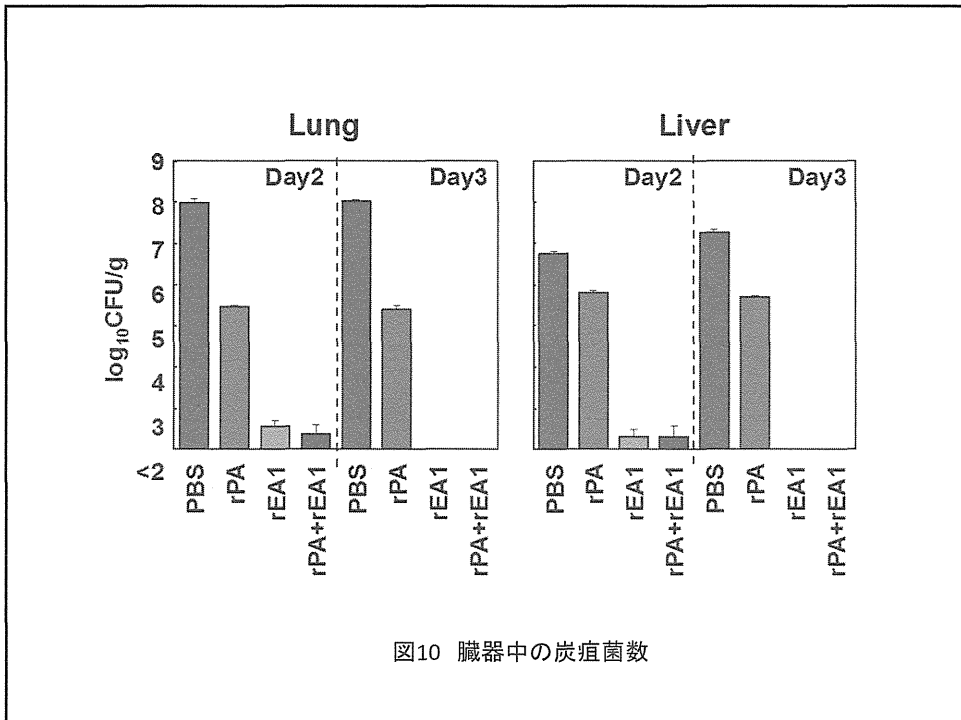


図10 臓器中の炭疽菌数

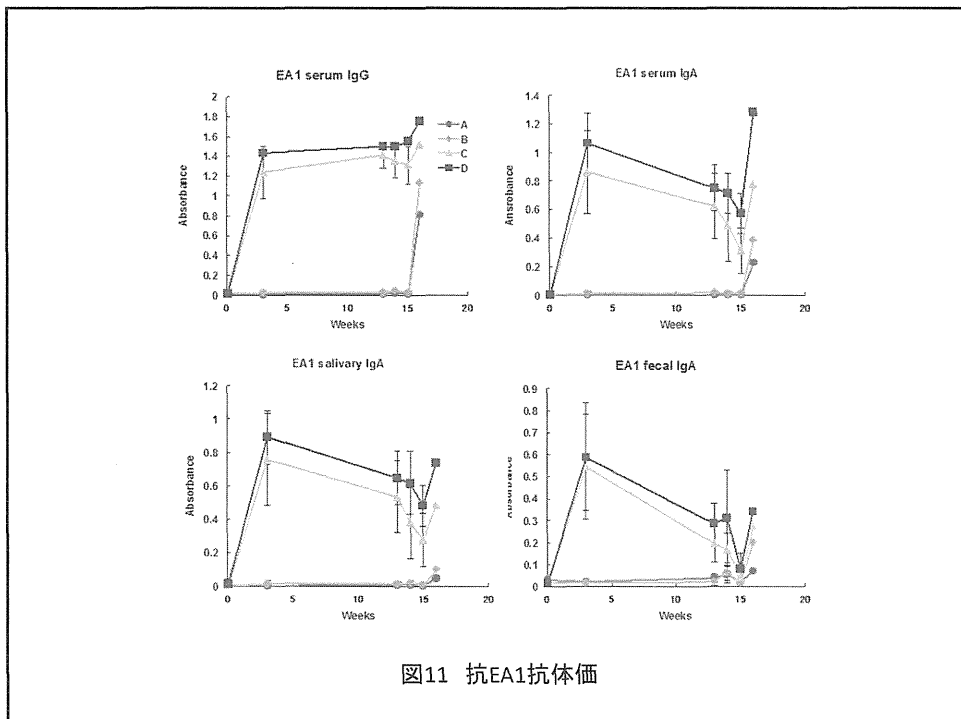


図11 抗EA1抗体価

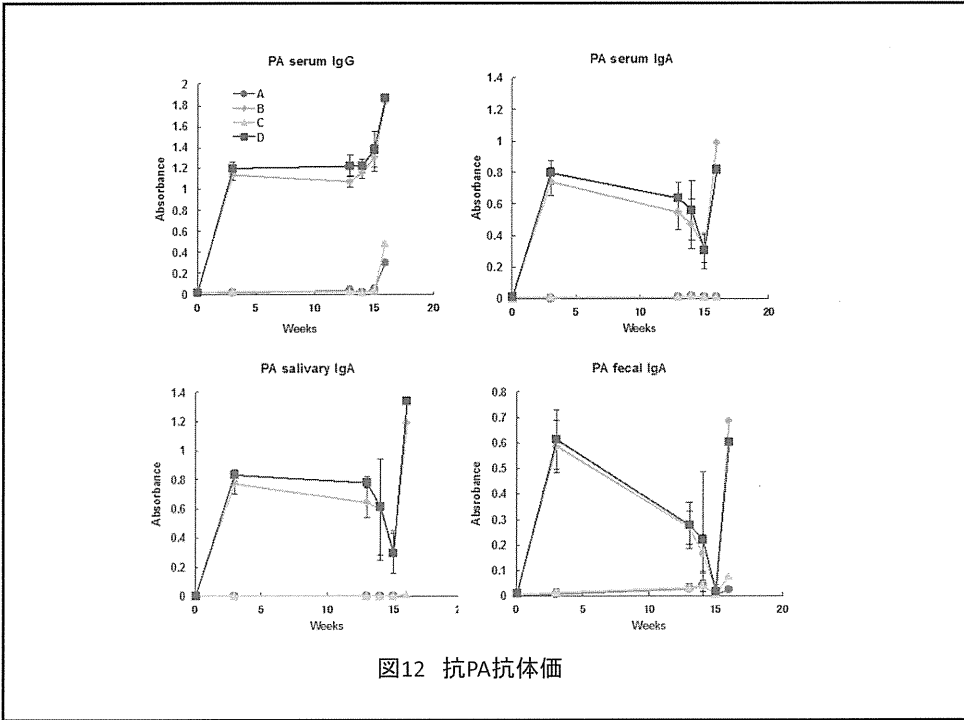


図12 抗PA抗体価

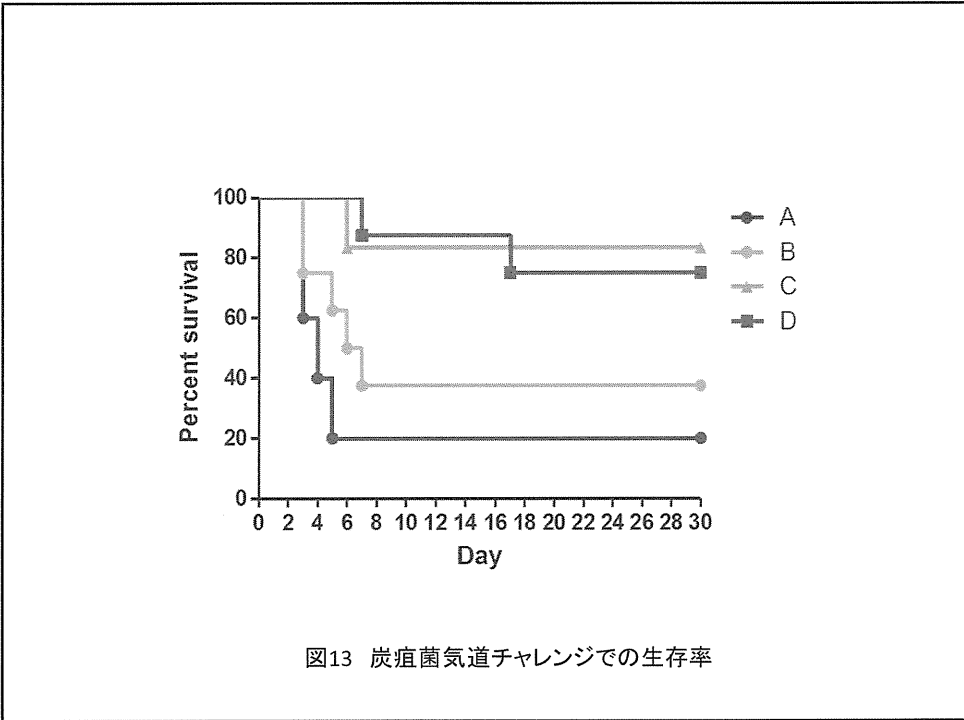


図13 炭疽菌気道チャレンジでの生存率

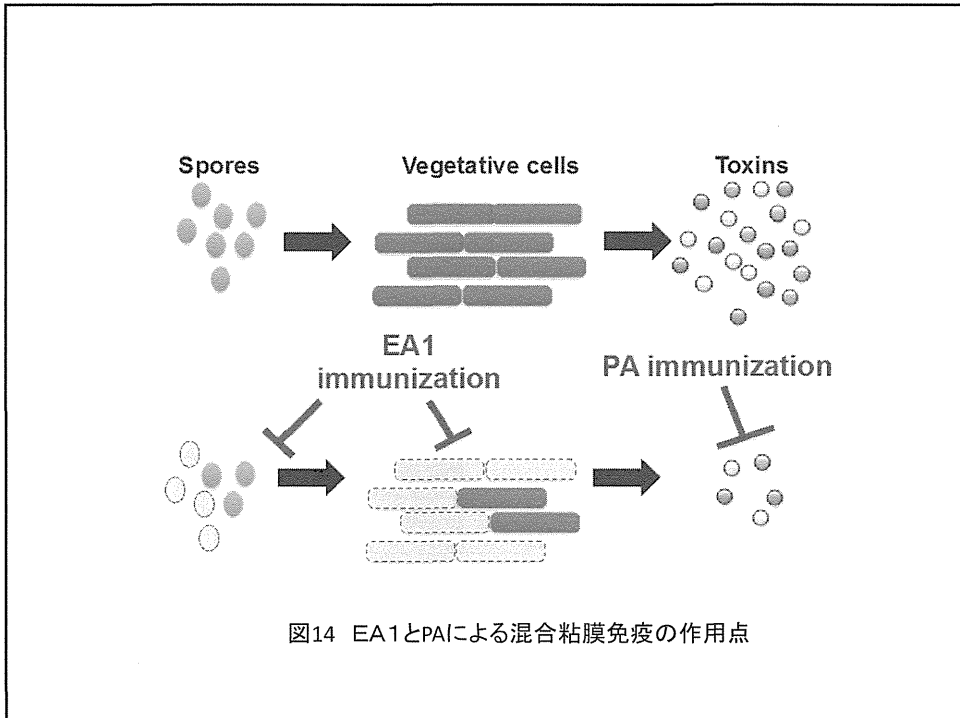


図14 EA1とPAによる混合粘膜免疫の作用点

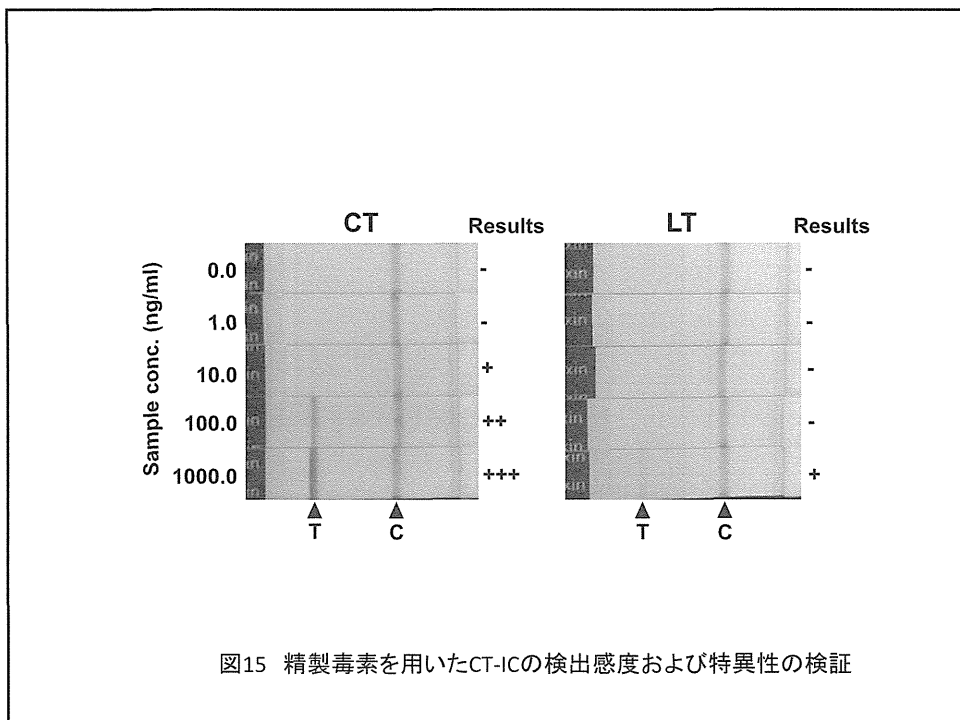


図15 精製毒素を用いたCT-ICの検出感度および特異性の検証

