

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580361  
 研究課題名（和文） 悪性水腫及び気腫疽の発症に関わるガス壊疽菌群産生壊死毒の病原性発現機構の解明  
 研究課題名（英文） Investigation of pathogenic manifestative mechanisms of necrotizing toxins from gas gangrene bacilli in malignant edema and blackleg.  
 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・准教授  
 80231629

研究成果の概要：悪性水腫を引き起こす *Clostridium septicum* の主要な病原因子である  $\alpha$  毒素の心停止機構を自立拍動するラット胎児の初代心筋細胞を用いて分子レベルで解析した。 $\alpha$  毒素添加後に誘導される心筋細胞の急激な収縮停止は  $\alpha$  毒素が細胞に結合し、oligomer となり pore（孔）を形成することにより誘導されることが明らかとなった。気腫疽の原因菌である *C. chauvoei* の主要な病原因子と考えられている hemolysin は  $\alpha$  毒素に比べて細胞致死活性が弱い。温度感受性は低く  $\alpha$  毒素と異なる機構によって細胞を傷害し病原性を発揮すると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：獣医感染症学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ガス壊疽、気腫疽、クロストリジウム、細胞壊死毒素、心臓、心不全

## 1. 研究開始当初の背景

ガス壊疽は *Clostridium* 属のガス壊疽菌群によって引き起こされる致死性の高い人獣共通感染症である。ガス壊疽菌は皮膚や腸管の創傷部位から感染し、血行が遮断され、嫌気的条件下の成立した創傷部深部で増殖して、筋肉組織や皮下組織へと病巣が拡大する。多種の毒素・酵素を産生し、組織壊死やガス形成、さらには毒血症を引き起こす。ヒトのガス壊疽の原因菌として発生の最も多い *C. perfringens* の主要な病原因子はホスホリパーゼ C 活性を有する  $\alpha$  毒素である。病原性

との関連については、 $\alpha$  毒素は細胞破壊作用や血管平滑筋の収縮および血小板・白血球の凝集塊形成による血流障害を引き起こし、その結果、酸素・栄養の輸送遮断により組織壊死を引き起こす。さらに、好中球の組織定着を活性化させ、好中球が感染巣の中心部に接近できず、周辺部に留まることにより、本菌が壊死組織で激しく増殖し病巣が拡大することで死に至る。一方、家畜の悪性水腫の原因菌でもある *C. septicum* が産生する主要な病原因子である  $\alpha$  毒素は酵素活性を持たず、細胞膜上に pore（孔）を形成して膜を破壊する細

胞壊死毒素（孔形成毒素）である。感染組織深部において、毒素活性のない $\alpha$ 毒素前駆体として菌体外に分泌され、GPI アンカー蛋白を受容体として細胞表面に結合した後、蛋白分解酵素で限定分解を受け、活性型 $\alpha$ 毒素となる。活性型 $\alpha$ 毒素は脂質ラフトに集積し、6～7量体のオリゴマーとなり細胞膜上にpore（イオン透過性チャネル）を形成することで細胞死を引き起こす。報告者らはこれまで上記のように *C. septicum* 毒素の細胞膜上での分子動態を調べることで、細胞壊死を起こすメカニズムを明らかにしてきた。その過程で、 $\alpha$ 毒素は細胞のラフト分画に存在する GPI アンカー蛋白以外に非ラフト分画に存在する別の分子とも強く結合することを発見した。この分子のアミノ酸配列を解析した結果、心筋や骨格筋に多く存在する $\alpha$ アクチンと一致した。 $\alpha$ アクチンは重合することで細胞骨格形成や筋の収縮運動に関与する重要な細胞内蛋白である。ヒトにおいては *C. septicum* によるガス壊疽の直接的な死因は心原性ショックであると考えられている。家畜においては循環器系への $\alpha$ 毒素の関与は明らかになっていない。しかしながら、家畜に対しても突然死を引き起こすことがよく知られていることから、ヒトと同様に心原性ショックを誘導することは十分考えられる。報告者らは $\alpha$ 毒素が心筋細胞初代培養に対して細胞壊死を起こす前に急速な自立性拍動を停止させること、灌流ラット心臓を用いた実験で、接種毒素の濃度依存的に心拍速度が低下および消失することを明らかにした。このことは、 $\alpha$ 毒素の $\alpha$ アクチンへの結合が *C. septicum* 感染症の主要な病態である筋肉壊死と循環器障害に重大な関連があることを示唆している。本研究では *C. septicum* 毒素の心臓に対する病原性に焦点を絞り、ガス壊疽における心原性ショックの病態生理機構を明らかにする。

家畜におけるガス壊疽の一つである気腫疽は我が国において散発的ではあるが発生が絶えることが無く、届出伝染病に指定されている反芻獣特有の感染症である。その原因菌である *C. chauvoei* も細胞壊死毒素（ヘモリジン）を産生することから、このヘモリジンが気腫疽の主要な病原因子であると考えられている。報告者らは菌培養上清より本毒素の精製に成功し、精製毒素の各種動物赤血球に対する溶血活性を比較した。その結果、反芻獣の赤血球で毒素活性が高く、齧歯類、イヌ、ウマの赤血球に対してはほとんど活性を示さなかった。ヘモリジンの感受性動物が気腫疽の自然宿主と一致していることは、本毒素が気腫疽の主要な病原因子である可能性を示唆している。本研究ではヘモリジンの細胞傷害機構を明らかにすることにより、気腫疽の明確な種特異性を含めた発病機構の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

### (1) *C. septicum* 毒素による心原性ショックの病態生理機構の解明

自立収縮するマウス心筋細胞初代培養を用いて、 $\alpha$ 毒素が心筋 $\alpha$ アクチンに結合した際のアクチン-ミオシン架橋や細胞骨格形成への直接的な作用および心筋収縮に関わる $Ca^{2+}$ 放出チャネルとシグナル伝達系への関与について分子レベルで明らかにする。細胞レベルでの結果をふまえて、 $\alpha$ 毒素投与後の灌流心臓からの組織を用いて病理学的および生化学的解析を行い、収縮変化についての電気生理学的解析結果と併せて組織あるいは臓器レベルでの心停止機構を明らかにする。 $\alpha$ 毒素と $\alpha$ アクチンのリコンビナントミュータント蛋白を作成し、両分子の結合領域を特定する。

### (2) *C. chauvoei* ヘモリジンによる細胞傷害機構の分子レベルでの解明

様々な動物種および臓器由来の株化細胞を用いてヘモリジンの細胞致死活性を解析することで、毒性発現機構の分子レベルでの解析に用いることができる細胞を選別する。この感受性細胞を用いて、ヘモリジンが孔形成毒素であるか否かについて明らかにする。毒素遺伝子は未だ未同定であることから、ヘモリジン遺伝子のクローニングを行い、他の細胞壊死毒素遺伝子とアミノ酸配列等を比較することにより、ヘモリジン分子の特徴および細胞傷害作用に関わる部位の特定を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット胎児心筋初代培養細胞の調製

Goshima らの方法を一部修正した方法により心筋細胞の単離を行った。胎齢16～17日のラット (Wistar) から心臓を取り出し、心房を除去後、心室を細切した。心室細切片を15 ml 遠心管に移し、0.05% collagenase (Type IV) を含有する Hanks' Balanced Salt Solution (Ca/Mg free)-HEPES (10 mM) 7～8 ml を加え、37°Cで30分間振盪し消化した。消化の過程で溶液を新しい溶液に2度置き換えた。メッシュサイズ70  $\mu$ m のセルストレイナーを通して消化後の溶液を全て回収し、180 xg、10分間、37°Cで遠心し細胞を回収した。10% FCS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に細胞を懸濁し、直径35 mm Tissue Culture Dishまたは直径15.5 mm 4穴プレートに播いた。5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°Cで1日培養し、翌日培地交換を行いさらに2～3日間培養し実験に使用した。

### (2) 毒素による心筋細胞拍動リズムへの影響

#### ①動画の撮影

倒立顕微鏡のステージを37°Cに加温した状態で心筋細胞を静置し、CCD cameraで自立拍動する心筋細胞を撮影した。MTU2400FX

(Canopus Co., Ltd., Japan) を用いて MPEG 形式 (30 フレーム/秒) で動画をデジタル化して Windows computer に取り込み、テレビ録画/コントロールソフト FEATHER for USB で録画・保存した。

#### ②毒素の添加

10% FCS 含有 DMEM 中で自立拍動する培養心筋細胞の培地を全て回収し、 $\alpha$  毒素を 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  あるいは Aerolysin を 50  $\text{ng}/\text{ml}$  の濃度で含有する 37°C に保温した DMEM (FCS free) に置き換えた。以下の記述における  $\alpha$  毒素の添加濃度も全て 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で行った。

#### ③拍動リズムの解析

拍動リズムの評価は Yamauchi らの方法によるソフトウェアでの解析法に一部修正を加えた拍動解析ソフト VisoRhythm を用いた。動画中で心筋細胞が自立拍動している区画 (150-400 pixels) を任意で選ぶと、その区画におけるフレーム間の相互相関率が測定される。これは、選択した区画内の輝度の経時変化を表し、心筋細胞の拍動リズムに相当する。このソフトウェアにより Excel ファイルに出力されるデータからコレログラムを作成した。

#### (3) Toxin overlay assay

リコンビナント  $\alpha$  アクチンを SDS-PAGE 後、PVDF 膜に電気転写し、5% skim milk で 4°C 一晩ブロッキングした。PVDF 膜を  $\alpha$  毒素 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは Aerolysin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と室温で 1 時間反応させた後、0.1% Tween 20 含有 PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。アフィニティー精製ウサギ抗  $\alpha$  毒素 IgG (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいはアフィニティー精製ウサギ抗 Aerolysin IgG (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を一次抗体として 1 時間反応させ、同様に洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:3000) を二次抗体として 30 分間反応させ、同様に洗浄した。0.5  $\text{mg}/\text{ml}$  3,3'-diaminobenzidine (DAB) 含有 0.55% 過酸化水素水で発色させ、転写膜を蒸留水で洗浄し反応を停止させた。

#### (4) ショ糖密度勾配遠心法による各細胞画分からの $\alpha$ 毒素の検出

直径 35 mm Tissue Culture Dish 4 枚に培養した心筋細胞初代培養に  $\alpha$  毒素を添加し、心筋細胞が拍動を停止するまであるいは 1 時間反応させた。心筋細胞の拍動停止後、直ちにシャーレを氷上に移すことで細胞膜の流動性を止め、直ちに細胞を Disposable Cell Scraper を用いて回収し、2,000  $\times\text{g}$ 、5 分間、4°C で遠心した。上清を除去後、再度氷冷した PBS で懸濁し、2,000  $\times\text{g}$ 、5 分間、4°C で遠心した。上清を除去後、1% Triton X-114 および 1% Protease Inhibitor cocktail を含有する MBS (25 mM 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) 0.5 ml で懸濁し、細胞を可溶化した。細胞懸濁液に等量の 80% sucrose 含有 MBS

を加え十分に混和し、40% sucrose 含有試料としたものを遠心管に移した。30% sucrose 含有 MBS を 3 ml 重層し、さらに 5% sucrose 含有 MBS を 0.5 ml 重層した。25,000  $\times\text{g}$ 、18 時間、4°C で SW60Ti を用いて遠心した後、下層より 0.5 ml ずつ回収した。すべての分画に 20% トリクロロ酢酸を 0.5 ml 添加して混和後、氷上で 1 時間静置した。18,000  $\times\text{g}$ 、15 分間、4°C で遠心後、上清を除去し、氷冷したエタノールを 0.5 ml 添加し沈殿を十分に懸濁した。18,000  $\times\text{g}$ 、15 分間、4°C で遠心後、上清を除去し、沈殿を適量の SDS sample buffer に可溶化した。酸性を示すものには適量の 1 M Tris を加え pH を調整した。

各分画を SDS-PAGE で泳動後、一次抗体としてアフィニティー精製ウサギ抗  $\alpha$  毒素 IgG あるいはアフィニティー精製ウサギ抗カベオリン IgG を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG を用い免疫ブロッティングを行った。

#### (5) 心筋細胞のコレステロール除去

直径 35 mm Tissue Culture Dish に培養した心筋細胞初代培養を 5 mM の Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) を含む DMEM で 37°C、30 分間処理し、細胞膜上のコレステロールを除去した。コレステロールの除去はコレステロール量測定キット (コレステロール-E-テスト) を用いて確認した。コレステロール除去後の心筋細胞が正常に拍動していることを顕微鏡での観察により確認した。

コレステロール除去細胞およびコレステロール非除去細胞に  $\alpha$  毒素を添加し、コレステロール非除去細胞が拍動を停止するまで反応させた。細胞を回収後ショ糖密度勾配遠心により各細胞成分を分画し、免疫ブロッティングにより  $\alpha$  毒素を検出した。

#### (6) 毒素のパルミチン酸処理による影響

500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の  $\alpha$  毒素と DMSO に溶解した 50 mM のパルミチン酸を等量混合して 30°C で 10 分間インキュベートし、パルミチン酸処理毒素とした。DMSO と  $\alpha$  毒素を混合したものを DMSO 処理毒素とし、 $\alpha$  毒素を含まない DMSO のみを陰性対照、 $\alpha$  毒素のみを陽性対照とした。心筋細胞に各毒素サンプルを添加し、顕微鏡下での観察により毒素添加後から拍動停止までの時間を測定した。

#### (7) 細胞致死活性の測定

*C. Chauvoei* hemolysin (以下 c-hemolysin) の細胞致死活性を MDCK, L929, MDBK, Vero を用いて測定した。c-hemolysin を 1,000  $\text{ng}/\text{ml}$  に調製し、10% FCS 含有 DMEM を用いて 10 倍階段希釈した。各希釈濃度の c-hemolysin 溶液を 96 ウェルプレートで培養した細胞 4 ウェルずつに添加し、37°C で 1 時間反応させた。細胞致死活性は MTT 法により測定した。各濃度 4 ウェルの吸光度の平均をとり、毒素を加えていない時を細胞致死率

0%、細胞を加えていないウェルの吸光度を致死率 100%として、各濃度における細胞致死率を算出した。

#### (8) 赤血球への結合試験

c-hemolysin の赤血球に対する結合を調べるために、毒素結合試験を行った。0.2%ヒツジ赤血球 100  $\mu$  l に最終濃度が 400  $\mu$  g/ml になるように毒素を加え、4°C もしくは 37°C で 30 分間静置した。等量の 2% Triton X-100 を加え、氷上で 1 時間静置した後、遠心し可溶性画分と不溶性画分に分けた。各分画を SDS-PAGE で泳動し、PVDF 膜に電気転写した膜をウサギ抗 c-hemolysin IgG を一次抗体として 4°C で一晩反応させた。アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG を二次抗体として 30 分反応させ、NBT および BCIP 含有 color development solution で発色させた。

#### (9) その他

動物実験は大阪府立大学動物実験計画指針、「動物愛護および管理に関する基準」および「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に準拠し実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 毒素の $\alpha$ アクチンへの結合能と心筋細胞に対する拍動停止作用

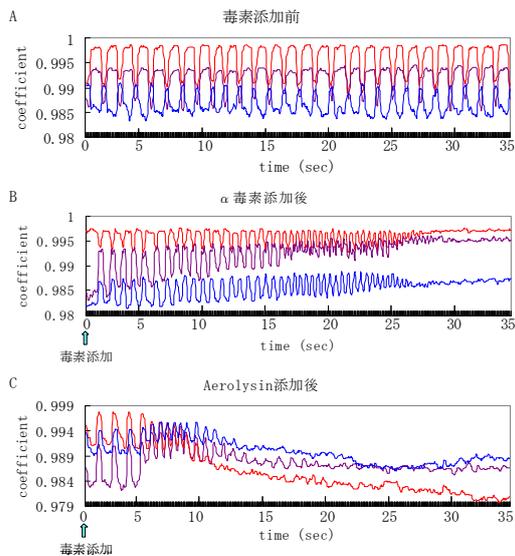


図1. 心筋細胞拍動リズムの解析  
 (A) 毒素添加前  
 (B)  $\alpha$  毒素 (20  $\mu$  g/ml)  
 (C) Aerolysin (50 ng/ml)

毒素添加前の心筋細胞は一定のリズムで同調して拍動していた (図 1A)。 $\alpha$  毒素を心筋細胞に添加したところ、まず心筋細胞の拍動リズムが速くなり、その後細胞死が起こる前に急速に拍動停止に至った。拍動停止に至るまでの収縮の様子は、細胞間の同調性がみられた。拍動停止後、拍動の再開は起こらなかった (図 1B)。 $\alpha$  毒素とアミノ酸配列の相同性が高く、同じ GPI アンカー蛋白を受容体とする *A. hydrophila* が産生する溶血毒素 Aerolysin の  $\alpha$  アクチンへの結合能を Toxin

overlay assay により調べた。Aerolysin は  $\alpha$  毒素でみられるような  $\alpha$  アクチンへの結合能は有していなかった (図 2)。しかしながら、

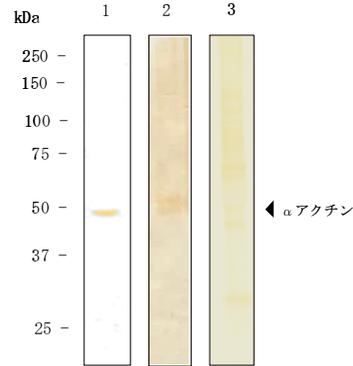


図2.  $\alpha$  毒素及びAerolysinの  $\alpha$  アクチンへの結合  
 1.  $\alpha$  アクチン 2.  $\alpha$  毒素の結合 3. Aerolysinの結合

Aerolysin を心筋細胞に添加したところ、 $\alpha$  毒素と同様に心筋細胞の拍動リズムが速くなり、その後細胞死が起こる前に急速に拍動停止に至った (図 1C)。この結果は、 $\alpha$  毒素の心筋細胞  $\alpha$  アクチンとの結合が拍動停止における必須の条件でないことを示している。  
 (2) ショ糖密度勾配遠心による各細胞分画からの  $\alpha$  毒素の検出

心筋細胞拍動停止時の細胞膜上に存在する  $\alpha$  毒素が単量体 (monomer) か、もしくは高分子複合体 (oligomer) 形成に至っているかを調べるため、 $\alpha$  毒素添加により拍動停止に至った心筋細胞を回収し、ショ糖密度勾配遠心法による解析を行った。拍動停止直後に回収した心筋細胞において、250 kDa 付近に毒素 oligomer とみられるバンドが検出された (図 3A)。毒素添加 1 時間後に回収した心筋細胞では、拍動停止直後に回収したものと比べ

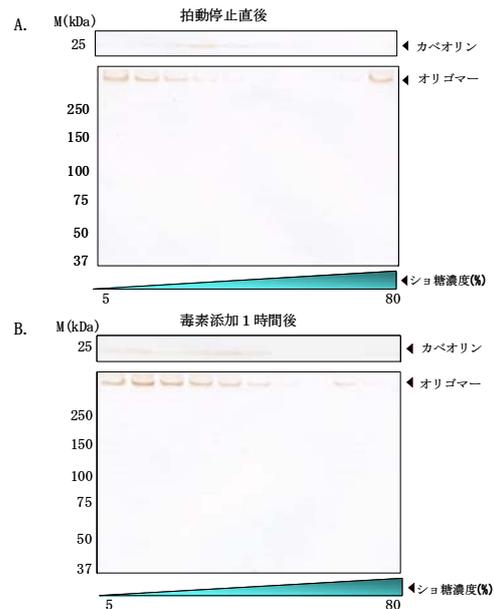


図3. ショ糖密度勾配遠心による心筋細胞からの  $\alpha$  毒素の検出

oligomerの形成量が増加していた(図3B)。この結果は拍動停止時に $\alpha$ 毒素はすでにオリゴマーを形成していることを示しており、心停止が受容体への結合によるシグナル伝達よりむしろ細胞膜上での孔形成が引き金になっていると考えられる。

### (3) 拍動停止における心筋細胞コレステロールの影響

$\alpha$ 毒素のoligomer形成を阻害する目的で、心筋細胞のコレステロール除去を行った。MCD処理によりコレステロールを除去した細胞に $\alpha$ 毒素を添加したところ、コレステロール非除去細胞とほぼ同時に拍動停止に至った。この細胞を回収し、ショ糖密度勾配遠心法による解析を行った。コレステロール除去細胞においても、oligomerのバンドが検出された(図4)。

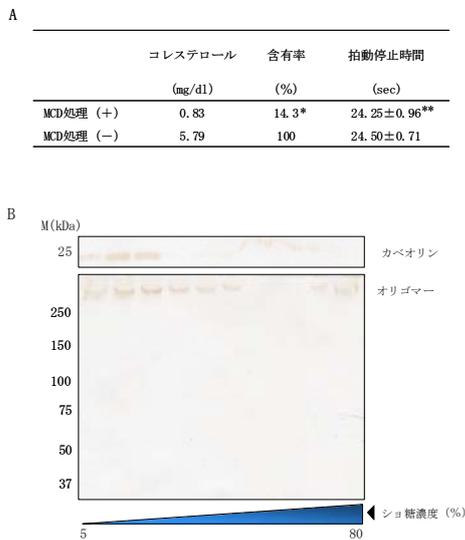


図4. 心筋細胞からのコレステロール除去による毒素作用への影響  
(A) \* MCD非処理細胞のコレステロール含有量を100%として、MCD処理細胞のコレステロール含有率を算出した。  
\*\* 毒素添加から拍動停止までに要した時間の平均±標準偏差  
(B) MCD処理細胞に $\alpha$ 毒素を添加、拍動停止直後に細胞を回収し、 $\alpha$ 毒素を検出した。

### (4) 毒素のパルミチン酸処理による影響

パルミチン酸処理により $\alpha$ 毒素のpore形成を阻害させた時、毒素による拍動停止までの時間は、 $\alpha$ 毒素のみの陽性対照では約1分という急速なものであったが、DMSOと $\alpha$ 毒素を混合したDMSO処理毒素では約20分で、拍動停止時間の延長がみられた。DMSOに溶解したパルミチン酸と毒素を混合したパルミチン酸処理毒素では拍動停止までの時間が約140分であり、DMSO処理毒素と比較しても大幅に延長し、統計的な有意差も得られた。毒素を含まないDMSOのみの陰性対照でも約140分であり、パルミチン酸処理毒素と有意差はなかった(図5A)。

パルミチン酸処理毒素とパルミチン酸非処理毒素を添加した心筋細胞をパルミチン酸非処理毒素で拍動が停止した時点で回収し、界

面活性剤可溶性画分と不溶性画分に分離し、免疫ブロッティングによりそれぞれの画分から毒素を検出した。パルミチン酸非処理毒素では可溶性画分にmonomerが、不溶性画分にoligomerが検出された。パルミチン酸処理毒素では若干の減少がみられたが、パルミチン酸非処理毒素と同様に可溶性画分にmonomerが、不溶性画分にoligomerが検出された(図5B)。パルミチン酸処理により拍動停止時間の大幅な延長が見られたがoligomer形成は維持されていたことから、心筋細胞の拍動停止はpore形成が引き金となって誘導されることが明らかとなった。

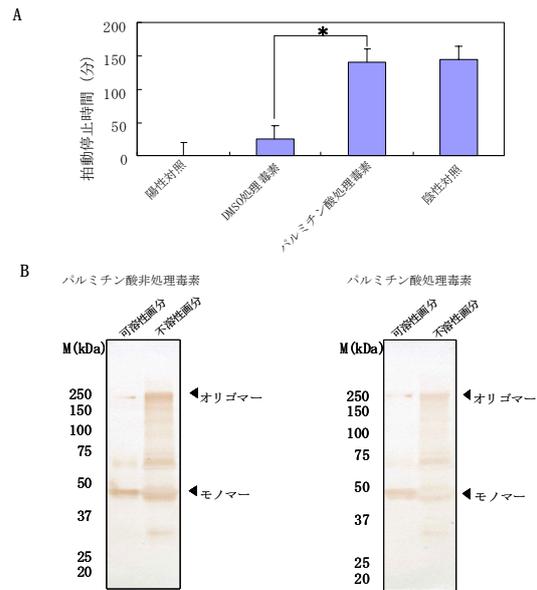


図5. パルミチン酸処理毒素の心筋細胞に対する作用

### (5) c-hemolysinの細胞致死活性

今回調べた4種類の細胞いずれにおいても $\alpha$ 毒素と比較して致死活性は著しく低く、感受性動物であるウシ腎臓由来のMDBK細胞でも他の細胞とほとんど変わりはない(表1)。

表1. c-hemolysinの細胞致死活性

株化細胞	由来動物	細胞致死率 (%)	
		<i>C. Chauvoei</i> hemolysin	<i>C. Septicum</i> $\alpha$ 毒素
MDCK	イヌ	15.6	100
L929	マウス	20.4	100
Vero	サル	14.9	100
MDBK	ウシ	24.5	100

毒素濃度 100 ng/ml

### (6) c-hemolysinの温度感受性

c-hemolysinの赤血球膜上でのオリゴマー形成をc-hemolysin処理赤血球の可溶化後、イムブロッティングで調べた結果、4°Cと37°Cのいずれの温度でも赤血球膜の可溶化画分に毒素の単量体が結合していることが確認

された。また、いずれの温度でもオリゴマー形成も見られたが、37°Cの方がより多く形成されていた(図6)。溶血活性(HU<sub>50</sub>)は4°Cで38.1μg/ml、37°Cで18.1μg/mlであり、37°Cの方が約2倍高かった。このことより本毒素の活性は温度感受性であるが、低温下でも活性を有し、膜上の可溶性画分で oligomer を形成することから、oligomer 形成にはコレステロールが必須の条件でないと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

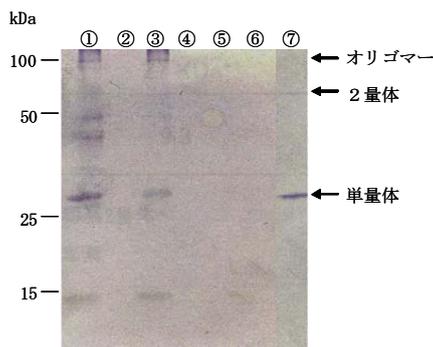


図6. C-hemolysinの赤血球膜への結合試験

- ①反応温度4°C 可溶性画分
- ②反応温度4°C 不溶性画分
- ③反応温度37°C 可溶性画分
- ④反応温度37°C 不溶性画分
- ⑤赤血球膜のみ 可溶性画分
- ⑥赤血球膜のみ 可溶性画分
- ⑦c-hemolysinのみ

[雑誌論文] (計 2件)

- ① Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T., Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Micro. Pathog.* (査読有) 44:484-493 (2008)
- ② Hang'ombe B.M., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki S. Effect of pH on the conformation and biological activity of *Clostridium septicum* alpha-toxin, a pore-forming hemolysin. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* (査読有) 2:46-49 (2007)

[学会発表] (計 4件)

- ① Nakamura, K., Kohda, T., Yamamoto, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. Characterization of *Clostridium botulinum* D/C mosaic neurotoxin associated with bovine botulism in Japan. The 45th Interagency Botulism Research Coordinating Committee Meeting (IBRCC2008) 2008年9月15日, Philadelphia, USA

- ② Kohda, T., . Ida, T. Ihara, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. Function analysis of synaptotagmin II as a receptor for *Clostridium botulinum* type B. 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2008年9月8日, 淡路島
- ③ 幸田知子, 中村佳司, 向本雅郁, 小崎俊司 牛ボツリヌス症由来菌神経毒素に特異的な抗原部位の検索と迅速診断法の確立 第60回日本細菌学会関西支部会 2007年11月10日, 大阪
- ④ 中村佳司, 幸田知子, 向本雅郁, 小崎俊司 牛ボツリヌス症分離菌株産生毒素の性状解析 第54回毒素シンポジウム 2007年9月5日, 大阪

#### 6. 研究組織

(1) 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・准教授  
80231629

(2) 研究分担者

小崎 俊司 (KOZAKI SHUNJI)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
10109805