

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10703

研究課題名(和文) ナノポアシーケンサーを用いた各種法科学的試料の迅速微生物同定法の確立に関する研究

研究課題名(英文) Research on establishment of rapid microbial identification method for various forensic samples using nanopore sequencer

研究代表者

武藤 淳二 (Muto, Junji)

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：80432186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：法科学的試料として、野兔病で死亡したノウサギ死体の臓器や血餅等からナノポアシーケンサーを用いて野兔病菌のリードを検出できるか調べた。死後経過して腐敗した死体の試料は野兔病菌の分離培養が困難であったが、これらからナノポアシーケンサーを用いて野兔病菌のリードを検出できた。一方、リードを解析するとリード長が短かったことが判明したため、試料調製法をロングリードを得るのに適した方法に変更した。この方法で腐敗死体血餅を調製・解析するとリード長が延長していた。また、この方法で11年間冷凍保管していた化膿レンサ球菌を含む血液を調製し、同様にリードを検出できるか調べたところ、化膿レンサ球菌のリードが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品汚染や生物テロ等の病原微生物を用いた犯罪では、被害者の処置、被害拡大防止の対応および捜査のため、試料に含まれる微生物を迅速に検出・同定することが求められる。本研究では、迅速性や利便性で注目されているナノポアシーケンサーを用いて、血液や臓器等の法科学的試料から含まれている微生物を検出できるか検証した。野兔病で死亡したノウサギ死体の臓器や化膿レンサ球菌を含む血液試料から目的の細菌を検出でき、法科学的試料から微生物を検出・同定するのにナノポアシーケンサーは有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the reads of *Francisella tularensis* could be detected from the organs and blood clots of the hares dead from tularemia using a nanopore sequencer. It was difficult to isolate and culture *F. tularensis* from the samples of the rotting carcass after death. However, the reads of *F. tularensis* could be detected from these samples using a nanopore sequencer. On the other hand, a detailed analysis of the reads of the samples revealed that the read length was short. Therefore, we changed the sample preparation to the method suitable for obtaining long reads. Preparation of the blood clots of the rotting carcass by this method increased read length. In addition, the *Streptococcus pyogenes*-contained blood sample, which had been frozen and stored for 11 years, was prepared by this method, and it was examined whether the reads of *S. pyogenes* could be detected in the same manner. As a result, the reads of *S. pyogenes* could be detected.

研究分野：微生物学、ウイルス学、法医学

キーワード：ナノポアシーケンサー 微生物 ロングリード 検出 感染臓器 ゲノム解析 同定 法科学的試料

1. 研究開始当初の背景

1970年代半ばにサンガーによって開発された DNA シーケンス技術は、近年の生命科学に多大な進歩をもたらした技術の一つである。この技術による塩基配列の決定は、多くの実験室で今なお高価な装置を用いて行われている。一方、2005年になると、それまでのシーケンス技術とは異なる方法により、短い塩基配列を大量かつ高速に読み出せる「次世代シーケンサー」が登場した。特に近年登場したナノポアシーケンサーでは、安価かつ迅速なシーケンシングが可能となり、装置が手の平サイズという携帯性から、臨床現場や野外での塩基配列解読が可能となってきている。ナノポアシーケンサーは PCR による DNA 増幅を必要とせず、1分子の DNA 鎖から塩基配列を長く高速で読み出すことが可能である。実際には、DNA の一本鎖がナノポアを通して各塩基が様々な順番で通過する際、塩基ごとに異なる電流を生じることから、その変化をセンサーチップでとらえて配列を解読する。

一般に感染性試料を検査する際、微生物を培養した後、ELISA 等の抗原抗体反応を用いる検査や、PCR によって増幅した遺伝子を電気泳動で確認するなど数多くの検査が行われる。実際は専門家が臨床症状や経過等から微生物種を推定し、種に特異的な抗体やプライマー等を用意して検査を行うこととなり、同定には多くの時間や労力を要するのが現状である。その点、ナノポアシーケンサーを用いた微生物種の検出は、臨床症状等による種の推定を必要とせず、試料から簡単にライブラリを作製してシーケンサーに導入・解析できるので、省力化や迅速化の上で強力なツールである。また、装置の携帯性および配列を読みながら逐次解析できるソフトウェアにより、インターネットにつながるノートパソコンがあれば、採取した試料をリアルタイムで解析し、現場で病原微生物の遺伝子を検出することも可能である。

研究代表者はこれまで、感染臓器等の試料から迅速に病原ウイルスの遺伝子を検出する方法について、非特異的プライマーを用いた網羅的遺伝子増幅法を検討し、有用性の確認を行った。近年、塩基配列の取得や解析は次世代シーケンサーを用いるものに移行しつつあるが、装置が高価なうえ、試料を装置に導入するためのライブラリ調製に時間と労力を要するのが現状である。そこで研究代表者は、比較的安価で携帯性があり、ライブラリ調製が簡便かつリアルタイムシーケンシングも可能なナノポアシーケンサーに着目し、微生物検査の省力化および迅速化が図れるのではないかと考えた。

一方、研究代表者が所属する研究所で取り扱う微生物検査の試料は、血液、組織、体液、衣服、スワブ、水、土壌など多岐にわたり、どのような試料が持ち込まれるか分からないのが現状である。研究代表者らはこれまでに細菌を含む血液試料や、ウイルス液を付着・乾燥させたステンレス片などの模擬試料を作製しており、試料が持ち込まれた時の微生物検査に対応するため、感染臓器試料や微生物を含む模擬試料からナノポアシーケンサーを用いて目的の微生物を迅速に検出できるか検討した。

2. 研究の目的

本研究では、ナノポアシーケンサーによる塩基配列解読技術を用いて、微生物を含む各種法科学的試料から微生物遺伝子等の配列を検出し、試料中の微生物を迅速に同定する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いた材料

法科学的試料として、野兔病で死亡したノウサギの死体材料を用いた。死後約2日の死体(死後2日死体)の脾臓および血餅、死後経過して腐敗した死体(腐敗死体)の血餅、腸管、耳と耳の間の筋肉および頬肉から DNA を抽出した。死後2日死体は、前日の夕方には無かった場所で次の日の朝に発見されたもので、この翌日に解剖と培養が行われ、*Francisella tularensis*(野兔病菌)が分離されている。腐敗死体は、猟で捕獲されたノウサギが解体された後コンポストに放置されていて、解体した人が野兔病を発病したことが判明したことから、解体の約2ヶ月後にコンポストから回収され、血餅、腸管、耳と耳の間の筋肉および頬肉が採取された。雑菌を多く含んでいたこともあり、これらの材料から野兔病菌は分離されなかったが、PCR により野兔病菌遺伝子が検出され、患者由来サンプルと MLVA パターンの同一が確認されている。

また、11年前に当研究所で作製して冷凍保管していた、*Streptococcus pyogenes*(化膿レンサ球菌)を含む血液試料を用いた。

(2) ナノポアシーケンシング

ライブラリの調製にはオックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社のラピッド・シーケンシング・キットを用いた。フローセルは MinION 用または Flongle を使用し、MinION でシーケンスを行ってリードのデータを取得した。

(3) リードの解析

ナノポアシーケンシングで得られたデータは、オックスフォード・ナノポア・テクノロジーズ社が提供する EPI2ME ワークフローの What's in my pot (WIMP) および CLC ゲノミクスワークベンチ (キアゲン社) でリードを解析した。

(4) ノウサギ死体の血餅および脾臓データの詳細な解析

腐敗死体の血餅、死後 2 日死体の血餅および脾臓から得られたデータについて、詳細な解析を先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム (先進ゲノム支援) のサポートにより実施した。

4. 研究成果

(1) 特定の微生物種のリードを取り出すリード抽出ツールの作成

ナノポアシーケンスで得られるデータには、試料に含まれている宿主や様々な微生物のリードが混在しているが、データを WIMP で解析すると、リードが多い順に判定された微生物種の分類ランキングが作られる。そこで、WIMP で判定された微生物種のリードを取り出すため、試料から得られたデータから特定の微生物種のリードを抽出するツールを作成した。

(2) ノウサギ死体の臓器や筋肉からの野兔病菌の検出

死後 2 日死体の脾臓、腐敗死体の腸管、耳と耳の間の筋肉および頬肉からリードを取得し、WIMP で解析した。試料ごとに野兔病菌と判定されたリード数の順位を調べたところ、死後 2 日死体の脾臓では宿主のリードに次いで野兔病菌のリードが 2 位であった。腐敗死体では、腸管で 24 位、頬肉で 13 位、耳と耳の間の筋肉で 14 位であった。また、腐敗死体の腸管ではセラチア菌やモルガン菌などの細菌、筋肉ではコムギ黒さび病菌やロボスポランギウムなどのカビのリードが野兔病菌より優勢となっていた (表 1)。

野兔病菌の分離培養が困難だった腐敗死体の試料から野兔病菌のリードを検出でき、このような試料から微生物を検出するのにナノポアシーケンサーは有用と思われる。

表 1 WIMP で検出された微生物種 24 位までの分類ランキング

死後 2 日死体 脾臓	腐敗死体 腸管	腐敗死体 頬肉	腐敗死体 耳の間の筋肉
1 Host	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Host	Host
2 <i>Francisella tularensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Puccinia graminis</i>	<i>Puccinia graminis</i>
3 <i>Puccinia graminis</i>	<i>Enterobacter sp. FY-07</i>	<i>Lobosporangium transversale</i>	<i>Lobosporangium transversale</i>
4 <i>Lobosporangium transversale</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>
5 <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
6 <i>Colletotrichum higginsianum</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Marssonina brunnea</i>
7 <i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	<i>Marssonina brunnea</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>
8 <i>Blastomyces gilchristii</i>	Host	<i>Paracoccidioides lutzii</i>	<i>Blastomyces gilchristii</i>
9 <i>Marssonina brunnea</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
10 <i>Sphaerulina musiva</i>	<i>Flavonifractor plautii</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	<i>Setosphaeria turcica</i>
11 <i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Blastomyces gilchristii</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>
12 <i>Paracoccidioides lutzii</i>	<i>Parabacteroides sp. CT06</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Sphaerulina musiva</i>
13 <i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>
14 <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
15 <i>Pyrenophora teres</i>	<i>Bacteroides caecimuris</i>	<i>Anthracozytis flocculosa</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
16 <i>Candida dubliniensis</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Sphaerulina musiva</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>
17 <i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
18 <i>Fonsecaea nubica</i>	<i>Lachnoclostridium sp. YL32</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
19 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>
20 <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
21 <i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Eutypa lata</i>
22 <i>Eutypa lata</i>	<i>Ruminiclostridium sp. KB18</i>	<i>Eutypa lata</i>	<i>Tuber melanosporum</i>
23 <i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Alistipes fingoldii</i>	<i>Tuber melanosporum</i>	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
24 <i>Rhodotorula graminis</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Pyrenophora teres</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>

(3) ノウサギ死体の血餅からの野兔病菌の検出

死後 2 日死体および腐敗死体の血餅からリードを取得し、WIMP で解析した。野兔病菌と判定されたリード数の順位を調べたところ、腐敗死体の血餅では大腸菌、*Shigella boydii*、*Yersinia enterocolitica* のリードに次いで野兔病菌のリードが 4 位となった。腐敗死体の血餅も野兔病菌の分離培養が困難な試料であったが、ナノポアシーケンサーによって野兔病菌のリードを検出できた。

一方、死後2日死体の血餅では宿主、大腸菌、*S. boydii*のリードに次いで野兎病菌のリードが4位であった。死後2日死体の脾臓では宿主を除いて野兎病菌のリードが最も多く、腐敗のない血餅試料で野兎病菌以外の細菌が検出される可能性は低いと考えられることから、この結果に疑問を持ち、先進ゲノム支援のサポートを受けて解析を実施した(後述)。

(4) 菌株へのマッピングによる解析

死後2日死体の血餅データからリード抽出ツールを用いて大腸菌、*S. boydii*および野兎病菌のリードを取り出し、CLCゲノミクスワークベンチを用いて各菌の代表株にマッピングした。WIMPで野兎病菌と判定されたリードの99.0%が野兎病菌SCHU株へマップされたのに対し、大腸菌や*S. boydii*と判定されたリードは1本も代表株へマップされなかった。

腐敗死体の血餅データから大腸菌、*S. boydii*、*Y. enterocolitica*および野兎病菌のリードを取り出し、同様にマッピングしたところ、野兎病菌と判定されたリードの98.8%が野兎病菌SCHU株へマップされたのに対し、大腸菌と判定されたリードのうち大腸菌EC1株へマップされたのは4.7%、*S. boydii*と判定されたリードのうち*S. boydii*600657株へマップされたのは0.3%のみであった。一方、*Y. enterocolitica*では判定されたリードの87.2%が*Y. enterocolitica*8081株へマップされた。

リード抽出ツールで取り出したリードの解析により、WIMPの判定精度が菌種によって大きく異なっていたことが判明した。

(5) 先進ゲノム支援によるノウサギ死体の血餅および脾臓データの詳細な解析

死後2日死体の血餅データから取り出した大腸菌、*S. boydii*、野兎病菌のリード、腐敗死体の血餅データから取り出した大腸菌、*S. boydii*、*Y. enterocolitica*および野兎病菌のリードのほか、死後2日死体の脾臓データからリード抽出ツールを用いて野兎病菌および*Puccinia graminis*のリードを取り出し、これらのリードの詳細を先進ゲノム支援のサポートを受けて解析した。

死後2日死体試料のデータから取り出した各菌種のリードをBLAST検索して解析した結果、WIMPで野兎病菌と判定されたリードは野兎病菌由来であったのに対し、それ以外のリードは宿主由来であった。一方、腐敗死体試料のリードを解析した結果、野兎病菌と判定されたリードは野兎病菌由来であったが、それ以外のリードは*Y. enterocolitica*や大腸菌など原核生物に由来するリードであった。また、ナノポアシーケンスであることから、得られたリードは長いと予測していたが、ほとんどのリードが1,000 bp以下と短かったことが判明し、ロングリードを得るのに適した試料調製が必要と分かった。

(6) 宿主ゲノムへのマッピング

死後2日死体のデータから取り出した各菌種のリードは、野兎病菌以外は宿主由来であったことから、宿主としてユキウサギ(*Lepus timidus*)のゲノムに血餅データをマッピングし、マッピングされなかった残存データをWIMPで解析した。その結果、野兎病菌のリード数は変わらなかったが、宿主および野兎病菌以外の微生物と判定された種のリード数の減少が確認された(表2)。

この方法は感染性試料から宿主のデータを排除して微生物を解析する際に有用と思われる。

表2 宿主ゲノムにマッピング後の残存データのリード数

	判定された種	元データのリード数	残存データのリード数
1	Host	11,564	2,818
2	<i>Escherichia coli</i>	9,901	1,792
3	<i>Francisella tularensis</i>	521	521
4	<i>Salmonella enterica</i>	407	65
5	<i>Escherichia marmotae</i>	290	60
6	<i>Acinetobacter seifertii</i>	161	30
7	Shigella virus SfMu	110	25
8	Escherichia virus Mu	66	17
9	<i>Shigella flexneri</i>	45	10

(7) 試料調製法の検討

ロングリードを得るため、Genomic-tip(キアゲン社)とショートリード・エリミネーターキット(circulomics社)を用いて腐敗死体の血餅試料を調製し、ナノポアシーケンスを行った。得られたデータをNanoPlotで解析したところ、この方法で試料調製した結果、リード・クオリティの平均は10.5から10.3と変化は見られなかったが、平均リード長は553.1から1607.6となり、3倍近い増加が確認された。

(8) 長期保管血液試料からの検出

Genomic-tip を用いて、11 年間冷凍保管してあった化膿レンサ球菌を含む血液試料を調製し、ナノポアシーケンスを行ってデータを取得した。WIMP で解析したところ、宿主を除いて大腸菌のリードが最も多く、その次に化膿レンサ球菌のリードが検出された。リード抽出ツールを用いて大腸菌および化膿レンサ球菌のリードを取り出し、fasta に変換した後に BLAST 検索して解析したところ、WIMP で大腸菌と判定されたリードは、死後 2 日死体試料の場合と同様、宿主由来であったのに対し、化膿レンサ球菌と判定されたリードは化膿レンサ球菌由来であった。

そこで、データを宿主ゲノムにマッピングし、マッピングされなかった残存データを WIMP で解析したところ、宿主および化膿レンサ球菌以外の微生物と判定されたリード数の大幅な減少が確認された（表 3）。

表 3 宿主ゲノムにマッピング後の残存データのリード数

判定された種	元データのリード数	残存データのリード数
1 Host	170,743	801
2 <i>Escherichia coli</i>	273	31
3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	87	85
4 <i>Escherichia marmotae</i>	45	7
5 Shigella virus SfMu	37	3
6 <i>Escherichia virus Mu</i>	7	0
7 <i>Salmonella enterica</i>	4	1
8 <i>Streptococcus</i> sp. NCTC 11567	1	1

(9) 今後の展望

11 年前に化膿レンサ球菌を含む血液試料を作製した際、冷凍した試料のほかに試料を 4 や室温で保管している。そこで本研究の方法により、これらから化膿レンサ球菌のリードを検出できるか検証し、この技術を法科学的試料の微生物同定に活用する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Junji Hosokawa-Muto, Yukiko Sassa-O'Brien, Yoshihito Fujinami, Hiroaki Nakahara	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis Comparison for Rapid Identification of Pathogenic Virus from Infected Tissue Samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12010196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akitoyo Hotta, Osamu Fujita, Kiyoshi Tanabayashi, Akihiko Uda, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Hisaaki Sato, Michio Suzuki, Shigeru Morikawa, Ken Maeda	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Two Strains of Francisella tularensis subsp. holarctica bv. japonica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01127-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01127-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akitoyo Hotta, Neekun Sharma, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Deyu Tian, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, Ken Maeda	4. 巻 8
2. 論文標題 Virulence of Francisella tularensis Subspecies holarctica Biovar japonica and Phenotypic Change during Serial Passages on Artificial Media	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8121881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Junji Hosokawa-Muto, Hiroki Sakai, Yukiko Sassa, Yoshihito Fujinami, Mai Kishimoto, Hiroaki Nakahara	4. 巻 15
2. 論文標題 Rapid detection of pathogenic virus genome sequence from throat and nasal swab samples using an exhaustive gene amplification method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Science, Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 399, 403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12024-019-00128-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Deyu Tian, Akihiko Uda, Yasushi Ami, Akitoyo Hotta, Eun-sil Park, Noriyo Nagata, Naoko Iwata-Yoshikawa, Akio Yamada, Kazuhiro Hirayama, Kozue Miura, Yuki Koyama, Mika Azaki, Shigeru Morikawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Protective effects of the Francisella tularensis pdpC mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in Cynomolgus macaques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 9193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45412-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mika Azaki, Akihiko Uda, Deyu Tian, Katsuyoshi Nakazato, Akitoyo Hotta, Yasuhiro Kawai, Keita Ishijima, Yudai Kuroda, Ken Maeda, Shigeru Morikawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Effective methods for the inactivation of Francisella tularensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 武藤 (細川) 淳二, 岸本麻衣, 藤浪良仁, 中原弘明
2. 発表標題 次世代シーケンサーによる死後経過した感染臓器試料中のウイルス遺伝子の検出
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤浪良仁, 武藤淳二, 岸本麻衣, 中原弘明, 松村栄治
2. 発表標題 超微細高密度オゾン分子水による炭疽菌芽胞の迅速殺菌
3. 学会等名 第19回日本バイオセーフティ学会 総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田明豊, 宇田晶彦, 藤田 修, 森川 茂, 前田 健
2. 発表標題 環境中におけるFrancisella属菌の生存性の検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田明豊
2. 発表標題 国内分離Francisella hispaniensis KUMA-UJP1株に関する病原学的研究
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野貴代, 中原弘明, 藤浪良仁, 武藤淳二
2. 発表標題 特異的微生物種検出法としてのRPA法の有用性について
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 村上賢二, 彦野弘一, 堀田明豊, ほか45名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 家畜伝染病ハンドブック	

1. 著者名 賀来敬仁、土屋真希、堀田明豊、ほか73名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 385
3. 書名 別冊日本臨牀 領域別症候群シリーズ No.20	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	堀田 明豊 (Hotta Akitoyo) (90392323)	国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------