

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、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。一方で、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。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 of 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。

H23年度からH25年度の間本研究班では、炭疽発症予防効果をもつ粘膜ワクチンの開発、生物兵器に使用される可能性の高い細菌性毒素および植物由来毒素に対する検出系のキット化への取り組み、および複数の病原体を同時に検出できる核酸クロマトの開発を行なった。

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。本研究では、炭疽ワクチンの新たな候補成分として芽胞表層タンパクに着目し、炭疽に対する防御効果について検討した。

細菌毒素に関しては、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であるボツリヌス毒素 (Btx、カテゴリーA)、コレラ毒素 (CT) と大腸菌の易熱性下痢毒素 (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) 及び腸炎ビブリオの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、その普及を目指す。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、本研究ではこれらの毒素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。本研究期間においては各細菌毒素に対する特異的抗体を作製し、イムノクロマト法、ELISA法等の免疫学的迅速同定法の構築を行った。

植物由来の毒素であるリシンは、トウモロコシ (*Ricinus communis*) の種子から抽出される糖タンパク質で、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を目的としてリシン特異的抗体の作製を行った。

また、バイオテロが発生した場合、できる限り被害を軽減するために、使用された生物剤の迅速な同定が求められる。生物剤の種類によって対応が異なるため、複数の病原体を迅速に検出するシステムの構築が望ましい。本年度は現場での生物剤迅速検出系構築のための検査ツールを開発した。

B. 研究方法

B-1. 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23年度は、炭疽菌芽胞の表層タンパク質

の同定とその粘膜免疫における免疫原性について検討した。*B. anthracis* Pasteur II 苗の病原性株(pXO1+, pXO2+) 及び 非病原性株(pXO1-, pXO2-)を使用し、非病原性株から芽胞を高純度に精製し、4%パラホルムアルデヒド固定により不活化した後、家兔に免疫し、抗炭疽菌芽胞抗体を作製した。続いて、病原性および非病原性株芽胞から芽胞タンパクを抽出し、SDS-PAGE に展開後、タンパクを PVDF 膜に電氣的にトランスファーし、前述の抗炭疽菌芽胞抗体を用いてイムノブロットを行った。反応性を示すバンドをゲルから切り出し、回収した。ゲル片を MilliQ 水で振とう洗浄、脱色し、アセトニトリルと炭酸水素ナトリウム水溶液処理を行った。乾燥させたゲル片に 10 mM ジチオトレイトール(DTT)/25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加え、56 °C で 45 分間インキュベートした。チューブを室温に戻した後、25 mM 炭酸水素アンモニウムに溶解した 55 mM ヨードアセトアミドを加え、遮光しながら 30 分間処理し、タンパク質をアルキル化した。洗浄後、25 mM 炭酸水素アンモニウムで 20 倍希釈したトリプシン溶液(5 µg/ml)で 37°C で一晩インキュベートし、トリプシン消化した。10 分間ソニケーションすることによりペプチドを抽出し、1% TFA/50%アセトニトリルを加え、タンパク抽出液を得た。抽出液は遠心濃縮した。サンプルを Pre-spotted Anchor Chip に 1 µl アプライし、TFA 処理後、乾燥させ、質量分析によりスポット上のペプチド断片を Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)により質量分析を行った。測定条件は、リニアモードで、レーザーは 110 ns でパルス照射した。キャリアレーションは、Anchor Chip に付属したものを用いた。得られたスペクトルは、蛋白質同定ソフト MASCOT を用いて解析し、該当するタンパク質 (EA1) を同定した。

次に同定されたタンパクの組換えタンパクを作製した。炭疽菌ゲノムから、該当タンパクをコードする遺伝子を PCR により増幅し、これを pGEX-6P-1 ベクターにクローニングし、GST タグ付加組換えタンパク発現ベクターを構築した。これを BL21 (DE3) に導入し、定法に従い、目的のタンパクを精製した。GST タグは生成過程でカラムオンダイジェストにより、組換えタンパクから外した。

同定タンパクの炭疽菌での発現解析に使用するため、上述の精製組換えタンパクを家兔に免疫し、特異抗体を得た。

免疫染色は、4% PFA で不活化した炭疽菌芽胞を用いた。非特異反応を防ぐために 3% skim milk in T-PBS により 30 分間ブロッキング後、特異抗体を 1 次抗体、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として、免疫染色を行った。染色した芽胞は、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにより観察した。すなわち、スライド上に染色芽胞を載せ、ProLong Gold で封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。取得した画像は DP70-BSW ソフト(Olympus)により解析した。また、フローサイトメーター解析では、FACSCantII (Becton Dickinson)を用いてデータを取得し、FACSDiva ソフト(Becton Dickinson)で解析した。

続いて、同定した芽胞表層タンパクの粘膜免疫での抗原性や有用性を検討するため、以下の方法により粘膜免疫した。実験動物には 6 週齢の雄の BALB/c マウスを用い、ジエチルエーテルを用いて軽く麻酔した後、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。投与スケジュールは、週 1 回あるいは 3 回 × 3 週間で行った。アジュバントを用いた免疫では、組換えタンパク単独又は 5 µl のアジュバントと組み合わせて週 1 回又は週 3 回 × 3 週間投与した。アジュバントには合成二本鎖 RNA の poly (I:C) を用いた。各群のマウスは定期的に採血を行い、血中および粘膜抗体価を ELISA により測定した。

H24 年度は、EA1 を粘膜投与した場合の炭疽発症予防効果について検討した。

実験動物は 6 週齢の雄の 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。表 1 に免疫条件を示す。投与スケジュールは週 3 回 × 3 週間で行った。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。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は ELISA により測定した。

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 5 × 10³ CFU/mouse) は PBS に懸濁して調整した。100 µl の芽胞液を BALB/c マウスに腹腔内投与した。投与後、マウスの状態を定期的に観察した。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 °C 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。

感染臓器（肺、肝臓、脾臓）中の菌数を測定するため、投与後 2 日目および 3 日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、臓器を回収した。臓器の重量に対し、100 mg/ml となるように滅菌水を加え、ペッスルを用いて注意深く破碎した。臓器懸濁液を 10 倍段階希釈し、100 μ l ずつ L-agar に塗布し、37 °C で一晚培養後、コロニー数を計測した。また、マウスから肺、肝臓および脾臓の一部を回収し、10 N マイルドホルム（Wako）により固定した。定法に従い、パラフィン包埋後、2 μ m の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を行った。また、マウス胸部のマルチスライス X 線 CT(Computed Tomography)画像を撮影し、肺野の病変所見を観察した。

H25 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 μ g となるように 5 ~ 10 μ l 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 2)。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 7.6×10^4 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 °C 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 μ l 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 - 2 . 細菌毒素検出キットの開発

特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅した各毒素をコードする遺伝子を発現ベクターである pET28a もしくは pCold-TF のマルチクローニングサイトに挿入し、毒素タンパク質をコードする組換えプラスミドを構築した。各毒素タンパク質は N 末端あるいは C 末端のいずれかに His-Tag を融合する様に設計された。組換えプラスミドをタンパク質発現用大腸菌株 *E. coli* BL21(DE3) に導入し、各毒素の組換えタンパク質を大量発現する組換え大腸菌株を得た。組換え大腸菌株内で IPTG 誘導により発現させた組換え毒素タンパク質は Ni²⁺-NTA レジン (キアゲン) 充填カラムを用いて常法により精製を行った後に、ゲルろ過カラムもしくは electrogel elution 法を用いて再精製を行った。各精製標品は SDS-PAGE で展開後、銀染色により精製度の確認を行った後に抗原として使用した。各精製標品はアジュバント (FCA) と混合し家兎に免疫した。最初の免疫から 3 週間後に最初の追加免疫を行い、それ以降は血中抗体価の上昇がサチュレイトするまで 1 週間ごとに追加免疫を行った。血中抗体価はオクタロニ-試験により行った。得られた抗血清から抗原を結合させたアフニティカラムにより毒素特異的抗体を精製した。得られた特異的抗体はサンドイッチ ELISA、Bead-ELISA、イムノクロマトストリップなどの作製に使用された。イムノクロマトストリップの作製は (株) 日本ハム中央研究所により行われた。

B - 3 . 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。そこで本研究では、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た。

H23 年度には NCBI 遺伝子データベースのリシン B サブユニット (以下、RTB) の塩基配列を元に、RTB のヌクレオチドを合成した。これにリンカー配列を付加し、pET-32 ベクタ

ーにクローニングし、発現ベクターを構築した。定法に従い、大腸菌組換えタンパク発現システムにより、可溶性 RTB 組換えタンパク（以下 rRTB）を精製した。rRTB100 µg を抗原として等量の TiterMax と混合して抗原液を調整し、定法に従い、BALB/c マウスおよび家兔に免疫した。免疫前および免疫後の血液を定期的に採取し、血清中の抗 rRTB 抗体価を ELISA により測定した。抗体価の上昇を確認後、Porotein A あるいは Protein G カラムにより抗血清から IgG 抗体を精製した。得られた抗体の反応性と特異性については、ELISA とイムノプロットにより検討した。

H24 年度には 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ため、様々な手法でリフォールディングを試みた。しかしながら凝集を完全に抑制することは困難であった。天然型リシンと十分に反応する抗体を得るためには、立体構造を保持した抗原が望ましい。そこで、H24 年度には *Brevibacillus* 発現系を利用した分泌型 RTB 発現系の構築を行った。H23 年度に構築した発現ベクターを鋳型として、*rtb* 遺伝子を PCR で増幅し、*Brevibacillus* 用発現ベクターに組み込んだ。この時、6×His タグを N 末あるいは C 末に付加できるようにプライマーを設計した。また、4 種類のシグナルペプチドを用意し、計 8 種類の発現ベクターを構築した。作製した発現ベクターはエレクトロポレーション法に宿主細胞に遺伝子導入した。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。SDS-PAGE および抗 His 抗体を用いたイムノプロット法による発現確認を行った。

H25 年度には H24 年度に作製した組換え *Brevibacillus* 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兔（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 回繰り返す、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 - 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

バイオテロの発生現場や臨床現場で実施可能な簡便で迅速、かつ多検体項目についてスクリーニング可能な検出法の開発を行った。

検出法は病原体の特異的な遺伝子領域を標的とした遺伝子増幅法を原理とし、現行の検査法で課題となっている現場での検出、迅速性、簡便性、多検体項目の検出について検討、開発をした。BSL3 の病原細菌であるブルセラ、炭疽、野兔病、ペスト、ポツリヌス、チフス、リケッチア、クラミドフィラ、コクシエラ、および類鼻疽に対して、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、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。スクリーニングで得る結果を迅速に確認するため、一つの病原体に対してハウスキーピング遺伝子、病原因子、16S rDNA を組み合わせる 2-3 のターゲットで個々の病原体を確認するプライマーセットを作成した（プライマー配列については特許申請を考慮して記載しない）。PCR 反応後、増幅産物を目視で判定できるように、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。ビーズには青色ラテックスを使用した。

（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 . 炭疽に対する粘膜ワクチンの開発

H23 年度には新規ワクチン候補分子を探索するため、炭疽菌の感染型である芽胞の表層タンパクの同定を行った。炭疽菌の病原因子は pXO1 および pXO2 の二つの病原プラスミドに多く存在しているが、プラスミド上の因子は環境などにより容易に脱落することがあるため、染色体上にコードされており、かつ炭疽菌表層に存在する分子を標的とした。そのため、両病原プラスミドを持たない非病原性株の芽胞を抗原として、抗炭疽菌芽胞抗体を作製し、この抗体と反応する分子を同定す

ることで、新規候補分子を得た。図 1 に示すように、イムノプロット解析により、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。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、 1.00×10^2 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: 3.67×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、 1.33×10^2 CFU/g であり、EA1 + PA 投与群では、肺: 2.33×10^2 、肝臓: 2.00×10^2 、脾臓: 1.00×10^2 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： 2.97×10^5 CFU/g、肝臓： 6.23×10^5 CFU/g、脾臓： 3.83×10^6 CFU/g で、3 日目では 2.50×10^5 、 4.87×10^5 、 4.07×10^5 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: $100\mu\text{l}$) 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 μ 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 μ l 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。非芽胞菌に対しては、100 、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 μ 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、野兔病菌感染で見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*, *Chlamydia*, *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 µl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_L, 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, 張繼偉, 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, Konggoen 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. 46th 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 35th 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）

