

平成 26 年度～平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

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の確立，
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

細菌性危険病原体の蔓延防止に関わる新規検出法や予防法の開発

所 属 国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター
研究分担者 倉園久生

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．

研究協力者

江崎孝行・国立大学法人岐阜大学・教授
川本恵子・国立大学法人帯広畜産大学・教授
山崎栄樹・国立大学法人帯広畜産大学・助教
奥村香世・国立大学法人帯広畜産大学・助教

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 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.

生物テロの発生を予防することが最も基本であることは間違いないが,生物テロが発生した場合,いかに被害を最小限に抑えるかが何よりも重要である.被害を低減するには,バイオテロ発生をできるだけ早く検知すること,散布生物剤を正確に迅速に同定することが求められる.さらに,発生現場や患者対応を行う医療施設などの汚染区域の早急な機能回復のためには適切な除染が必要となる.除染とは,消毒や滅菌などにより微生物を受容可能なレベルまで減少させ,使用可能な状態にすることである.適切な除染は患者対応,2次被害の拡大防止,汚染現場の早期復旧に極めて重要である.従って,テロ発生後の除染活動を念頭に,これまでに臨床検体からの迅速検出を目的に開発した検査法を環境検体からの検出へと応用できるよう,環境検体のなかでも病原体の検出が特に困難とされる土壌検体を用いて検体処理法の改良を行った.研究には,バイオテロに利用される可能性の高い5種類の細菌性病原体(炭

疽菌,野兔病菌,ブルセラ菌,ペスト菌,類鼻疽菌)を検査対象と設定して,これらの迅速遺伝子検出系を作成し,25分で遺伝子を増幅し,DNA-Chromatography法で増幅産物を約5分で識別する野外仕様の検出系を完成させた.更に,この野外仕様の検出系の精度検定を炭疽の流行地であるモンゴルで実施した.

一方,細菌毒素では,CDCにおいて生物兵器に使われる可能性の高い蛋白毒素として挙げられているボツリヌス毒素(Btx)(カテゴリー-A),黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンB(SEB)(カテゴリー-B,コレラ菌のコレラ毒素(CT)(カテゴリー-B:Water safety threats),腸管毒素原性大腸菌のLT毒素,腸炎ピブリオのTDH毒素とTRH毒素,およびウェルシュ菌エンテロトキシン(CPE)(カテゴリー-B:Food safety threats)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.

B. 研究方法

1. 炭疽菌検出用のDNAクロマトの野外試験

野外仕様型のQuick Mobileは1.7kgの軽量型の遺伝子増幅装置で25分でtarget遺伝子を増幅する.増幅後,10 μ lのStreptavidin標識latexとDNA-Stickを加えてクロマトを行い増幅産物を目視で判定する(図1).このQuick Mobileを用いてモンゴル国立感染症研究所の野外分離株並びに汚染土壌対して検査を実施した(図2,図3).

2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

1) SEA および SEB の精製と家兔抗血清の作製

sea および seb は大腸菌内で His タグ融合蛋白質(His-SEA, His-SEB)として発現させ,SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより確認した.リコンビナント蛋白質の精製は,カラムクロマトグラフィーと電氣的溶出法によって行った.

精製した毒素タンパク質は、家兔に免疫して抗血清の作製を試みた。

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

初年度に構築した TF-TDH および TF-TRH 発現大腸菌 BL21(DE3) 株は、至適条件下で発現誘導を行った。リコンビナント蛋白質の発現に使用したベクターは、可溶化タグ TF の他に His タグも内蔵している。この性質を利用し、得られた培養液から His タグ精製および電気的溶出法により TF-TDH あるいは TF-TRH を精製した。精製蛋白質は、モルモット（オス、9 週齢）1 匹ずつに免疫して抗血清の作製を試みた。得られた血清は、オクタロニー法によってそれぞれの抗原に対する抗体価を確認した。なお、TRH は 1 度目の試行で十分は抗体価の上昇が認められなかったため、同様の実験を 2 度行った。

3) BoNT/A_Hc 精製とモルモット抗血清の作製

BoNT/A_Hc は大腸菌内で His-TF タグ融合蛋白質 (His-TF-BoNT/A_Hc) として発現させ、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより確認した。リコンビナント蛋白質の精製は、His タグ精製と電気的溶出法によって行った。得られた精製蛋白質は、モルモット（オス、9 週齢）2 匹に免疫して抗血清の作製を試みた。得られた血清は、オクタロニー法によってそれぞれの抗原に対する抗体価を確認した。

4) 抗ウェルシュ菌毒素 (CPE) 抗体の作製

CPE (C 末端領域部分配列) が His タグ融合蛋白質として高発現する組換え大腸菌株は、大阪大学微生物病研究所の堀口安彦教授より分与を受けた。組換え CPE 蛋白質は、大腸菌の細胞破碎上清に対して硫酸アンモニウム (80%飽和) を加え沈殿化して得られた蛋白質画分を PBS に再懸濁後、Ni-NTA Agarose (Qiagen) 充填カラムを用いて精製した。得られた精製組換え CPE (C 末端領域部分配列) 蛋白質は、以下の条件 (初回免疫 100 $\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント有り)、2 回目免疫 (初回免疫から 3 週後) 100 $\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント有り)、以降 1 週間毎に追加免疫 50

$\mu\text{g}/\text{rabbit}$ (アジュバント無し)) で家兔 2 羽に免疫し、得られた血清から、精製組換え CPE 蛋白質結合カラムを用いて特異的 IgG を得た。

【倫理面への配慮】

本研究を実施するにあたって、遺伝子組換え実験委員会、動物実験委員会等の承認を得た。

C. 研究結果

1. 炭疽菌検出用の DNA クロマトの野外試験

モンゴル国立感染症研究所に保存されている炭疽菌野外分離株に対して Quick Mobile の検出精度を検討したところ、3 株の野生株全てが陽性を示し、陰性対象のセレウス菌は陰性を示したことから Quick Mobile の検出精度は問題ないことが分かった (図 2)。2013 年 5 月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌に対して同様に Quick Mobile を用いた検査をしたが陰性であった (図 3)。

2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

1) SEA および SEB の精製と家兔抗血清の作製

精製した His-SEA および His-SEB を SDS-PAGE とウエスタンブロッティングにより検出したところ、予想されるサイズのシグナルが得られ、目的蛋白質の発現が確認できた。本研究で構築したリコンビナント・プラスミドによる大腸菌内での目的蛋白質の発現量は高く、常に効率よく目的蛋白質が得られた。Ni-NTA アガロースビーズによる精製の後、電気的溶出法によって目的蛋白質を精製し、得られた精製蛋白質を家兔に免疫し血清を回収したが、十分な抗体価の上昇は認められなかった。

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

TF-TDH および TF-TRH を精製し、得られた精製 TDH と TRH をモルモットに免疫し血清を回収した。抗体価の評価は、オクタロニー法によって実施した。その結果、TF-TDH あるいは TF-TRH を免疫したモルモットから得られた血清は、それぞれ TDH、TRH に対して十分な抗体価の上

昇が認められた(図4,5). 抗 TRH 血清の作製に関しては,1度目の試行では十分な抗体価の上昇が認められなかったが,2度目の試行において,TRH 検出系の作製に使用可能なレベルの高い抗体価の上昇を示す抗血清が得られた(図5).

3) BoNT/A_Hc 精製とモルモット抗血清の作製

His-TF-BoNT/A_Hc を精製し,得られた精製蛋白質をモルモットに免疫し血清を回収した.抗体価の評価は,オクタロニー法によって実施した.その結果,His-TF-BoNT/A_Hc は十分な抗体価の上昇が認められた(図6).また,通常モルモットの免疫スケジュールは,初回免疫の後,2週間間隔で4回の追加免疫とされているが,今回の免疫においては追加免疫2回目実施後の時点で十分な抗体価の上昇が認められた.しかしながら,通常よりも早い段階で抗血清が得られたため,モルモットの生育が伴っておらず,期待される血清の半分程度の血清量しか得られなかった.したがって,再度同様の免疫方法によってモルモットを免疫し,抗 BoNT/A_Hc 血清を回収した.

4) 抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体の作製

免疫抗原として用いた組換え精製 CPE の純度検定の結果を図7に示す.獲得した組換え CPE 蛋白質を家兎に免疫することで,抗 CPE 抗血清を得た後,組換え CPE 蛋白質結合カラムを用いて CPE 特異的 IgG を獲得した.

得られた組換え CPE 特異的 IgG とウェルシュ菌由来毒素(野生型毒素)との反応性を検証するために,CPE 産生ウェルシュ菌株の菌体破碎上清に対して CPE 特異的 IgG を一次抗体として用いたウエスタンブロッティングを行った.その結果,野生型毒素でも良好な反応が確認された(図8).

D. 考察

1. 炭疽菌検出用の DNA クロマトの野外試験

構築した Quick Mobile の炭疽菌検出精度はモンゴル分離株を用いたスパイク実験で証明できたが,2013年5月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌からの検出はで

きなかった.今後はモンゴル各地から汚染土壌を集めて更にサーベランスを行って本法の有用性の検討を行う.

2. バイオテロに利用される細菌毒素に対する免疫学的迅速同定法の確立

1) SEA と SEB の精製と家兎抗血清の作製

得られた精製蛋白質(SEA,SEB)を家兎に免疫し血清を回収したが,十分な抗体価の上昇は認められなかった.SEA および SEB は銀染色で1本になるまでの高い純度で,かつ免疫に必要な十分量の精製蛋白質を確保できたため,今後アジュバンドや免疫スケジュールの検討を行い,高感度かつ簡便な SE 検出法を構築する.

2) TDH と TRH の精製とモルモット抗血清の作製

本研究で実施したモルモットへの免疫スケジュールにおいて,IC の作製に使用可能なレベルの抗体価を示す抗 TDH および抗 TRH 血清が得られた.したがって,得られたこれらのモルモット抗血清を用いて,TDH あるいは TRH に特異的な免疫学的検査法の構築を目指す.さらに,今回は免疫動物としてモルモットを使用したが,血清のより高い収量が期待できる家兎などへの動物種の変更も視野に入れ,血清の作製を進める.

3) 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清の作製

本研究で実施した免疫スケジュールにおいて,IC の作製に必要なレベルの抗体価を示す抗 BoNT/A_Hc 血清が得られた.また,同じ実験を2度実施することによって,IC のプロトタイプ作製や予備実験に必要とされる十分量の血清が確保できた.したがって,BoNT/A_Hc に特異的な免疫学的検査法の構築を目指す.さらに,今回は免疫動物としてモルモットを使用したが,血清のより高い収量が期待できる家兎などへの動物種の変更も視野に入れつつ,血清の作製を進める.

4) 抗ウェルシュ菌毒素(CPE)抗体の作製

本年度の試行で特異性の抗 CPE 抗体の獲得に至っている.今後,本抗体を用いた迅速免疫学的検出法(イムノクロマト法,ELISA法)の構築を目指す.各検出法構築については過去に行った腸管

出血性大腸菌の志賀毒素（カテゴリー B：Food safety threats）に対する検出法構築の際のシステムが利用可能である。

E. 結論

1. 構築した迅速遺伝子検出法は実際のバイオテロ事例にも応用可能と考える。
2. 抗SEA血清および抗SEB血清の作製のため、免役条件の検討など、課題が見出された。
3. 検出系に使用できる程度の抗体価を示す抗TDHおよびTRH血清が得られた。
4. 検出系に使用できる程度の抗体価を示す抗BoNT/A_{Hc}血清が得られた。
5. 検出系に使用可能な高感度の抗CPE血清が得られた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 85 (4): 454-460, 2014.
- 2) 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), 2014
- 3) Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 69(9):2376-2382, 2014.
- 4) Miyazato A, Ohkusu K, Tachi Y, Hashikita G, Ezaki T, Mitsutake K. Two cases of infective endocarditis caused by *Streptococcus tigurinus*. *感染症学雑誌* 88 (3): 304-306, 2014.
- 5) Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K,

- Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76(4):491-498, 2014
- 6) Nakano M, Yamasaki E, Moss J, Hirayama T, Kurazono H. Study of the stn protein in salmonella; a regulator of membrane composition and integrity. *Method Mol. Biol.* 1225: 127-138, 2015.
- 7) Yamasaki E, Yamada C, Jin X, Nair GB, Kurazono H, Yamamoto S. Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 21 (2): 105-109, 2015.
- 8) Nakashima S, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico R B, Suffredini A F, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S. Identification of *Helicobacter pylori* VacA in Human Lung and its Effects on Lung Cells. *BBRC* 460 (3): 721-726, 2015.
- 9) Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S-I, Kasuga F, Ijimi S, Asakura H. Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J. Food Safety*, doi: 10.1111/jfs.12195, 2015.
- 10) Eiki Yamasaki, Masanori Watahiki, Junko Isobe, Tetsutaro Sata, G. Balakrish Nair and Hisao Kurazono. Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan—Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC

- outbreak. *Toxins*, 2015, 7, 4381-4389; doi:10.3390/toxins7104381112
- 11) Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T. Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. *BMC Genomics* 16:218 (2015) doi: 10.1186/s12864-015-1368-9.
 - 12) Asakura H, M Tachibana, M Taguchi, T Hiroi, H Kurazono, S-I Makino, F Kasuga, S. Igimi. Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *Journal of Food Safety*, 36,392-401, 2016.
 - 13) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. Ex vivo proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Research in Microbiology*, 167, 63-71, 2016.
 - 14) Aryantini NP, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, Urashima T, Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Anim Sci J. in press*
 - 15) Nakano M, Yahiro K, Yamasaki E, Kurazono H, Akada J, Yamaoka Y, Niidome T, Hatakeyama M, Suzuki H, Yamamoto T, Moss J, Isomoto H, Hirayama T. *Helicobacter pylori* VacA, acting through receptor protein tyrosine phosphatase, is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521. *Dis Model Mech.* 19 (12): 1473-1481, 2016
 - 16) Watanabe S, Matsumura K, Iwai H, Funatogawa K, Haishima Y, Fukui C, Okumura K, Kato-Miyazawa M, Hashimoto M, Teramoto K, Kirikae F, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. A Mutation in the 16S rRNA Decoding Region Attenuates the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 84:2264-2273 (2016)
- ## 2. 学会発表
- 1) K. Okumura, M. Kato, T. Kirikae, M. Kayano, T. Miyoshi-Akiyama. Construction of a Virtual *Mycobacterium tuberculosis* Consensus Genome and Its Application to Data from a Next Generation Sequencer. 114th General Meeting American Society for Microbiology, ボストン (米国) (2014.5)
 - 2) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第81回日本細菌学会北海道支部学術集会, 北海道 (2014.8)
 - 3) 山崎栄樹, 竹内薫, 廣井豊子, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第157回日本獣医学会学術集会, 北海道 (2014.9)
 - 4) E Yamasaki, M Nakano, T Hirayama, H Kurazono. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. 49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections, フロリダ (米国) (2015.1).
 - 5) E Yamasaki, K Takeuchi, H Kurazono. Rapid serotyping method based on SNP profiles of a *Salmonella* specific gene. Global Health Institute 2015 researchers conference, チェンマイ (タイ) (2015.2)
 - 6) 山崎栄樹, 倉園久生. サルモネラ属菌特異的遺伝子のジェノタイピングによる迅速血清型別法の開発. 第88回日本細菌学会総会, 岐阜 (2015.3)
 - 7) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯辺順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 食中毒事件患者の糞便中志賀毒素濃度の解析. 第89回日本細菌学会総会, 大阪, (2016.3)

- 8) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 腸管出血性大腸菌による国内集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 東京都 (2016.9)
- 9) 山崎栄樹, 綿引正則, 磯部順子, 佐多徹太郎, 倉園久生. 国内 EHEC 集団食中毒事件患者の糞便中志賀毒素の定量的解析. 第 20 回 EHEC 感染症研究会, 富山県 (2016.11)
- 10) E. Yamasaki, M. Watahiki, J. Isobe, T. Sata, H. Kurazono. Quantitative detection of Shiga toxins directly from stool specimens of patients associated with an outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Japan. 51st US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other

Bacterial Enteric Infections, ソウル (韓国) (2017.2)

- 11) 山崎栄樹, 奥村香世, 江崎孝行, 倉園久生. 生物テロに用いられる細菌・毒素の検出法. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台 (2017.3)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

出願

発明者: 山崎栄樹, 倉園久生

出願番号: 特願 2016-121670

発明の名称: サルモネラ属菌の血清型判別用プローブ及びプライマー並びにその使用



図 1. 野外仕様型の Quick Mobile

電源に AC アダプター, 車載タバコ用電源, リチウム電源の 3 つを選択できる, 1.7 kg の軽量型遺伝子増幅装置. 乾燥 Primer が入れてある 4 つの Low profile PCR tube に試料 5 μ l, 2x の酵素液 5 μ l を加え, 全量 10 μ l の反応液で 25 分かけて遺伝子を増幅する. 増幅条件はカードに登録済みで, 現場ではワンタッチで反応が自動スタートする. 増幅後, 10 μ l の Streptavidin 標識 latex と DNA-Stick を加えてクロマトを行い, 増幅産物を目視で判定する.

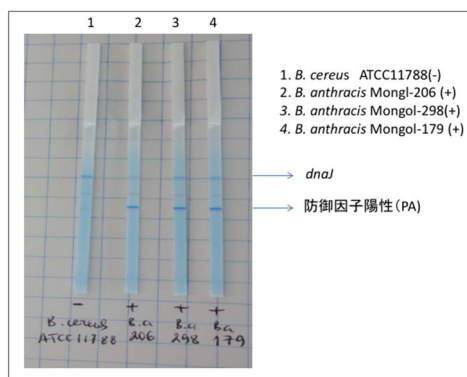


図 2. モンゴル国立感染症研究所保有炭疽菌株を使った DNA クロマトの結果
炭疽菌野外株 (2,3,4) は陽性で, 陰性対象のセレウス菌 (1) は陰性を示した.



図 3. 2013 年 5 月に炭疽で死亡した牛により汚染された土壌
この土壌サンプルに対して構築した DNA クロマトを実施したが、全て陰性であった。

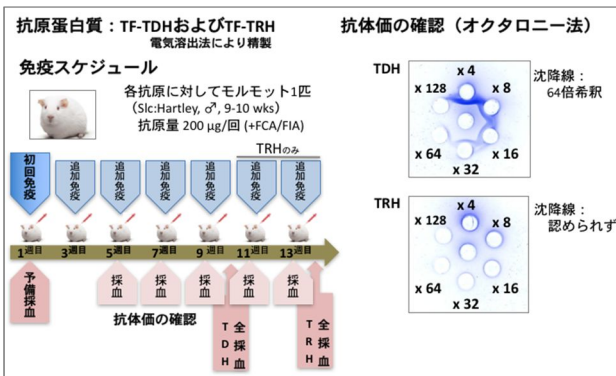


図 4. 抗 TDH および抗 TRH モルモット血清の作製
左に示した免疫条件に従って抗 TDH および抗 TRH 血清を得た後、抗体価の評価をオクタロニー法によって行った (右図)。その結果、抗 TDH 血清では 64 倍希釈血清においても沈降線が認められたのに対し、抗 TRH 血清では沈降線が認められなかった。

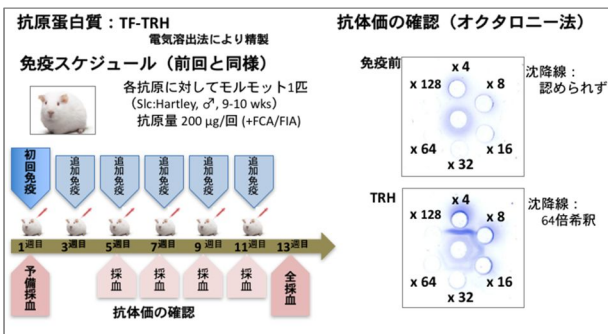


図 5. 抗 TRH モルモット血清作製の再試行
前回と同様の方法にて抗 TRH 血清を得た後、抗体価の評価をオクタロニー法によって行った。その結果、64 倍希釈の血清においても沈降線が認められた。

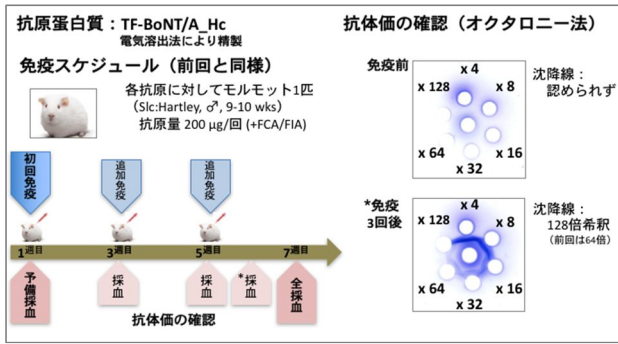


図 6 . 抗 BoNT/A_Hc モルモット血清の作製

左に示した免疫スケジュールに従って免疫し，抗 BoNT/A_Hc 血清を得た後，抗体価の評価をオクタロニー法によって行った . その結果，128 倍希釈の血清においても沈降線が認められた . 図は，2 度目の試行の結果を示した .

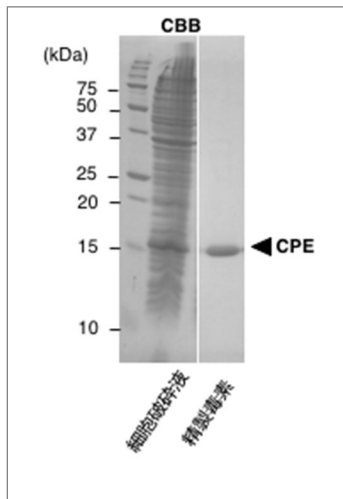


図 7 . 組換え CPE 蛋白質の精製度の確認

組換え大腸菌の細胞破砕液（精製前）および精製標品を SDS-PAGE で展開後，CBB 染色を行った .

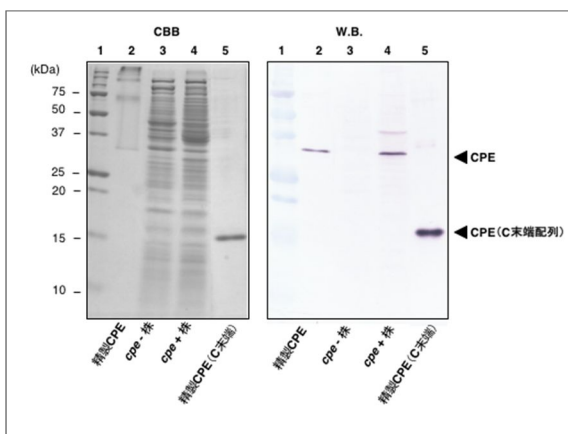


図 8 . CPE 特異的 IgG の野生型毒素との反応性解析

CPE 特異的 IgG を一次抗体として用い，ウエスタンブロッティングを行った . レーン 1: 分子量マーカー，レーン 2: 精製 CPE 蛋白質（バイオアカデミア社より購入），レーン 3: *cpe*-ウェルシュ菌分離株の菌体破砕上清，レーン 4: *cpe*+ウェルシュ菌分離株の菌体破砕上清，レーン 5: 免疫抗原として用いた精製組換え CPE（C 末端部分配列） . 左に CBB 染色，右にウエスタンブロッティング（W.B.）の結果を示す .