

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360399

研究課題名（和文） 家畜感染症制御を目指すファージセラピーの実践的試み

研究課題名（英文） Practical control of pathogens which causes stock animal diseases

研究代表者

丹治 保典（TANJI YASUNORI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：00282848

研究成果の概要（和文）：

牛乳房炎起因 *S. aureus* を 49 種スクリーニングし、それらを用い特異的ファージをスクリーニングした。各ファージの感染宿主域を調べたところ ϕ SA012 および ϕ SA039 と命名したファージは感染宿主域が広く、*S. aureus* に対し高い溶菌活性を示した。In vitro の系で、各ファージ単独、または混合状態で *S. aureus* の増殖を抑制した。本研究により、*S. aureus* 起因牛乳房炎をファージにより抑制するファージセラピーの道筋が示された。

研究成果の概要（英文）：

49 *S. aureus* isolates were obtained from the milk of mastitic cows for use in the screening of staphylococcal phages. The host ranges of phages isolated were determined, and two phages were subsequently chosen for analysis. ϕ SA039 had the widest host range, producing clear plaques on 13 of the 15 isolates, while ϕ SA012 produced clear plaques on 8 isolates. This study constitutes a solid basis on which to continue the exploration of the potential of ϕ SA012 and ϕ SA039 in the treatment of staphylococcal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バクテリオファージ・乳房炎・黄色ブドウ球菌・*Staphylococcus aureus*・ファージセラピー・耐性菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 牛乳房炎

日本における抗生物質の使用量は年間 2210 トン(2003 年)であり、その内ヒト医薬用が 520 トン(24%)、家畜用 1060 トン(48%)、養殖魚用 230 トン(10%)、農薬用 400 トン(18%)である。いかに大量の抗生物質が家畜に投入されているかが分る。抗生物質の家畜

への投与が始まったのは 1960 年代で、まもなく家畜病原菌が抗生物質に対し耐性を示す薬剤耐性菌が出現した。家畜感染症の多くは人畜共通の病原菌を原因とする。日本では年間約 2 万人もの「抗生物質耐性菌」感染による死者が出ており、今後その数はさらに増えると思われる。このような背景から世界保健機構（WHO）は家畜への抗生物質過剰使用

を控えるよう警告している。一方で、抗生物質に代わる有効な治療法が無いのが現状である。

バクテリオファージは細菌に感染するウイルスであり、自然界に普遍に存在し、細菌叢のダイナミックな変動や遺伝子の水平伝播に重要な役割を果たしている。ファージは自分が感染する相手(宿主)を厳密に見分ける機能を有し、一回の感染サイクルで百数十のファージが被感染細菌から放出される。我々はこれまでに大腸菌 O157:H7 に感染するファージを多数分離し、宿主とファージの感染動力学に関する研究を実施した。さらにファージ頭殻を外来タンパク質発現用のプラットホームとして捉え、大腸菌特異的ファージ頭殻に抗原タンパク質を提示し、自立複製型経口ファージワクチンの開発を実施している。今までの研究対象はフラスコ内におけるファージと宿主の解析、およびマウスを用いた実証にとどまっていた。本研究はこれまでの成果を踏まえ、家畜感染症をファージで制御することを実証することにある。

(2) *S. aureus*

S. aureus (*Staphylococcus aureus*) は伝染性乳房炎起因菌の一つである。乳房炎は細菌、真菌や藻類等の 150 種類以上の異なる微生物が原因とされているが、その中でも *S. aureus* は乳腺内に膿瘍を形成するため治療が困難となる。これは、通常の乳房炎軟膏による治療では膿瘍の深部にまで抗生物質が届かないためだとされている。治療後、膿瘍の表面に存在する *S. aureus* が排除され一時回復するが、しばらくすると抗生物質の届かなかった部分から出現する *S. aureus* により、再発することが多い。*S. aureus* は直径 1 μ m 程度のグラム陽性の球菌であり、厚いペプチドグリカン層に覆われており、溶血に関わるヘモライシンやコアグラゼ、食中毒の原因となるエントロトキシンなど多様な毒素を保持・分泌する種として知られている。また近年、院内感染の原因となる MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) としても注目を集めている。このような多剤耐性菌による感染症は通常の抗生物質が無効であるため、ファージセラピーの可能性が評価されている。

2. 研究の目的

牛乳房炎は乳房に細菌が侵入し、乳量および乳質の低下が起こり、時には牛が死亡する病気である。搾乳時に搾乳機械や人の手から感染する伝染性乳房炎と、牛舎敷床から感染する環境性乳房炎に分けることができる。乳房炎は乳牛でもっとも被害が大きい病気で、酪農家一戸平均当たり年間約 300 万円にものぼり、日本における年間の被害総額は 1000 億円を超える。乳房炎は様々な細菌により起

こるが、主に *S. aureus* と大腸菌が原因とされる。*S. aureus* は主に伝染性乳房炎の原因菌であり、大腸菌は環境性乳房炎の原因菌とされる。本研究では牛乳房炎をファージで制御することを最終目標とした。研究は最初に乳房炎を引き起こす細菌叢の解析を培養法と遺伝子解析法の両方を用いて行う。従来、感染牛の診断は選択培地による病原菌の検出により行っていたが、発病には複数の菌種が関与し、かつ培養できない菌の存在が疑われる。そこで制御対象となる原因菌の特定を従来法である培養法と遺伝子解析に基づく手法により行った。菌叢解析の過程で乳房炎を引き起こす細菌を多く分離・純化し、細菌ライブラリーを作成した。次にライブラリーを用い、感染源や環境試料からファージのスクリーニングを行い、ファージライブラリーを作成した。単一の宿主に単一のファージを長期暴露するとファージに耐性を示す細菌が出現する。しかし、複数のファージ混合液(ファージカクテル)の使用により、ファージ耐性菌の出現を回避できることを *in vitro* の実験で確かめた。本研究では、ファージカクテルの最適化を実施した。

ファージセラピーを抗生物質による治療(キモセラピー)と比較すると、ファージは家畜や人間には病原性が全く無く、標的とする宿主病原菌のみを狙い撃ちすることができる。1910 年代に Twort や d' Herelle によってファージは発見され、当時から細菌感染症に適用することを想定し研究が盛んに行われていた。しかし、1929 年に A. Fleming により抗生物質(ペニシリン)が発見され、1940 年代に入ると、より扱いやすい抗生物質が登場し、徐々にファージセラピーの研究は衰退し、実際に治療が実現したのはグルジアなどの限られた国のみであった。しかしながら近年、前述した多剤耐性菌の出現や、新規抗生物質の発見数の減少に伴い再び注目されるようになった。ファージは宿主菌体内で爆発的に増殖することが可能なため、一度の投与で有効な効果が望める。また、宿主細菌にのみ感染するため、治療対象に大きな影響を与えず、副作用が小さい。さらに、ファージは安価で迅速に大量生成できる。12 時間で 3 L もの乳汁が新たに生産され、抗生物質の希釈が速やかに進む乳房環境、および最終製品が牛乳という安価な食品であることを考慮に入れると、前述したファージセラピーの特徴は牛乳房炎治療における有利点である。

3. 研究の方法

(1) *S. aureus* の単離

研究に用いた *S. aureus* は *S. aureus* 性乳房炎感染乳汁から既に単離された 15 株、本研究で新たに下水流入水から単離した 3 株、またファージと連続培養してファージと共存

していた3株、そして参照株としてヒトの傷由来の1株(JCM2151: ATCC6538p)の計22株を用いた。

下水流入水からの一次スクリーニングにはマンニト食塩寒天培地(ニッスイ)を用いた。この培地は7.5%(w/v)の食塩を含み、またコアグラゼ生産性を培地の色の変化で知ることができる。この培地上で耐塩性を示し、周辺培地が黄変したコロニーを植え継いだ。つづいて、二次スクリーニングとして溶血性を確認するために羊血液寒天培地(ニッスイ)に塗布し、溶血性を示したものを候補株とした。これらの候補株に対し16SリボソーマルRNA遺伝子を対象としたプライマーセット(27F-1492Rまたは341F-907R)を用いたPCRを行い、東京工業大学技術部バイオセンターに依頼し、Big Dye Terminator ver3.1 (Applied Biosystems)を用いて反応を行いApplied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)により、その塩基配列を解読した。得られた配列はBLAST: Basic Local Alignment Search Tool (NCBI: National Center for Biotechnology Information)により検索にかけ、*S. aureus*であることが確認された。

(2) 沈降試験

上記の各菌株の凝集能を定量するために沈降試験(Autoaggregation assay)を実施した。粒子の終末沈降速度: v_p は粒子を球形だと仮定するとストークスの式で表され、粒子の直径: D_p の二乗に比例する(ただし、 ρ_p : 粒子の密度、 ρ_l : 溶媒の密度、 g : 重力加速度、 η : 溶媒の粘度)。よって、大きな凝集体を含む菌懸濁液ほど素早く濁度が減少する。

LB培地で定常期まで前培養した*S. aureus*を低速で遠心分離(3000 G、25 ° C、5 min)した後、ペレットをPBS(Phosphate Buffered Saline)で二度洗い、PBSに再懸濁させOD660=1.0の*S. aureus*懸濁PBS液を調製した。この調製にはBACTOMONITOR BACT-550(日昭電器)を用いた。この*S. aureus*懸濁液を培養管に移し攪拌後静置し、その濁度の変化をTVS062CAバイオフォトレコーダー

(Advantec)を用いて15分間隔で48時間後まで経時的に測定した。この機械は試験管の底から12 mm地点に光源があり、試験管に入れた懸濁液の液量は底から約20 mmである。各株の凝集能(AA%)は下式により算出した。ただしAtは時間tにおける濁度(OD660)である。つまりA0=1である。

(3) 自己凝集能の評価方法

*S. aureus*の自己凝集能を以下の手順で評価した。

1) 定常期まで前培養した菌液2 mLを遠心分離(3000 G、25 ° C、5 min)により菌体ペレットを得た

2) 上清を捨て、PBSを1 mL加え、菌体を再懸濁させた。

3) 再び遠心分離(3000 G、25 ° C、5 min)を行った。

4) 上清を捨て、PBSを1 mL加え、菌体を再懸濁させた。

5) 再び遠心分離(3000 G、25 ° C、5 min)を行った。

6) 上清を捨てBACTOMONITORを用いてOD660=1.0になるように調節した。

7) TVS062CAバイオフォトレコーダー用の小型L型培養管(TV100030)内に蒸留水を4 mL程度入れ、各培養管に対する機械のゼロ点調製を行った後に、蒸留水を捨て、培養管を60 ° Cの乾燥庫に入れ、完全に乾燥させた。

8) OD660=1.0に調製した*S. aureus*懸濁液を2 mL各培養管に入れた。TVS062CAバイオフォトレコーダーに培養管をセットし、25 ° Cで静置し、15分ごとにそのOD660を48時間後まで測定した。

(4) 疎水性試験

*S. aureus*の細胞表層の疎水性と凝集能の相関を調べるために疎水性試験(MATH test: Microbial Adhesion to Hydrocarbons)を実施した。沈降試験と同様に調製した

OD660=0.5の*S. aureus*懸濁PBS液を4 mL、試験管(口径10 mm、長さ150 mm)にとり、n-hexadecaneあるいはp-xyleneいずれかの有機溶媒を1 mL重層した。その試験管を1分間ボルテックスにより攪拌後、15分間室温で静置し、水層の濁度(A15)を測定した。疎水性の高い株ほど有機溶媒層に抽出され、濁度の減少が大きい。

(5) 顕微鏡観察

原乳中での*S. aureus*は脂肪球等の成分が邪魔となり、光学顕微鏡下での形状の観察が困難となる。そこで、核酸染色剤DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)を用いて、菌体を染色し蛍光顕微鏡下で観察した。原乳、脱脂乳、乳清、LB培地に*S. aureus*を植菌し、5時間培養後DAPIで菌体の染色を行い、蛍光顕微鏡下でその形態を観察した。さらに、原乳に0.15 MのKClおよびNaClを加えて同様に菌体の形態を観察した。原乳は体細胞数7万/mL以下の健康乳汁を無菌的に搾乳し、北海道の酪農学園大学から冷凍で輸送され、-80 ° Cで保存されたものを氷上で緩やかに溶かしたものをを用いた。乳清はこの原乳から調製した。

(6) 牛乳房炎由来*S. aureus*のファージによる制御

ファージのホストレンジ: *S. aureus*一昼夜培養液100 μ lを3 mLのLB培養液に加え、LB寒天培地に重層した。その後、ファージ溶菌液を2 \cdot 1滴下し、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。形成されるプラークを観察し、滴下した各ファージの溶菌能を評価した。

S. aureus およびファージのキャラクターゼーション: 提供された乳房炎罹患牛乳汁 45 検体から約 50 の *S. aureus* をスクリーニングし、PCR 法により分類したところ、15 種に分類できた。分類した *S. aureus* を用いて都市下水流入水から 15 種のファージをスクリーニングした。スクリーニングした *S. aureus* とファージを用い、各ファージのホストレンジを解析した。ファージの溶菌活性により、透明なプラーク (C)、懸濁したプラーク (T)、より懸濁したプラーク (F)、プラーク形成能を持たないもの (-) に分類した。スクリーニングされた 15 種のファージの中で、φSA012 および φSA039 と命名したファージは他のファージよりも感染宿主域が広く、非常に透明なプラークを形成したことから以後の実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 沈降試験

MSa001、MSa002、JCM2151、MSa003Rφ39、MSa003Rφ12φ39 は LB 培地で一晚振盪培養するだけで、肉眼でその凝集の様子を確認できた。牛乳房炎由来の *S. aureus* は比較的高い凝集能を示した。また、約 20% の凝集能を示した MSa003 が変異したファージ耐性株のうち MSa003R・39 と MSa003R・12・39 はその凝集能を 60% 以上に増大させた。

(2) 疎水性試験

MATH は、SAT (Salt Aggregation Test) など他の疎水性を定量する方法と相関がない場合もあることが報告されているが、簡便に相対的な関係を知ることができる。また、用いる有機溶媒の種類や、細菌懸濁液の濃度、懸濁液と有機溶媒の割合で値が異なることが知られている。よって安易に数値を比較することはできないが、ヒトの傷由来の *S. aureus* の疎水性を MATH で同様に定量した研究を引用すると、50 株中 39 株が 25% 以下の低い疎水性を示した。今回、牛乳房炎由来の 15 株のうち、MSa019 を除く 14 株が非常に高い疎水性を示した。よって、乳房炎由来 *S. aureus* は他の環境に存在する株と比較して、疎水性が高いといえる。これは、乳房内という常に乳汁が生産され排出される環境、乳汁中に疎水的な脂肪分が多く含まれる環境に定着するにあたり、疎水性が必須の性質であるためと考えられる。また、MSa003 と MSa003 ファージ耐性株の間に、疎水性の違いはなかった。よって *S. aureus* 表層の疎水性を支配する部分や成分はファージの耐性とは関連がないことが示唆された。

(3) 表面電荷の解析

MSa001、MSa002、JCM2151、MSa003Rφ39、MSa003Rφ12φ39 の負電荷が相対的に大きいことが読み取れた。これらの株は凝集能の高い株として前述したが、その相関については次

項で考察する。注目すべきは MSa003Rφ39、MSa003Rφ12φ39 のファージ耐性株が野生株 MSa003 と比較してその表層負電荷を大幅に上げていたことである。ここから、MSa003Rφ39 と MSa003Rφ12φ39 のファージ耐性には表層電荷をつかさどる部分に関与していることが示唆された。一方、MSa003Rφ12 は MSa003 と変化がなかった。これは、MSa003Rφ12 の耐性化メカニズムが上記とは異なるためと考えられる。ここで各株の EOP の値を比較すると MSa003Rφ12φ39 はほぼ完全に耐性化していると思われるが、MSa003Rφ12 と MSa003Rφ39 は EOP 値の減少にとどまっている。よって高い凝集能や高い表層負電荷と似た表層特性をもっている MSa003R・39 と MSa003Rφ12φ39 ではあるが、ファージの耐性化機構は異なると考えられる。MSa003R・39 はファージのレセプターが完全に欠失あるいは変異したのではなく、例えばファージの吸着効率が減少したのではないかと考えられる。このように、ファージ耐性機構にはバリエーションがあることがうかがえる。*S. aureus* のファージへの耐性化は一様ではなくいくつかの耐性化因子が複合的に組み合わさることで起きていることが想定された。その一因に表層電荷を支配する部分に関与していることが示唆された。

(4) 顕微鏡観察

S. aureus は原乳、脱脂乳、乳清中で凝集体を形成し、LB 培地中では分散していた。しかしながら LB 培地中でも長時間培養を続けると、凝集体は形成された。栄養豊富な LB 培地の環境を考慮に入れると、LB 培地中の *S. aureus* に増殖速度のハンデはないと考えられる。よって、原乳、脱脂乳、乳清中では *S. aureus* の凝集体をつくるまでの時間が短かったといえる。過去の知見では、原乳中の脂肪球やカゼインタンパクが *S. aureus* の凝集を誘起するとの報告がある。今回、乳清中でも凝集体を形成した。このことから、乳清中の可溶性タンパク質も *S. aureus* の凝集体形成に関与していることが示唆された。

続いて、タンパク質の可溶化剤を原乳中に MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 以下で添加して凝集体の形態を顕微鏡下で観察した。可溶化剤には非イオン性界面活性剤の Triton やデオキシコール酸ナトリウム、キレート剤の EDTA を試したが顕微鏡下で判断した限り、凝集体の形態に目立った変化は観察されなかった。しかしながら、0.15 M の KCl または NaCl を添加し、原乳中で *S. aureus* を同様に培養したところ、凝集体の形成は比較的抑制された。塩による可溶化はタンパク質がイオンの結合している場合に有効であり、よって *S. aureus* 凝集体は静電的な相互作用により形成されていることが示唆された。これら塩による凝集抑制の程度を定量

するために 0.15 M KC1 添加原乳、0.15M NaCl 添加原乳および何も添加していない原乳で同様に *S. aureus* を培養し、蛍光顕微鏡下で観察を行い、各サンプル 50 視野ずつ撮影をした。一塊あたりの凝集体の面積を Image J により測定し、塩を添加することで凝集体形成が抑制されていることが確認できた。

(5) ファージの分子拡散係数

T4 ファージ、繊維状の f NEL ファージの見かけの拡散係数を算出した。T4 ファージの見かけ拡散係数はアガロースゲルがない紙のみの場合は $2.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ であり、0.2%、1%および 3%アガロースゲルにおける拡散係数はそれぞれ $2.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $1.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $5.6 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。ろ紙を用いた場合の拡散係数は、水中における T4 ファージの拡散係数と考えられる。また、同じ濃度のアガロースゲルにおける線状ファージ f NEL の見かけ拡散係数が T4 より小さいであった。さらに 0.2%アガロースゲルの場合に T4 ファージは 1.5 時間でフィルム内を拡散したのに対し、3%アガロースゲルでは 17.5 時間であった。しかしながら、3%アガロースゲルには線状ファージ f NEL が 48 時間を経たでも透過できず、見かけの拡散係数が算出できなかった。TEM 写真による、ファージ f NEL は線状で、凝集しやすいからだった。このことから、ファージのような巨大分子の拡散はアガロースゲル濃度とファージ自身のモルフォロジーに影響を受けることが示唆された。実験では均一なアガロースゲルを人工バイオフィームとして用いたが、実際のバイオフィームは細菌がマイクロコロニーを形成し、不均一な構造ため、ファージの拡散係数は人工バイオフィーム内と実際のバイオフィーム内では大きく異なると考えられる。しかしながら、本研究で作製した装置を用いて、細菌で形成されたバイオフィーム内のファージの拡散係数測定も可能となる。今後は、ファージの拡散係数の測定、バイオフィーム内の菌体と拡散するファージの相互作用、不均一なバイオフィーム内の拡散係数の測定などを検討していく予定である。

(6) 牛乳房炎由来 *S. aureus* のファージによる制御

SA003 のファージによる溶菌特性を解析した。ファージを添加した直後は溶菌に伴う *S. aureus* の断片化により、OD660 の値は急減した。しかし、培養を継続するとファージに対する耐性能を獲得した *S. aureus* の出現により再び OD660 の上昇が認められた。OD660 が再上昇は SA012 の方が SA039 を加えた時より長時間を要した。一方、両ファージの混合液を加えた系では実験時間内に耐性菌の出現に伴う OD660 の上昇は認められなかった。宿主の耐性化機構が異なる複数のファージ混液(ファージカクテル)を用いることで、耐

性菌出現を抑制できると考えられた。牛乳房炎を対象としたファージセラピーの試みはまだ緒に就いたばかりである。マウスを用いた乳房炎モデルに本研究でスクリーニングされたファージを投与すると、炎症反応が緩和され、起因 *S. aureus* の菌数がコントロール群に比較し有意に減少した。In vitro 実験による基礎的知見の蓄積に引き続き、実験動物→乳牛へと適応拡大し、有効性と安全性が検証されたならヒトへの適応を視野に研究を発展させたいものだと目論んでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. J. Hu, K. Miyanaga, Y. Tanji Diffusion of bacteriophages through an artificial biofilm model. *Biotechnol. Prog.*, DOI 10.1002/btpr.742 (2012) (査読有)
2. J. Hu, K. Miyanaga, Y. Tanji. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. *Biotechnol. Prog.*, 26(5), 1213-1221 (2010) (査読有)
3. H. Kunisaki, Y. Tanji. Intercrossing of Phage Genomes in a Phage Cocktail and Stable Coexistence with *Escherichia coli* O157:H7 in Anaerobic Continuous Culture *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1533-1541(2010) (査読有)
4. Y. Kuang, H. Jia, K. Miyanaga, Y. Tanji. Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 135-142 (2009) (査読有)
5. A. J. Synnott, Y. Kuang, M. Kurimoto, K. Yamamichi, H. Iwano, Y. Tanji. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host range and potent lytic capability. *Appl. Env. Microbiol.*, 75, 4283-4490 (2009) (査読有)
6. F. Mahichi, A. J. Synnott, K. Yamamichi, T. Osada, Y. Tanji. Recombination of T2 bacteriophage using IP008 phage long tail fiber genes expands host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiol. Letter*, 295, 211-217 (2009) (査読有)
7. Y. Kuang, K. Tani, A. J. Synnott, K. Ohshima, H. Higuchi, H. Nagahata, Y. Tanji. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. *Biochem. Eng. J.* 45, 76-81 (2009) (査読有)
8. A. Synnott, K. Ohshima, Y. Nakai, Y. Tanji. IgA response of BALB/c mice to orally administered *Salmonella*

Typhimurium flagellin-displaying T2 bacteriophages. *Biotechnol. Prog.*, **25**, 552-558 (2009) (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

1. 丹治保典、「バクテリオファージによる病原菌の制御と検出」第16回 日本乳房炎研究会学術集会、2011年10月14日 つくば国際会議場(エポカルつくば)
2. 田中愛里、長田啓太、宮永一彦、永幡肇、岩野英知、樋口豪紀、丹治保典、牛乳房炎起因 *S. aureus* のファージと抗生物質の感受性評価第43回化学工学秋季大会、2011年9月14-16日、名古屋工業大学
3. Hu Jun, Y. Tanji, Diffusion properties of bacteriophages through a biofilm model, 19th Biennial Evergreen International Phage Biology Meeting, The Evergreen State College, Olympia, WA, USA, Aug. 9-13, 2011
4. 丹治保典、谷夏織、栗本実希、宮永一彦、樋口豪紀、岩野英知、井上博紀、永幡肇、「牛乳房炎ファージセラピーに向けた *S. aureus* の凝集性評価」、第15回 日本乳房炎研究会学術集会、2010年10月22日 つくば国際会議場(エポカルつくば)
5. 丹治保典、「バクテリオファージによる細菌の検出とコントロール」、BioJapan 2010、2010年9月29日 パシフィコ横浜
6. Hu Jun、丹治保典、「Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、バクテリオファージ研究の可能性と課題、2010年9月9-10日、大阪大学蛋白質研究所
7. 浅川宏章、丹治保典、「T4系バクテリオファージの大腸菌0157認識に関わる解析」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、バクテリオファージ研究の可能性と課題、2010年9月9-10日、大阪大学蛋白質研究所
8. 森川真年、丹治保典、「大腸菌0157感染性ファージの宿主特異性に関する解析」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、バクテリオファージ研究の可能性と課題、2010年9月9-10日、大阪大学蛋白質研究所
9. 栗本実希、丹治保典、「牛乳房炎由来 *Staphylococcus aureus* とその特異的ファージの相互作用におけるイオン強度の影響」、大阪大学蛋白質研究所セミナー、バクテリオファージ研究の可能性と課題、2010年9月9-10日、大阪大学蛋白質研究所
10. 丹治保典、「牛乳房炎ファージセラピーに向けた取り組み」大阪大学蛋白質研究所セミナー、バクテリオファージ研究の可能性と課題、2010年9月9-10日、大阪大学蛋白質研究所
11. 丹治保典、宮永一彦、岩野英知、牛乳房炎のファージセラピー実現に向けた試み、第14回 日本乳房炎研究会学術集会、2009年、

2009年10月23日 つくば国際会議場(エポカルつくば)

12. 丹治保典、「ファージセラピーは抗生物質治療に取って代われるか」、BioJapan 2009、2009年10月9日 パシフィコ横浜
13. Hu Jun、宮永一彦、丹治保典、Two-chamber method to measure diffusion coefficient of bacteriophage in biofilm、第41回化学工学秋季大会、2009年9月16-18日、広島大学
14. Y. Tanji, A. Synnott, Y. Kuang, M. Kurimoto, K. Yamamichi & H. Iwano, Control of *Staphylococcus aureus* which causes bovine mastitis by bacteriophages with wide host range and potent lytic capability, 18th Biennial Evergreen International Phage Biology Meeting, The Evergreen State College, Olympia, WA, USA, Aug. 9-13, 2009

〔図書〕(計2件)

1. 丹治保典 バクテリオファージによる大腸菌0157:H7の同定、臨床検査、53(6):713-716(2009)
2. 丹治保典 ファージと病原菌の奇妙な関係、未来材料、10月号、(2010)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：スタフィロコッカス・アウレウス溶解性バクテリオファージ
発明者：丹治保典、宮永一彦、岩野英知、樋口豪紀、井上博紀、永幡肇、横田博、近藤昭宏、小倉俊樹権利者：
種類：特許願
番号：2009-183082
出願年月日：2009年12月25日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.biochemeng.bio.titech.ac.jp/index.html>
本課題研究に関する新聞掲載記事
全酪新報、新しい乳房炎の治療法を模索(ファージで原因菌除去)2011年11月10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹治 保典 (TANJI YASUNORI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：00282848

(2) 研究分担者

宮永一彦 (MIYANAGA KAZUHIKO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40323810