

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5月31日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380188

研究課題名（和文） 難治性脳神経疾患へボツリヌス毒素を治療応用するための基盤研究

研究課題名（英文） Preclinical study for the therapeutic application of botulinum neurotoxin to intractable brain disorders.

研究代表者 小崎 俊司（KOZAKI SYUNJI）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10109895

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ボツリヌス菌が産生するボツリヌス毒素（以下、毒素）と C3 酵素の難治性中枢神経系疾患への臨床応用の可能性を探ることを目的に、難治性てんかん、パーキンソン病および脳梗塞による運動機能障害に注目し、各モデル動物での有効性評価を実施した。結果、高純度の A2 型毒素（A2NTX）と細胞膜透過型 C3 酵素（Tat-C3）の大量調製に成功し、各種マウス難治性てんかんモデルおよびラットパーキンソン病様モデルを作製し、有意な A2NTX の有効性を確認した。また、予備検討において、脳梗塞による運動機能障害モデル（ラット中大脳動脈閉塞）を作製し、Tat-C3 の脳梗塞縮小効果を見出した。以上の成果は、難治性中枢神経系疾患において、A2NTX と Tat-C3 のへの臨床応用の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

To explore the possible clinical applications of botulinum neurotoxin to intractable brain disorders, we investigated whether or not the benefits of A2-botulinum neurotoxin (A2NTX) or cell-permeable C3 enzyme (Tat-C3) are exerted in several intractable brain disorders-model in rodents. Here we show the potent effectiveness of A2NTX against several types of seizure in mice or of 6-OHDA-elicited parkinsonian-like motor dysfunctions in rats. Additionally, preliminary study using brain ischemia indicates the neuroprotective effects in rats treated with Tat-C3. These results suggest that both A2NTX and Tat-C3 may indicate the beneficial possibility of medical treatments with intractable brain disorders such as epilepsy, Parkinson disease, and ischemic stroke.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御、新規治療薬開発

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌はボツリヌス神経毒（以下、

毒素）や C3 酵素と呼ばれるユニークな活性を示す蛋白毒素を産生する。毒素は特にボツ

リヌス症の最も重要な病原因子で、神経筋接合部のシナプス終末に特異的に作用してアセチルコリンの放出を阻害し、その結果、筋肉の麻痺を引き起こす。

この毒素の作用は極めて特異的で、極微量で活性を示すため、医療用医薬品としての応用も進められている。7種類(A~G型)ある血清型のうち特にA型毒素の臨床応用が進み、1977年に米国で始めて斜視治療に応用されて以来、国内でも眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸の治療に承認・使用されている。また2006年には脳卒中、脊髄損傷、脳性麻痺患者の麻痺を呈した手足の痙縮への適応が承認されているが、これは毒素が神経筋接合部に作用して不随意運動を起こしている筋肉の緊張を緩和するためである。

ところで、A型毒素には4つのサブタイプ(A1~A4)が存在し、現在市販されているA型毒素製剤は全てA1株由来毒素(A1NTX)である。この製剤は非常に微量で効果が得られる薬剤であるが、高用量投与時での副作用(筋脱力やボツリヌス中毒症状)が指摘されており、より安全性の高い毒素製剤の開発が求められている。

一方のC3酵素は、その病原因子としての役割は不明ではあるが、細胞内情報伝達分子、低分子量GTP結合蛋白質Rhoを特異的にADPリボシル化し、不可逆的にその活性を阻害することが明らかにされている。近年神経学領域では、神経細胞死・細胞変性の誘導にはRhoの活性が必須であることが次々に示され、また、Rho活性を阻害すると神経の再生が促進されることなどが報告されている。この結果はC3酵素が神経変性性疾患や損傷を受けた神経の再生などへ臨床応用できる可能性を示唆するが、*in vivo*でその効果が確認された例は現在までない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに毒素の構造を解析すると共に、そのレセプターの同定を進め、毒素が神経向性を示すメカニズムを分子レベルで明らかにしてきた。また、毒素がこれまで考えられてきた以上に広範囲な神経細胞間の情報ネットワーク経路を遮断することを明らかにしている。特に、A型毒素の臨床応用の報告からも、筋肉痙縮や痙性斜頸、さらには変形性膝関節症による慢性疼痛や三叉神経因性疼痛といった、中枢性疼痛に有効であるという新たな知見が得られている。

以上の背景から、毒素は末梢神経系だけでなく中枢神経性疾患に対しても、治療効果を発揮する可能性があることに着目し、難治性脳神経疾患への治療応用を目的に、本研究を遂行するに至った。具体的には、①A2NTX

およびTat-C3酵素の大量調製法の確立、②難治性てんかんの動物モデルである側頭葉てんかんのモデルマウスを用い、てんかん発作獲得後のマウス海馬内に毒素を注入し、てんかん発作を抑制するか否かを調べる。また、③パーキンソン病の動物モデルである6-OHDA黒質線条体神経破壊モデルを用い、毒素によるアセチルコリン放出遮断による運動機能障害改善効果を検証する。

一方、中枢神経性疾患では機能亢進の背景に神経細胞死・機能不全が共存しており、症状の発現に複雑な影響を与えている。本研究で毒素投与では十分な効果の現れない場合には、その疾病の発生メカニズムを別の視点から考えなおす必要も生じる。本研究では④細胞膜透過ペプチド配列(Tat)を付加したC3酵素を作製し、脳卒中モデルであるラット中大脳虚血モデルに投与することで、脳梗塞形成(神経細胞死)に対する効果検証も同時に行う。

さらに、1.研究の背景で言及したA1NTXでの副作用問題からも、⑤毒素の安全性について、毒素を脳内投与した動物の行動観察(Irwin法)や体重減少、横隔膜筋神経筋標本を用いた筋運動評価、および毒素の作用点解明のために体内分布を免疫染色法およびsiRNAを用いて解析する。

3. 研究の方法

全ての動物実験は、大阪府立大学および京都産業大学の動物倫理規委員会の承認下で実施した。また、塩酸メタンフェタミンは覚せい剤取締法第3条1項に遵守して使用した(覚せい剤研究者指定証:第500335号)。

①A1 or A2NTX および Tat-C3 酵素の作製 (担当:小崎・三宅):

ボツリヌスA型菌(A1サブタイプ:62A株、A2サブタイプ:Chiba-H株)の複合体毒素は既報の方法に従い精製する。保存菌株をクックドミート培地(12.5%クックドミート、0.3%グルコース、0.2%可溶化デンプン)で前培養し、上清をPYG培地(2%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%グルコース、0.025%チオグリコール酸ナトリウム、pH7.0)で、30°C3日間静置培養する。酸沈殿、プロタミン処理、陽イオンクロマトグラフィーおよびゲルろ過を行い、複合体毒素(LおよびM毒素)を得る。M毒素を10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に透析し、同緩衝液で平衡化したRESOURCE Q(GE healthcare)に吸着させ、AKTA prime(GE healthcare)を用いて、0~0.3M NaClの直線濃度勾配で無毒成分と神経毒素(NTX)を分離する。NTX溶出分画は集めて50mMリン酸緩衝液に透析後、濃縮し、使用時まで-80°Cで

保存した。

Tat-C3 酵素発現ベクターは、pRSET (Invitrogen)に His タグ (His×6) と Tat 配列 (GYGRKKRRQRRRG)、HA 配列 (YPYDVRDYA) の 3' 側に *Clostridium botulinum* より調製した C3 酵素の cDNA 遺伝子を挿入して調製する。大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、1 mM IPTG で 4 時間培養後、Ni-カラムにより精製を行う。

②マウスてんかんモデルの作製 (担当: 加藤):

②-1. 扁桃体キンドリングマウス作成方法

7 週令雄 ddY マウス (SLC) を購入後、輸送ストレスを除去し、イソフルラン麻酔下で、8 週令マウス・扁桃体に刺激電極 (陰極) のタングステン線を挿入し (Bregma A2.0, L3.0, V4.5 mm)、刺激電極 (陽極) 及び脳波測定用電極を硬膜下に挿入する (Bregma A2.0, L1.5 mm)。さらに、海馬内へ毒素を投与するため、マイクロインジェクションカニューレ

(ID=0.2 mm, エイコム社製) を左側海馬内へ挿入する (Bregma A-2.0, L1.5, V2.5 mm)。手術ストレス 1 週間除去後、覚醒状態のマウスへ、軽微な刺激を 1 日 1 度導入 [450 μ A, 60Hz, 200 μ s duration, for 2 sec; electrical stimulator (SEN-3301, 日本光電社製) & isolator (SS-202J)] し、約 2~3 週間かけててんかん発作を誘導し、扁桃体キンドリングマウス (側頭葉てんかんモデルマウス) を作成する。てんかん発症過程の評価は、脳波の計測 [PreAmp and Head Amp (BEMCT-21 and BH-3, Low cut = 0.5, High cut = 30, バイオテックス社製) & data acquisition program SleepSign ver. 2.0, キッセイコムテック社製] と発作発現状態から 5 段階評価した。コントロールは、手術後未刺激マウスを用いる。

てんかん発作獲得後、A2NTX を海馬内注入し、効果を判定する。

②-2. Pentylenetrazol (PTZ) 腹腔内持続注入てんかん重積モデルマウス作成

3 週令雄 ddY マウス (SLC) を購入後、輸送ストレスを除去し、PTZ (43 mg / kg) を腹腔内に 3 回/週投与を 4 週間実施する。マウスが 7 週令に達したとき、イソフルラン麻酔下で、海馬内へカニューレを挿入し (Bregma A-2.0mm; L 1.5mm; D 2.0 mm)、脳波記録用電極を硬膜下に挿入する (Bregma A2.0, 左右 1.5 mm)。てんかん重積発作を確認後、A2NTX を海馬内注入し、効果を判定する。

②-3. カイニン酸海馬内注入てんかん重積モデルマウス作成

7 週令雄 ddY マウス (SLC) を購入後、輸送ストレスを除去し、イソフルラン麻酔下で、8 週令時に海馬内へのカニューレを挿入するとともに (Bregma-2.0mm; Left lateral 1.5mm; Depth 2.0 mm)、脳波記録用電極を硬膜下に挿入する (Bregma A2.0, 左右 1.5 mm)。手術

ストレス 1 週間除去後、2mM カイニン酸溶液を 500nl 海馬内へ注入する。20-23 日後、てんかん重積症を示すことを確認し、A2NTX を海馬内注入し、効果を判定する。

②-1~3 を通じて、海馬内注入直前に、A2NTX (3.48 unit / μ l in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 5 mg/ml human albumin) を、0.35 unit / μ l (in 2.5 mM phosphate, pH 7.5, 0.135M NaCl, 0.05 mg/ml human albumin) にまで希釈し、2.5 μ l (1.05 unit) あるいは、5 μ l (1.75 unit) の容量をマウス海馬内に注入する。

③ラットパーキンソン病モデルの作製 (担当: 竹内・中嶋): 9 週令 Wistar ラット (日本 SLC) をネンブタール (アボット社, 50 mg/kg, i. p.) 麻酔下にて脳定位固定装置に保定し、ドーパミン神経細胞毒である 6-OHDA (SIGMA 社, 20 μ g / 4 μ l of saline containing 0.02% ascorbic acid) を 10 μ l ハミルトンマイクロシリンジを用いて、左側線条体 (1.0 mm anterior to the bregma, 3.0 mm lateral to the midline, 5.2 mm ventral to the dural surface) に、流速 1 μ l/min で注入する。注入終了後さらに 4 分間シリンジを静置し 6-OHDA の逆流を防止する。オペレーションは 30 分間以内に終了し、終了後は各ホームケージに戻し覚醒を確認後、動物室で飼育を行う。6-OHDA 投与 1 週間後に、塩酸メタンフェタミン (大日本住友製薬, 3 mg/kg, i. p.) を処置し、直径 50 cm 高さ 60 cm の円筒プラスチックバケット内に入れ、5 分間の馴化後、30 分間反時計回りへの巡回行動を上部に配置した定点ビデオカメラにて記録する。巡回数が 51 回以上 300 回未満の個体を黒質線条体破壊成功ラットとし、さらに 1 週間飼育することで塩酸メタンフェタミンをウォッシュアウトする。1 週間後、0.1 or 0.5 ng / 2 μ l (リン酸バッファー (pH7.4) + 0.1% ウシ血清アルブミン) の投与量にて、溶媒、A1NTX および A2NTX を線条体内投与した。投与 24 時間後に、再び塩酸メタンフェタミン (3 mg/kg, i. p.) を投与し、同様に巡回数を記録する。なお巡回数は、記録動画を Debut Video Capture software (NCH software) で 3 倍速再生してカウントする。巡回行動を測定 1 週間後、ネンブタール (75 mg/kg, i. p.) で深麻酔し、経心的に脳をホルマリン還流固定し、免疫組織化学染色に供する。

④ラット脳卒中モデルの作製 (担当: 竹内・中嶋): 9 週令 Wistar ラット (日本 SLC) を 1-2% イソフルラン麻酔下にて仰臥位に保定し、頸部より左側総頸動脈を剥離後、外頸動脈から内頸動脈に方向に 3-0 ナイロン栓子 (先端部シリコンコーティングで長さ 18.5 mm) を挿入して中大脳動脈起始部を遮断する。麻酔解除後、10 分間以内に片麻痺を呈した個体を虚血成功ラットとする。1 時間後、再び

イソフルラン麻酔下にてナイロン栓子を抜き、再還流処置を施す。Tat-C3は尾静注で処置する。再還流24時間後、ネンブタール(75 mg/kg, i. p.)で深麻酔し、放血することで安楽死を施す。速やかに全脳を取りだし、厚さ2 mmの冠状スライスを作製し、TTC染色により梗塞体積を算出する。

⑤安全性評価系の確立(担当:竹内・中嶋):各評価系において、A1 or A2NTXおよびTat-C3酵素投与後の行動をIrwin法によって評価する。また、パーキンソン病モデルラットは、モデル作製から安楽死までの体重変化を記録する。また、無処置ラットおよびマウスにて、横隔膜筋神経筋標本を用いた電気刺激性筋運動評価方法(等尺性)を確立する。加えて、毒素の作用点を明らかにする目的で、毒素活性の指標としてSNAP-25断片化特異的ポリクローナル抗体を用いた脳切片の免疫染色法およびRNAi法を用いた脳内遺伝子ノックダウン法を確立する。

4. 研究成果

①A1 or A2NTXとTat-C3酵素の大量調製:高品質・高純度のA型ボツリヌス毒素の大量調製に成功し、また異なるサブタイプ(A1NTXとA2NTX)の分離調製にも成功した。また、Tat配列付加C3酵素の大量調製にも成功した。

②マウスてんかんモデル:

側頭葉てんかんモデルマウスを作成し、難治てんかんへのボツリヌス毒素の効果について、3種のモデルマウスを用いて検討した。具体的には、①扁桃体キンドリングマウス、②Pentylentetrazol腹腔内持続注入てんかん重積モデルマウス、③カイニン酸海馬内注入てんかん重積モデルマウスを選択し、各てんかんモデルへのボツリヌス毒素の治療効果を検証した。①について、約50%のてんかん発症マウスに、毒素投与後、転倒発作とてんかん後発射(脳波)が完全に消失することが確認された。さらに、てんかん発作獲得ステージ、てんかん発作特有の棘波数、てんかん発作特有の後発射持続時間、重積発作用フリーズ持続時間を計測したところ、毒素投与により、てんかん発作獲得ステージの減弱及び、後発射持続時間の著しい短縮が見られた(ANOVA検定: $*p < 0.05$)。また、棘波数の減少傾向が観察された(ANOVA検定: $p = 0.057$)。②について、毒素海馬内投与により、ステージ進行の減弱とスパイク数の減少が観察された。③については、毒素を海馬に注入することで、カイニン酸連投による発作悪化を減弱させる効果のあることを確認した。以上のことから、種類の異なるてんかん発作においても、毒素が有効であることが示唆された。

続いて、A2NTXと市販ボツリヌス製剤Botox(A1NTXと無毒成分混合:1.75Uあるいは

1.05U)とのてんかん発作抑制効果を比較した。具体的には、A2NTX投与群($n=6$)、Botox投与群($n=5$)、Vehicle投与群($n=6$)間におけるてんかん刺激後10分間のフリーズ時間、ステージレベル、てんかん後発射におけるスパイク数、てんかん後発射持続時間について、投与後8日間比較した。その結果、A2NTX投与群は、Vehicle群と比べて、フリーズ時間、ステージレベル、てんかん後発射持続時間において、発作発現を有意に抑制した。一方でBotox群は、すべての項目で効果を示さなかった。これは、無毒成分の混入が、てんかん発作抑制に影響を示したと考えられた。

一連の研究成果についてまとめたものについて、現在論文投稿中である。

Kato K., Kohda T., Torii, Y. Goto, Y., Harakawa, T., Ginnaga, A., Akaike Norio⁴, Kaji, R., and **Kozaki, S.** Botulinum neurotoxin A reduces incidence of seizures in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Lett.* (submitted).

③ラットパーキンソン病モデル:

上記②のてんかんモデルでの結果より、A2NTXがBotoxより治療効果を発揮することが示されたことから、本項目では、高純度A1NTXとA2NTXの有効性比較実験を行った。ラット6-OHDA誘発片側黒質線条体破壊モデルを用いて、抗パーキンソン病治療薬としての有効性試験を実施した。有効性(治療効果)の指標としてメタンフェタミン誘発旋回行動(運動機能障害)を測定した(各群 $N=5-6$)。その結果、A1NTX投与群およびA2NTX投与群では、0.5 ng/site線条体単回投与により60.3% ($p < 0.05$) および56.9% ($p < 0.01$)の有意な旋回行動抑制効果を示した。また、0.1 ng/site線条体単回投与では、A1NTX投与群では効果は無く、A2NTX投与群で33.5% ($p < 0.05$)の有意な旋回行動抑制効果を示した。また、全ての投与群で体重変化や異常行動などの副作用は全く認められなかった。以上の結果は、小崎、三宅により調製されたA2NTXが、てんかん発作抑制に効果に加え、パーキンソン病の運動機能回復効果も期待されることを示していた。現在、その作用メカニズムの違いを明らかにするため、免疫染色法によりコリン作動性神経細胞とA1NTX or A2NTXの取り込みおよび活性化(SNAP-25の断片化)を調査中である。

④ラット脳卒中モデル:

1時間脳虚血24時間再還流処置で形成された梗塞体積は、Tat-C3(10 U/50 μ L)の虚血前投与により約25%抑制された($N=3$, $p=0.075$)。今後は個体数を増やし、また用量依存性についても検討する予定である。さらに、虚血後投与での効果も検討を行い、Rhoシグナル伝達系による神経再生効果の個体レベルでの検証を行う。

⑤安全性評価：

マウスおよびラット横隔膜神経筋標本を用いた評価系を確立した。今後の有効性試験が終了した個体について、本法による検討予定である。また、Accell siRNA(ダーマコン社)の脳室内投与により、アダルトラットの神経細胞特異的にターゲット遺伝子をノックダウンする方法を確立した。今後、毒素や Tat-C3 の作用点解析で本法を実施予定である。

5. 主な発表論文等 (計 24 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Nakajima, H., Kubo, T., Semi, Y., Itakura, M., Kuwamura, M., Izawa, T., Azuma, Y.T., Takeuchi, T. (2012)

A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J. Biotech.* 157:326-333 (査読有)

2. Zhao, H., Nakamura, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S. (2012)

Characterization of the monoclonal antibody response to botulinum neurotoxin type A in complexed and uncomplexed forms. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 138-145 (査読有)

3. Torii Y., Kiyota N., Sugimoto N., Mori Y., Goto Y., Harakawa T., Nakahara Y., Kaji R., Kozaki S., Ginnaga A. (2011)

Comparison of effects of botulinum toxin subtype A1 and A2 using twitch tension assay and rat grip strength test. *Toxicon* 57: 93-99 (査読有)

4. Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M., Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y. (2010)

Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins by electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* 285: 401-408 (査読有)

5. Kamitani S, Kitadokoro K, Miyazawa M, Toshima H, Fukui A, Abe H, Miyake M., Horiguchi Y. (2010)

Characterization of the membrane-targeting domain in *Pasteurella multocida* toxin. *J. Biol. Chem.* 285: 25467-75. (査読有)

6. Fukui-Miyazaki A, Kamitani S, Miyake M., Horiguchi Y. (2010)

Association of *Bordetella* dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. *BMC*

Microbiol. 10: 247 (open access) (査読有)
7. Nochi T., Yuki Y., Takahashi H., Sawada S., Mejima., Kohda T., Harada N, Kong IG., Sato A., Kataoka N., Tokuhara D., Kurokawa S., Tsukada H., Kozaki S., Akiyoshi K., Kiyono H. (2010)

Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines.

Nature Mater. 9: 572-578 (査読有)

8. Umeda K., Seto Y., Kohda T., Mukamoto M., Kozaki S. (2010)

A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A gene cluster typing. *Microbiol Immunol.* 54: 308-312 (査読有)

9. Nakamura, K., Kohda, T., Umeda, K., Tamamoto, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. (2010)

Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet Microbiol.* 140: 147-154 (査読有)

10. Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S. (2009)

Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2720-2728 (査読有)

11. Torii, Y., Takahashi, M., Ishida, S., Goto, Y., Nakahira, S., Harakawa, T., Kaji, R., Kozaki, S., Ginnaga, A. (2009)

Quantification of potency of neutralizing antibodies to botulinum toxin using compound muscle action potential (CMAP). *Toxicon* 55: 662-665 (査読有)

12. Kato K., Suzuki M, Hiroki Kanno H, Sekino S, Kusakabe K, Okada T, Mori T, Yoshida K, and Hirabayashi Y. (2009)

Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy *J. Neurochem.* 110:509-519. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 久保岳也、中嶋秀満、瀬見優子、桑村 充、井澤武史、東 泰孝、竹内正吉 (2011)

Accell siRNAの単回脳室内投与による脳内の遺伝子サイレンシング効果. (2011)
第54回日本神経化学学会大会、9月(加賀)

2. Hoshi, H., Kondo, K., Oda, M., Nagahama, M., Yamamoto, S., Kamata, Y., Miyake, M.

An in vitro model system for studying

Clostridium perfringens type A infection. (2011) International Union Microbiological Sciences 2011 Congress, 9月 (札幌)

3. Nakamura K., Kohda, T., Mukamoto, M., **Kozaki, S.** Further characterization of *Clostridium botulinum* type D/C mosaic neurotoxin. (2011) International Union Microbiological Sciences 2011 Congress, 9月 (札幌)

4. Kohda, T., Ihara, H., Mukamoto, M., **Kozaki, S.**

Translocation of light chain of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin into PC12 cells. (2011) International Union Microbiological Sciences 2011 Congress, 9月 (札幌)

5. **Kato K.**, Koda T, **Kozaki, S.** Application of A2NTX in the treatment of refractory epilepsy (抗難治性てんかん剤としてのA2NTXの開発) (2010) 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 5月 (岩手)

6. Hoshi, H., and **Miyake, M.**

An in vitro model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. (2011) International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN, 7月 (タイ)

7. Kohda, T., Ihara, H., Mukamoto, M., **Kozaki, S.**

Functional analysis of synaptotagmin II as a receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin (2010) The 47th IBRC meeting 11月 (米国)

8. **Kozaki, S.**

Characterization of *Clostridium botulinum* associated with human and animal botulinum in Japan. (2009) 韓国微生物学会, 10月 (韓国・招待講演)

〔図書〕 (計4件)

1. **小崎俊司**, 幸田知子, 中村佳司, 総説「わが国で発生している牛ボツリヌス症由来菌の特徴」全国農業共済協会版 (2012) 家畜診療 59巻3号

2. **Kato K.** (2011) Introduction of a novel molecular mechanism on epilepsy progression: roles of growth hormone signaling in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Underlying mechanisms of epilepsy (Ed Fatima Shad Kaneez) Intech - Epilepsy / Book 6 p63-76.

3. **加藤啓子**, 幸田知子, **小崎俊司** ボツリヌス毒素によるてんかんの治療 Application of botulinum neurotoxin in the treatment of epilepsy —BRAIN and NERVE—神経研究の進歩— 医学書院 (2009) 61:939-948

4. **小崎俊司**, 居原 秀, クロストリジウム神

経毒素の受容体認識, (2009) 実験医学 羊土社 Vol.27 No. 10 (増刊) 総ページ数 8

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ:

1. <http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/epid/epid.html> (小崎 俊司)

2. <http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pub/pub.html> (三宅 眞美)

3. http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kato/Home_J.html/Welcome.html (加藤 啓子)

4. <http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pham/pham.html> (竹内 正吉、中嶋 秀満)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 俊司 SYUNJI KOZAKI (大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・教授) 研究者番号: 10109895

(2) 研究分担者

①竹内 正吉 TADAYOSHI TAKEUCHI (大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・教授) 研究者番号: 00171611

②三宅 眞美 MASAMI MIYAKE (大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・教授) 研究者番号: 10251175

③加藤 啓子 KEIKO KATOH (京都産業大学・総合生命科学部・教授) 研究者番号: 90252684

④中嶋 秀満 HIDEMITSU NAKAJIMA (大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・准教授) 研究者番号: 30405360

(3) 連携研究者

なし