

令和元年6月19日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08026

研究課題名(和文) ウエルシュ菌産生壊死毒素(NetB)による鶏壊死性腸炎発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of chicken necrotic enteritis onset by *Clostridium perfringens* producing necrosis toxin (NetB)

研究代表者

向本 雅郁 (MUKAMOTO, Masafumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80231629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウエルシュ菌による鶏壊死性腸炎の必須の病原因子であるNetBは鳥類特に鶏に対して高い活性を有し、非常に種特異性が高い。この種特異性を規定するNetBの宿主細胞への結合に関する細胞側分子の特定を行った。唯一の感受性細胞株である鶏肝癌由来LMH細胞をマウスに免疫して作製した、NetBの細胞致死活性を抑制するモノクローナル抗体はLMH細胞膜上の約90kDaの分子と反応した。この分子をLC-MS/MSで解析したところ鶏トランスフェリン受容体蛋白であることが明らかとなった。本分子は鳥類と各種哺乳類間での相同性が低く、小腸で発現していることからNetBの細胞致死に関わる分子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、鶏壊死性腸炎の発症機構の解明につながり、発症予防のためのトキシドワクチン開発の一助となる。NetB産生A型菌は米国やヨーロッパの鶏から近年頻りに分離され、日本においても、保菌鶏および分離農場が年々増加していることから、輸入飼料に混入したNetB産生菌が、徐々に広がっていると想像される。NetB腸炎発症機構が明らかとなれば、鶏壊死性腸炎を発症させないための飼育条件の改善等、早急な対策を執ることが可能となり、本研究は家畜衛生学上貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：NetB that an essential pathogen of chicken necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*, has high activity against birds, particularly chickens, and has a high species specificity. I identified cell side molecules on the cell membrane involved in the binding of NetB to host cells. Some monoclonal antibodies that were prepared by immunizing mice with LMH cells derived from chicken liver cancer suppress lethal activity of NetB against LMH. The monoclonal antibodies reacted with a molecule of about 90 kDa on the LMH cell membrane. I analyzed this molecule by LC-MS/MS, so I revealed to be a chicken transferrin receptor protein. This molecule has low homology between birds and various mammals and expresses much on the small intestinal epithelial cells. Then I suggest that it may be a molecule involved in cytotoxicity of NetB.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：ウエルシュ菌 NetB 鶏壊死性腸炎 受容体 LMH

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌に起因するニワトリの壊死性腸炎はコクシジウム感染や抗生剤による腸内細菌叢の攪乱、高蛋白飼料の多給が誘因となり、突発的・散発的に死亡鶏が発生する伝染性疾病である。本病は世界の養鶏特にブロイラー産業に多大な損害をもたらしており、発生軽減への対策が急務となっている。起因菌である *C. perfringens* は、通常、土壌や家畜・家きんの腸管内容物から常在菌として分離される。ニワトリにおいて、本菌は、通常、盲腸内に多く存在するが、飼育環境や給与飼料等の影響による腸内細菌叢の攪乱が誘因となって小腸内で増殖することで本病を発生させる。ガス壊疽菌特有のガス充満により小腸内が膨張するとともに、本菌から産生される毒素・酵素により腸粘膜に壊死がおこり、偽膜形成や脱落により腸壁は菲薄化する。過去30年以上にわたって、鶏壊死性腸炎の病原因子は *C. perfringens* から産生される  $\alpha$  毒素 (phospholipase C) であると考えられてきた。しかし、2008年には壊死性腸炎分離菌から  $\beta$  毒素と38%の相同性を有する新規の蛋白毒素が発見され、NetB (Necrotic Enteritis Toxin B-like) と命名された。NetB 遺伝子 (*netb*) は *C. perfringens* A型菌のみが保有しており、保有菌のほとんどは鶏の糞便や飼料および飼育環境より分離され、他の動物種からはほとんど分離されていない。我が国でも、腸炎発症鶏、健常鶏に関わらず糞便中から容易に *netb* 保有菌が分離できることから、本菌は全国的に浸潤していると思われる。

*netb* をノックアウトした *C. perfringens* を鶏に感染させても壊死性腸炎は発症せず、ノックアウト株に *netb* を再導入すると発症することから、NetB は鶏壊死性腸炎発症のための必須の病原因子であると考えられている。<sup>2)</sup> 研究代表者も初生ヒナへの接種試験から、NetB 単独でも初生ヒナに腸炎を発生させることを初めて実験的に証明している (図1)。

NetB は分子量 33kDa の蛋白として菌体外に分泌され、酵素活性を持たず、細胞膜受容体に結合後、6~7 個の毒素分子が集合し、高分子複合体 (オリゴマー) として孔を形成し膜を破壊する細胞壊死毒素 (孔形成毒素) である。鶏腸管内で増殖した *C. perfringens* により産生された後、小腸上皮細胞に結合し、細胞を壊死させることにより腸炎を発生させると考えられている。研究代表者はこれまで、NetB の病原性発現機構を解明するため、NetB の病原性における種特異性に着目した。赤血球や株化細胞を用いた感受性試験の結果から、NetB に対する感受性はニワトリが属するキジ目や一部の鳥類に限定され、鳥類特にニワトリに対して種特異性が非常に高いことを明らかにした。(表1)。

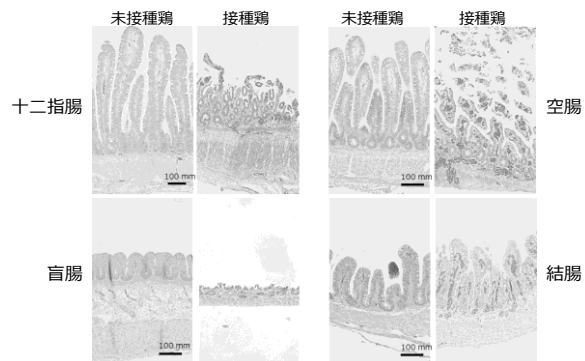


図1. NetB接種ヒナの腸病変

表1. 動物種によるNetBに対する感受性の違い

赤血球感受性試験		細胞感受性試験		
種名	HU <sub>50</sub> * (μg/ml)	細胞名	由来	EC <sub>50</sub> * (μg/ml)
ニワトリ (キジ目)	0.23	LMH	ニワトリ 肝臓	0.63
ホロホロチョウ (キジ目)	0.14	IEC-6	ラット 小腸	18
コクチョウ (カモ目)	1.1	3Y1	ラット 胎児線維芽細胞	33
カラス (スズメ目)	2.3	MDBK	ウシ 腎臓	31
ソデグロツル (ツル目)	3.5	CRFK	ネコ 腎臓	>50
カワラバト (ハト目)	4.1	MDCK	イヌ 腎臓	>50
コサギ (コウノトリ目)	11	Vero	サル 腎臓	>50
キンクベンギン (ベンギン目)	17	P3U1	マウス 骨髄腫	>50
ラット	1.8	C2C12	マウス 筋芽細胞	>50
ウサギ	3.3	L929	マウス 結合組織	>50
フタ	3.5	Caco-2	ヒト 結腸	>50
イヌ	5.1			
ウシ	12			
マウス	29			

\* 50%の溶血を引き起こすNetB濃度

\* 50%の細胞傷害を引き起こすNetB濃度

### 2. 研究の目的

NetB は *C. perfringens* (ウエルシュ菌) A型菌に起因する鶏壊死性腸炎の必須の病原因子 (毒素) で、酵素活性を持たず、孔を形成して細胞に穴を空け、壊死させる孔形成毒素である。NetB の毒素活性は鳥類特にニワトリに限定され、非常に種特異性が高い。この種特異性を含めた NetB による病原性発現機構を分子レベルで解明することを目的として研究代表者は研究を実施している。本研究では、種特異性を規定する NetB の細胞への結合に関与する細胞側分子を特定することにより、NetB による鶏壊死性腸炎発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。NetB に感受性のない Vero 細胞等では NetB の結合が観察されず、細胞膜上のコレステロールやリン脂質は結合に直接関与しないことを確認している。このことは結合に関与する細胞側分子は鳥類特にキジ目に特異的に発現している分子である可能性が高い。NetB 感受性細胞であるニワトリ肝癌由来株化細胞 (LMH 細胞) を用いて、NetB に結合する細胞側分子に対すモノクローナル抗体を作製し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) によりその分子を特定することで NetB 受容体であることを証明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) NetB の精製

##### 1) 使用菌株

当教室保存菌株のうち、中部地方の農場において壊死性腸炎と診断された鶏の糞便より分離された *netb* 陽性 *C. perfringens* A型菌 CNE OP004 株を用いた。

## 2) NetB の精製

CNE OP004 株を Tryptose peptone glucose (TPG) 培地 [5% Trypticase (BBL™), 0.5% Proteose-peptone (Bacto™), 0.4% D-Glucose (Wako), 0.1% Sodium thioglycolate (Wako), pH 7.2] に接種し、37°C で一晚静置培養した。培養液を 7.2 L の TPG 培地に接種し、37°C で 36 時間静置培養した後、培養液を 8,000 xg、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を回収した。上清に、最終飽和濃度が 50% となるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 30 分攪拌後、一晚静置した。沈殿物を 11,000 xg、20 分間、4°C で遠心分離により回収し、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、同緩衝液で 48 時間透析した。上清を 11,000 xg、10 分間、4°C で遠心分離によって回収した。Q Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) 17 ml をカラム (φ1.5 x 15 cm) に充填し、3L の同緩衝液で 3 回平衡化した。遠心上清を添加し、素通り画分のうち溶血活性がある分画を回収した。回収した溶液に、最終飽和濃度が 60% となるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 1 時間攪拌後、一晚静置した。沈殿物を 11,000 xg、20 分間、4°C で遠心分離により回収し、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、2L の同緩衝液で 3 回透析した。上清を 11,000 xg、10 分間、4°C で遠心分離によって回収した。同緩衝液で平衡化した TOYOPEARL® SP-650M (TOSOH) 20 ml をカラム (1.0 x 20 cm) に充填した。遠心上清を添加しカラムに吸着させた後、塩化ナトリウム濃度を 5 mM、50 mM、500 mM に調製した 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて、ステップワイズ法にて溶出を行った。溶出画分のうち、溶血活性がある分画を回収した。12.5%ゲルを用いた SDS-PAGE により精製度を確認後、精製毒素をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBS) 2L で 3 回透析し、-80°C で保存した。溶血試験及び細胞毒性試験により、精製毒素の毒素活性を測定した。

## 3) 溶血試験

PBS を用いて鶏無菌保存血 (日本生物材料センター) を 400 xg、10 分間、4°C の遠心分離により 2 回洗浄し、バフィーコートを除いた後、PBS で 2% 赤血球溶液を調製した。試料と赤血球との反応には 96 穴丸底マイクロプレート (IWAKI) を使用した。試料を 2 穴に 100 µl ずつ添加した。2% 赤血球溶液を 100 µl ずつ加え、ボルテックスミキサーを用いて混和した後、37°C で 1 時間インキュベートした。プレートを 200 xg、5 分間、4°C で遠心分離し、各穴の上清 100 µl を測定用の 96 穴平底マイクロプレート (IWAKI) に移した後、ヘモグロビンの吸収波長である 540 nm における吸光度を測定した。各希釈倍率につき 2 穴の吸光度の平均をとり、試料の代わりに PBS を用いたときの値を溶血率 0% とし、4% Triton X-100 (KANTO CHEMICAL) を用いて全ての赤血球を溶血させたときの値を溶血率 100% とした。各希釈倍率における溶血率は以下のように求めた。

$$\text{溶血率 (\%)} = \frac{\text{各希釈倍率での吸光度} - \text{0\%溶血での吸光度}}{\text{100\%溶血での吸光度} - \text{0\%溶血での吸光度}} \times 100$$

## 4) 細胞毒性試験

ニワトリ肝癌由来株化細胞 (以下、LMH 細胞) の増殖用培地には 10% ウシ胎児血清 (FCS; Cell Culture Bioscience) 含有 Waymouth's (GIBCO) を、測定用培地には 1% FCS 含有 Waymouth's を用いた。LMH 細胞を 25 cm<sup>2</sup> フラスコ (IWAKI) で単層になるまで培養した。細胞をフラスコから分離し、培地に懸濁後、96 穴細胞培養用マイクロプレート (IWAKI) に 100 µl ずつ分注し、37°C で一晚培養した。各穴を滅菌 PBS で洗浄した後、測定用培地で 2 倍階段希釈した NetB 溶液を 12 穴に 100 µl ずつ添加し、37°C で一晚培養した。以下、細胞致死活性の測定に関しては MTS 法を用いた。CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) を各穴に 20 µl ずつ添加し、37°C で 1 時間反応させた。各穴の試料 75 µl を新しいプレートに移し、ホルマザン産物の吸収波長である 490 nm における吸光度を測定した。各毒素濃度につき 4 well の吸光度の平均をとり、測定用培地のみで細胞を培養したときの値を細胞致死率 0% とし、測定用培地そのものの値を細胞致死率 100% とした。各毒素濃度における細胞致死率は以下のように求めた。

$$\text{細胞致死率 (\%)} = 100 - \frac{\text{各希釈倍率での吸光度} - \text{100\%細胞致死での吸光度}}{\text{0\%細胞致死での吸光度} - \text{100\%細胞致死での吸光度}} \times 100$$

## (2) SDS-PAGE および Western blotting

SDS-PAGE には 12.5%ゲルあるいは SuperSep™Ace, 5-20%, 13 well (Wako) を用い、Laemmli の方法に従った。還元処理は 100 mM (±) ジチオトレイトール (以下、DTT) で行った。Coomassie Brilliant Blue (以下 CBB) 染色には 0.25% CBB 溶液を用いた。Western blotting は電気泳動後、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Immobilon-P, Millipore) に転写し、5% スキムミルク-TBST (25 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.14 M NaCl-0.05% Tween20) で 30 分間ブロッキングを行った。1 次抗体としてウサギ抗 NetB IgG (370 µg/ml) 及びウサギ抗アクチン抗体 (SIGMA、1000 倍) あるいはモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清、精製した抗 NetB 細胞致死活性関連分子モノクローナル抗体および LMH 細胞膜分子免疫マウスより採取した血清 (3,000 倍) を用い、室温で 1 時間反応させ、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス

IgG (3,000 倍, BIO-RAD) を用い室温で 1 時間反応させた。2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (2000 倍, BIO-RAD)、発色試薬として 330  $\mu\text{l}/\text{ml}$  NBT、165  $\mu\text{l}/\text{ml}$  BCIP 含有 color development solution (Promega) を用いた検出を行った。また 2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を用い、化学発光キット (SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Mximum Sensitivity Substrate; Thermo) による検出も行った。方法は、キット添付のマニュアルに準拠した。化学発光の観察および撮影には、ルミノイメージアナライザー LAS-3000 (GE Healthcare) を用いた。

### (3) モノクローナル抗体の作製

#### 1) ハイブリドーマの作製

LMH 細胞をフラスコから分離後、PBS で  $3.0 \times 10^6$  /ml に調製し、マウス (BALB/c) 3 匹に 500  $\mu\text{l}$  腹腔内投与した。また、精製した LMH 細胞膜を PBS で 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調製し、アジュバント (TiterMax<sup>®</sup> Gold) と等量混合後、別のマウス 3 匹に 200  $\mu\text{l}$  皮下および筋肉内投与した。各免疫 3 回目以降、免疫 1 週間後に尾静脈より採血し、血清中の抗体価を ELISA により測定した。抗体価が十分に高くなっていることを確認後、細胞融合の 3 日前に最終免疫を行った。三種混合麻酔 (塩酸メedetミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg、酒石酸ブトルファンール 5 mg/ml) による麻酔を行い、脾臓を摘出した。脾細胞を調製し、ミエローマ細胞 P3U1 と混合した後ポリエチレングリコール 4000 により細胞融合を行った。15%FCS 含有 D-MEM 培地で 37°C、一晚培養後、遠心分離により細胞を回収し、HAT (100  $\mu\text{M}$  ヒポキサンチン、0.4  $\mu\text{M}$  アミノプテリン、16  $\mu\text{M}$  チミジン) を加えた培地でミエローマ細胞濃度が  $2 \times 10^5$  /ml となるよう調製した後、96 well 細胞培養用マイクロプレート (IWAKI) にてハイブリドーマの選択培養を行った。2 週間後、培養上清を用いた ELISA、NetB 細胞致死活性阻害試験により抗体スクリーニングを行った。選別されたハイブリドーマについて、限界希釈法によりクローニングを行った。2 週間後、シングルコロニーを形成したハイブリドーマについて ELISA および NetB 細胞致死活性阻害試験による抗体スクリーニングを行った。その後、シングルコロニーを形成した well がすべて抗体スクリーニング陽性となるまで各クローンについてクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。

#### 2) 無血清培地を用いた培養

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 15%FCS 含有 D-MEM 培地で培養した。細胞を遠心分離により回収し、培地をハイブリドーマ用無血清培地 (Wako) に変更し、細胞数  $1.0 \times 10^5$  /ml となるように 75  $\text{cm}^2$  フラスコに播種した。37°C で 3 日間培養し、培養上清を 1,000  $\times$  g、5 分間遠心し上清を回収した。回収した上清に最終飽和濃度が 50% となるように硫酸アンモニウムを加え、4°C で 1 時間攪拌後、一晚静置した。沈殿物を 12,000  $\times$  g、20 分間、4°C で遠心分離により回収し、PBS に懸濁し、PBS で 48 時間透析した。SDS-PAGE により抗体の精製を確認した。抗体のアイソタイプ同定には Iso-Gold Rapid Mouse-Monoclonal Isotyping Kit (BioAssay Works) を用いた。

#### 3) 培養上清および免疫マウス血清を用いた細胞免疫蛍光染色

LMH 細胞を増殖用培地に懸濁し、8 well チャンバースライド (IWAKI) に 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した後、37°C で単層になるまで培養した。チャンバーを外して PBS で 2 回洗浄後、3% パラホルムアルデヒド水溶液に浸漬し、20 分間静置し固定した。PBS で 2 回洗浄後 3% ヤギ血清を添加し 30 分間静置しブロッキングを行った。PBS で 2 回洗浄後、ハイブリドーマ培養上清または免疫マウス血清を 200  $\mu\text{l}$  添加し、37°C で 30 分間静置した。2 次抗体として抗マウス IgG DyLight549 (Jackson ImmnoResearch Laboratories, Inc.) を添加し 30 分間静置した。PBS で 3 回洗浄し、Aqueous Mounting Medium PermaFluor (Thermo scientific) を滴下し、カバーガラスを重ねし、倒立顕微鏡 (励起波長 560 nm、吸収波長 630 nm、KEYENCE BZ-9000) で観察を行った。

## 4. 研究成果

LMH 細胞膜をマウスに免疫することにより、NetB の細胞致死活性を阻害するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いて LMH 細胞上の NetB と結合する分子を単離した。さらに、外部機関に委託して LC-MS/MS データベースによる解析も実施した。

(1) モノクローナル抗体の作製 LMH 細胞免疫マウスおよび LMH 細胞膜免疫マウスで抗体価の上昇が確認された。常法により細胞融合し、2 回目のクローニング後の抗体スクリーニングにより、細胞免疫マウスより 1 クローン、細胞膜免疫マウスより 3 クローン、計 4 クローンの抗 NetB 細胞致死活性関連分子と結合するモノクローナル抗体産生クローンが得られた。細胞免疫蛍光染色の結果、LMH 細胞表面に結合する抗体の存在が確認された (図 2)。

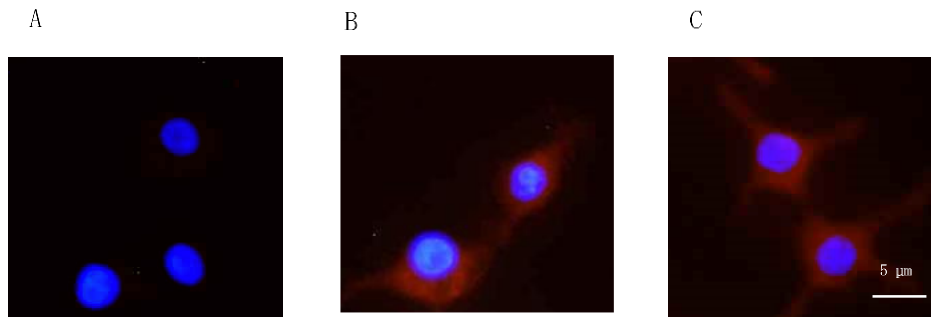


図2. モノクローナル抗体を用いた LMI 細胞の免疫蛍光染色

A)非免疫マウス血清添加 LMI 細胞の免疫蛍光染色 B) LMI 細胞膜免疫マウス血清添加 LMI 細胞の免疫蛍光染色 C) NetB の細胞致死阻害活性を有する抗体を添加した LMI 細胞の免疫蛍光染色

## (2) クロマトグラフィー質量解析計 (LC-MS/MS)

精製モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、90 kDa 付近に特異的なバンドが検出された。SDS-PAGE 後のゲルより同位置のバンドを切り出し、LC-MS/MS のサンプルとした。

解析の結果、100 以上のニワトリ由来分子が候補分子としてヒットした。上位 10 分子を表に示した (表 2)。その中から細胞膜上に存在すると考えられたマイクロソームトリグリセリド輸送タンパク質およびトランスフェリン受容体タンパク質についてホモロジー検索を行い、アミノ酸配列を鳥類と哺乳類間で比較した。その結果、マイクロソームトリグリセリド輸送タンパク質では 67%程度の同一性と 93%以上の類似性、トランスフェリン受容体タンパク質では 51%前後の同一性と 85%前後の類似性を示した。鳥類と哺乳類間の相同性が高いバロシン含有タンパク質では、ほぼ 100%の同一性と類似性であった (表 3)。続いて、選択した 2 分子が鳥類細胞に特異的に発現する分子であるかを調べるため、ホモロジー検索により鳥類と哺乳動物間におけるアミノ酸配列の比較を行った。その結果、トランスフェリン受容体タンパク質において、マイクロソームトリグリセリド輸送タンパク質と比較して鳥類と各種哺乳類間での相同性がより低い結果となった (表 3)。

表 2. LC-MS/MS により同定された主な鳥類由来分子

蛋白名	Accession Number	分子量 (kDa)	同定確率 (%)
heat shock protein 108	AAA48826.1(+2)	92	100
microsomal triglyceride transfer protein large subunit*	ABV68573.1	132	100
Cluster of ATPase	AAA48607.1[13]	112	100
valosin containing protein	BAE92937.1(+3)	89	100
Cluster of catenin beta-1	NP_990412.2[4]	85	100
Cluster of elongation factor 2	AAA87587.1[4]	95	100
chicken transferrin receptor protein*	XP_015146868.1[3]	97	100
hypothetical protein RCJMB04_2d15	CAG31088.1(+2)	68	100
Cluster of AP-2 complex subunit alpha-2 isoform X1	XP_015142099.1[3]	107	100
mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	XP_416314.2	101	100

\*細胞膜上に存在する分子

トランスフェリン受容体は鉄輸送タンパク質であるトランスフェリンの受容体であり、鉄の細胞内取り込みに関わる細胞膜糖タンパク質である。様々な動物種の様々な組織で発現するが、主に鉄を多く必要とする赤血球の他、腸粘膜上皮や胎盤など増殖活性の高い細胞において特に高レベルに発現することがわかっている。NetB の溶血活性、腸粘膜上皮への傷害性、および NetB の種特異性などを踏まえると、赤血球や腸粘膜上皮で多く発現し、鶏において特異性の高いトランスフェリン受容体が NetB の細胞致死活性に関与している可能性は十分に考えられ、NetB の受容体候補として否定できない。今後、NetB 非感受性細胞に鶏トランスフェリン受容体を強制発現させた細胞を作製し、NetB 感受性獲得の有無を解析する予定である。

表 3A. ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質における  
鳥類と哺乳類間のアミノ酸配列の比較

	同一性 (%)	類似性 (%)
ヒト	66	93
ウシ	65	94
ウマ	67	94
マウス	67	93
チャイニーズハムスター	67	94
イヌ	67	93
ネコ	67	94

表 3B. トランスフェリン受容体タンパク質における  
鳥類と哺乳類間のアミノ酸配列の比較

	同一性 (%)	類似性 (%)
ヒト	51	86
ウシ	52	84
ウマ	51	85
マウス	51	86
チャイニーズハムスター	52	85
イヌ	53	84
ネコ	52	85

表 3C. バロシン含有タンパク質における鳥類と哺乳類間の  
アミノ酸配列の比較

	同一性 (%)	類似性 (%)
ヒト	98	100
ウシ	99	100
ウマ	—	—
マウス	99	100
チャイニーズハムスター	—	—
イヌ	—	—
ネコ	—	—

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. 友居瑞栄、向本雅郁 *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2 毒素の性状解析 第 160 回日本獣医学  
会学術集会 (鹿児島) 2017 年
2. 早瀬穂奈実、向本雅郁 鶏壊死性腸炎起因菌が産生する異なる分子量の NetB と病原性の関  
連性について 第 159 回日本獣医学学会学術集会 (藤沢) 2016 年