

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 抗体ライブラリを活用した腸管感染症ワクチンの設計と診断基盤技術の開発  
(英語) Development of polyvalence vaccine and diagnosis for enteric pathogens using antibody library system
- 研究開発担当者 (日本語) 医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト  
プロジェクトリーダー 國澤 純
- 所属 役職 氏名： (英語) Laboratory of Vaccine Materials, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Project leader, Jun Kunisawa
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 微生物に対するワクチンや抗体の機能解析
- 開発課題名： (英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人大阪府立大学大学院 生命環境科学科 教授 山崎 伸二
- 所属 役職 氏名： (英語) Osaka Prefecture University, Professor, Shinji Yamasaki

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究は、これまでの研究で確立してきた「カンピロバクターに対する抗体ライブラリ」と「ウエルシュ菌エンテロトキシンを用いたワクチン技術」を融合させることで、①ウエルシュ菌やカンピロバクターなどの細菌性食中毒に対するワクチン開発と、②カンピロバクター特異的抗体を用いた診断システムの基盤技術の開発を目的としている。本事業の初年度である平成28年度は、カンピロバクターに対する抗体ライブラリを用い、感染防御および反応性の観点から有用な抗体を同定するためのスクリーニングを実施した。その結果、腸管上皮細胞株を用いた感染モデルにおいてカンピロバクターの感染を防御できる抗体を2種類同定した。さらに、フローサイトメトリーを用いた反応性スクリーニングから、カンピロバクターに対して高い反応性を示す抗体を5種類同定した。次に、

研究開発分担者と共同で、菌体加熱抗原を用いた ELISA によって、ヒト・牛・鶏から分離された *Campylobacter jejuni* 9 株、さらに *C. jejuni* 以外の *Campylobacter* 属菌や近縁種である *Arcobacter* 属菌に対する反応性を同様に評価した。その結果、菌種や *C. jejuni* の血清型の違いによる反応性の違いなどが確認された。また質量分析器を用いたプロテオーム解析により、これらの抗体が認識する候補分子の同定を行い、現在、検証実験を進めているところである。このように 28 年度の研究開発目標である「カンピロバクター特異的抗体の機能性・反応性スクリーニング」を完了し、ワクチン開発に向けた抗体認識分子の同定や診断システムの開発に向けた反応性の検討も順調に進めている。

#### 英文

This study aims to develop 1) multivalent vaccine for bacterial food poisoning including *Campylobacter* and *Clostridium perfringenes* infections and 2) diagnosis system to detect *Campylobacter*. These systems are based on our original technologies, 'library of monoclonal antibodies (mAbs) against *C. jejuni*' and 'vaccination system using *C. perfringenes* enterotoxin', respectively. In this year, we have performed screening experiments to determine the mAbs which could prevent infection (or invasion) of *C. jejuni* and exhibit high reactivity to *C. jejuni*. Our *in vitro* assay allowed the identification of two preventive mAbs and five highly reactive mAbs. We further evaluated a reactivity of these mAbs against 9 *C. jejuni* strains, which have different serotype and origin, and genus *Campylobacter* other than *C. jejuni* (*C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. upsaliensis* and *C. ureolyticus*) and genus *Arcobacter* (*A. butzleri* and *A. skirrow*) by ELISA, revealing the different properties of each mAb in the reaction to them. We also identified candidate molecules which are recognized by mAbs by using proteome analysis using mass-spectrometry.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5 件、国際誌 5 件)

1. Hosomi K and Kunisawa J. The specific roles of vitamins in the regulation of immunosurveillance, allergy, and inflammation in the gut. *Immune Net.* (2017, in press)
2. Kunisawa J. Metabolic changes during B cell differentiation for the production of intestinal IgA antibody. *Cell Mol Life Sci.* (2017, in press)
3. Kunisawa J and Kiyono H. Sphingolipids and epoxidized lipid metabolites in the control of gut immunosurveillance and allergy. *Front Nutrition.* 2016, 3:3.
4. 鈴木英彦、國澤純. ビタミンによる免疫応答の制御と疾患. 炎症と免疫. 2017, 25(1): 29-33.
5. 國澤純. 腸内環境を介した免疫制御とアレルギー・炎症との関連. *Labcab.* 2016, 17:5-7.
6. 國澤純、平田宗一郎、清野宏. 経粘膜ワクチンデリバリー剤の開発の現状と今後の展望. 薬剤学. 2016, 76: 11-17.
7. 細見晃司、國澤純. 腸内細菌と粘膜免疫. ヒトマイクロバイオーム研究最前線 (監修、服部正平). 2016, 119-128.
8. 細見晃司、國澤純. マイクロバイオームとワクチン開発. ヒトマイクロバイオーム研究最前線

(監修、服部正平) . 2016, 299-306.

9. S. Somroop, N. Hatanaka, S. P. Awasthi, M. Asakura, A. Hinenoya and S. Yamasaki\*. *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog produces high titer of cytolethal distending toxin. *J. Vet. Med. Sci.*, 79(3): 683-691, 2017.
10. N. Hatanaka, K. Kamei, S. Somroop, S. P. Awasthi, M. Asakura, N. Misawa, A. Hinenoya and S. Yamasaki\*. A PCR-RFLP assay to detect and type cytolethal distending toxin (*cdt*) genes in *Campylobacter hyointestinalis*. *J. Vet. Med. Sci.*, 79(2): 336-342, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 腸内環境を起点に進める創薬研究, 口頭, 國澤純, 日本薬学会 第 137 年会 2017/3/26, 国内.
2. 腸内環境が導く生体応答の基礎的解明と健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 第 11 回 関西ライフサイエンスリーディングサイエンティストセミナー 2017/3/9, 国内.
3. 腸内環境を介した免疫システムの構築とワクチン、創薬、機能性食品開発への展開, 口頭, 國澤純, 第 19 回 藤田保健衛生大学小児科後期研修セミナー, 2017/2/4, 国内.
4. 健康増進における腸内環境の重要性と Precision medicine & nutrition としての可能性, 口頭, 國澤純, 彩都産学官連携フォーラム 2017, 2017/1/25, 国内.
5. Gut Environmental Factors Act as Natural Adjuvants in the Regulation of Intestinal Immune Responses against Oral Vaccines, 口頭, Jun Kunisawa, 10th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium, 2017/1/24, 国内.
6. 食と腸内フローラが奏でる腸内環境の構築と創薬・健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 創薬薬理フォーラム 第 61 回談話会, 2017/1/20, 国内.
7. 腸内環境を介した免疫制御と健康科学への新展開, 口頭, 國澤純, 第 20 回日本病態栄養学会 年次学術集会, 2017/1/15, 国内.
8. Gut Environment in the Regulation of Host Immunity and Its Application to the Human Health Science, 口頭, Jun Kunisawa, 6th Investigative Commission of Ortho-Organogenesis, 2016/12/8, 国内.
9. Critical Roles of Gut Environmental Factors in the Regulation of Immunosurveillance and Allergic Diseases, 口頭, Jun Kunisawa, The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016/12/6, 国内.
10. 食事や生活習慣と連動した腸内フローラの形成と生体応答, 口頭, 國澤純, 神戸大学農工連携次世代バイオプロダクション(iBioK)主催フォーラム, 2016/11/25, 国内.
11. 消化管免疫と腸内環境から考える Precision Medicine & Nutrition の可能性, 口頭, 國澤純, 第 54 回小腸研究会, 2016/11/12, 国内
12. 腸から考えるヘルスサイエンス, 口頭, 國澤純, 第 3 回 六甲医学研究会, 2016/10/28, 国内.
13. 腸内環境を介した免疫制御の基礎的解明と応用・実用化研究に向けた展開, 口頭, 國澤純, 第 12 回日本食品免疫学会, 2016/11/10, 国内.
14. 腸内細菌を活用したワクチン開発, 免疫創薬, ヘルスサイエンスへの展開, 口頭, 國澤純, マイ

クロバيوームワークショップ～健康と疾患に関わるヒト細菌叢解析の最適手段～, 2016/9/20, 国内.

15. 健康指標としての腸内細菌, 口頭, 國澤純, JASIS2016 ライフサイエンス イノベーションフォーラム, 2016/9/8, 国内.
  16. Precision medicine & nutrition の実現に向けた腸内環境の理解と応用, 口頭, 國澤純, 腸内菌叢の創薬応用セミナー, 2016/9/7, 国内.
  17. 腸から考えるヘルスサイエンスと創薬・ワクチン・機能性食品開発への展開, 口頭, 國澤純, 第21回 那須ティーチイン, 2016/7/30, 国内.
  18. 腸内環境から考えるヘルスサイエンスと将来展望, 口頭, 國澤純, 第33回 大阪大学ツインリサーチセミナー, 2016/6/15, 国内.
  19. 栄養—腸内フローラネットワークを介した免疫制御と疾患, 口頭, 國澤純, 腸内マイクロビオータ研究会, 2016/4/15, 国内.
  20. 我が国の小児下痢症を対象とした *Campylobacter ureolyticus* の保菌調査について, 第69回日本細菌学会総会. ポスター, 清水顕範, 畑中律敏, 名木田章, 朝倉昌博, Sharda Prasad Awasthi, 日根野谷淳, 山崎伸二: 仙台国際センター展示棟, 仙台, 2017/03/19-21, 国内
  21. カンピロバクター属菌の病原因子について, 第9回日本カンピロバクター研究会. シンポジウム 口頭, 山崎伸二: 杏林大学, 三鷹, 2016/11/26, 国内
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
1. 医薬基盤・健康・栄養研究所 2016年11月19日 「医薬基盤・健康・栄養研究所 一般公開 白衣を着てちびっこ博士になろうーうがい薬でビタミンCを探せー」
  2. 食の安全 (食中毒) について, 山崎伸二, 高齢者大学 「未来の先端科学技術を楽しく学ぶ科」 2016/11/08, 国内 (大阪)
  3. 地球環境と感染症について 山崎伸二, 堺エコロジー大学専門コース 2016/08/02, 国内 (堺)

(4) 特許出願