

ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立

所 属 岡山大学大学院医歯学総合研究科

研究者 小熊 恵二

分担研究者

- (1) 大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科 小崎 俊司
- (2) 東京農業大学・生物産業学部・食品科学科 大山 徹
- (3) 北海道立衛生研究所・食品微生物科 武士 甲一
- (4) 徳島大学医学部附属病院・難聴診療部 梶 龍兒
- (5) 岡山大学大学院医歯学総合研究科・眼科学 大月 洋
- (6) 国立感染症研究所・細菌第2部 高橋 元秀
- (7) エーザイ株式会社臨床研究センター臨床部 尾沢 英男

要旨

ボツリヌス A～E 型神経毒素を精製した。特に A 型・B 型毒素の場合は、ラクトースゲルカラムを利用する新しい方法を開発した。また、D 型毒素を精製する新しい方法も開発した。これら神経毒素標品にアルブミンを添加すると、毒性は保存中にそれほど低下しないこと、および、A 型神経毒素は現在治療に用いられている BOTOX と同程度あるいはそれ以上の効果を示すことがラットでの実験で示されたことから、神経毒素は治療用として使用可能であることが判明した。

1.研究目的

ボツリヌス菌は強力な神経毒素を産生する。神経毒素の分子量は約 15 万であるが、その抗原性の異なりから A～G 型に分類される。培養液中では神経毒素は無毒成分と結合し、分子量 30 万 (M or 12S toxin)、50 万 (L or 16S toxin)、90 万 (LL or 19s toxin) という巨大分子 (progenitor toxin) を形成する。神経毒素は神経・筋接合部に作用し弛緩性麻痺をきたす。近年、この毒素の特徴を利用し、微量の progenitor toxin (市販名 BOTOX など) を用いてジストニアなどの筋緊張異常症を治療することが試みられている。本研究では、ヒトや動物に中毒をきたす A～F 型菌より神経毒素のみを単離・精製し、どの型の毒素が効果良く治療に応用できるかを決定することを目標としている。

2.研究方法

1) 毒素の精製と安定性

これまでに A～E 型神経毒素を精製した。A, C, E 型毒素は従来のカラムクロマトグラフィーを用いる方法で、D 型毒素は一部変更した方法で精製した。また B 型毒素の場合は、ラクトースゲルカラムを利用したまったく新しい方法を用い、トリプシン処理により完全に活性化された神経毒素を得た。神経毒素を pH (中性、酸性、アルカリ)、アルブミン添加の有無、温度 (4, -80, 室温) などの異なった条件下で保存し、その安定性を検討した。

2) 毒素の活性

毒素の生物活性は従来のように、マウスの静脈内投与、あるいは腹腔内投与で決定した。さらに、神経・筋肉接合部への遮断作用は、ラットの後脚を用いて電気生理学的に、および家兎の外眼筋の張力を測定することにより検討した。

3.研究成果

- 1) A～E型神経毒素を大量に精製した。特にB型の場合、従来の方法では完全に活性化された状態で得られなかったが、HA活性を示す progenitor toxin (HA⁺-progenitor toxin, 16S toxin, or L toxin)がガラクトースに結合する事を見いだしたことから、ラクトースカラムを利用することにより、トリプシンで完全に活性化された16S毒素と神経毒素を容易に精製できる新しい方法を開発した。同様にA型神経毒素もラクトースカラムで容易に精製された。D型毒素の場合は、神経毒素にニック(nick, 切れ目)を認めない毒素を産生するD-4947株を用い、まず16S毒素を精製し、次いでアルカリ条件下でゲル濾過をすることにより神経毒素と無毒成分を得る方法を開発した。
- 2) これらの毒素にアルブミンをB, C, Dでは0.05%, A, Eでは0.5%添加すると、pH、温度いずれの条件でも数ヶ月間は毒素は安定であることが判明した(但し、C, E型毒素の場合は他の毒素よりも少し不安定であった)。
- 3) A型毒素を投与したラットの後脚の筋電図をとることにより、また、C型毒素を家兎の外眼筋に接種した後、その張力を測定することにより、毒素の神経・筋肉に対する遮断作用を検討したところ、A型神経毒素はBOTOXと同等あるいはそれ以上の、C型毒素は同程度の効果を示した。
- 4) 神経毒素標品の安全性と有効性に関して、精度管理された品質管理試験方法の案を作成した。
- 5) マウスを用いて微量の抗毒素抗体を測定する方法を開発し、BOTOX治療をうけ、抗毒素抗体が存在すると予想されている患者さんの血清を用いて検査したが、これまでのところ抗体の存在は確認できなかった。
- 6) 微量の毒素の存在を簡単にチェックできる、逆受身ラテックス凝集反応や、金コロイドで標識した抗毒素抗体を用いる方法を開発した。

4.考察・まとめ

本年度はA～E型神経毒素を大量に精製する方法を確立した。B型毒素の場合、完全に活性化された状態の毒素が得られたことから、A型と同様に利用できるようになった。アルブミンを添加することで、progenitor toxinの場合と同様に安定化することが判明し、また、毒素を投与したラットや家兎の実験から、神経毒素は効率良く作用することが認められたので、今後、神経毒素標品の安全性を確かめた後、治療に応用する予定である。マウスを用いた微量の抗毒素価を測定する方法を開発したが、実際の患者さんの例では抗体の存在を確認できなかったため、もっと感度の良い免疫・生化学的方法を開発する予定である。

5.研究発表

小熊 恵二

- 1) ○ Furuse T, Hasebe S, Ohtsuki H, Oguma K: Passive length-tensile properties of extraocular muscles under botulinum toxin type C. Jpn. J. Ophthalmol. 47(2), (in press).
- 2) ○ Hughes L, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K. Expression of Hc subunit from *Clostridium botulinum* types C and D their evaluation as candidate vaccine antigens. Infect. Immun. (in press)
- 3) ○ Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohshima T, Hirst R, and Oguma K. Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with Dystonia. Infect Immun. 2003. 71:1599-1603.
- 4) ○ Sagane Y, Hasegawa K, Mutoh S, Kouguchi H, Suzuki T, Sunagawa H, Nakagawa T, Kamaguchi A, Okasaki S, Nakayama K, Watanabe T, Oguma K and Ohshima T. Molecular characterization of GroES and GroEL homologues

from *Clostridium botulinum*. J. Prot.. Chem. 22: 99-108. 2003.

- 5) ○ Nazira M, Inoue K, Fujinaga Y, Hughes L, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Ohtsuka A, Murakami T, Yokota K, Oguma K. Characterization of monoclonal antibodies against haemagglutinin associated with *Clostridium botulinum* type C neurotoxin. J. Med. Microbiol. 2002. 51: 286-294.
- 6) ○ Sagane Y, Watanabe T, Kouguchi H, Sunagawa H, Obata S, Oguma K and Ohyama T. Spontaneous nicking in the nontoxic-nonhemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* toxin complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. 292: 434-440.
- 7) ○ Nazira M, Inoue K, Fujinaga Y, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Hughes L, Hirst R, Murphy T, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Karasawa T, Nakamura S, Yokota K and Oguma K. Mucosal immunisation with *Clostridium botulinum* type C 16S toxoid and its non-toxic component. J. Med. Microbiol. 2002. 51:813-820.
- 8) 小熊惠二、武士甲一：ボツリヌス菌 松本慶蔵編 病原菌の今日的意味 医学ジャーナル社 2003. 289-305.
- 9) 小熊惠二：細菌の蛋白および DNA の分泌・注入様式について；タイプ I～IV システム. トピック総説, 日本ヘリコバクター学会誌, 2002. 4(1), 36-40.
- 10) ○ 小熊惠二：ボツリヌス菌. 化学療法の領域. 医学ジャーナル, 2002. 18(3), 323-327.
- 11) ○ 小熊惠二：ボツリヌス毒素. 化学療法の領域. 特集：バイオテロリズム対応策. 医学ジャーナル, 2002. 18(3), 347-352.
- 12) ○ 小熊惠二：乳児ボツリヌス症. 別所文雄 山下直哉、小島好文、水口雅（編）小児科臨床 増刊号, 2002. vol.55. 1291-1300.)
- 13) ○ 小熊惠二：概説Ⅲ 細菌毒素の応用. 櫻井純、本田武司、小熊惠二（編）細菌毒素ハンドブック サイエンスフォーラム, 2002. 17-22.
- 14) ○ 小崎俊司、幸田知子、小熊惠二：ボツリヌス毒素. 櫻井純、本田武司、小熊惠二（編）細菌毒素ハンドブック サイエンスフォーラム, 2002. 86-94.
- 15) ○ 首藤文榮、小熊惠二：C₃ 酵素. 櫻井純、本田武司、小熊惠二（編）細菌毒素ハンドブック サイエンスフォーラム, 2002. 105-112.
- 16) ○ 小熊惠二：「特集 2」ボツリヌス療法の現状と将来の展望 ボツリヌス毒素の基礎知識. 脳 21, 2002. 5 (4) 53-60.

小崎 俊司

- 1) ○ Tsukamoto K, Mukamoto M, Kohda T, Ihara H, Wang X, Maegawa T, Nakamura S and Kozaki S. Characterization of *Clostridium butyricum* neurotoxin associated with food-borne botulism. Microbiol. Path. 33, 177-184 (2002)

大山 徹

- 1) ○ Kouguchi H, Watanabe T, Sagane Y, Sunagawa H, and Ohayama T. *In Vitro* Reconstitution of the *Clostridium botulinum* Type D Progenitor Toxin. J. Biol. Chem. 2002, 277, 2650-2656
- 2) ○ Sagane Y, Watanabe T, Kouguchi H, Sunagawa H, Obata S, Oguma K, and Ohayama T. Spontaneous Nicking in Nontoxic-Nonhemagglutinin Component of the *Clostridium botulinum* Toxin Complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 292, 434-440

武士 甲一

- 1) ○ 武士甲一：遺伝子診断法、国立感染症研究所獣医学部編、炭疽菌検査・診断マニュアル、東京、平成 14 年 2 月、pp.12-15
- 2) ○ 武士甲一：北海道におけるボツリヌス中毒事例及び PCR 法を用いたボツリヌス迅速診断法の開発、国立感染症研究所細菌・血液製剤部編、ボツリヌス症の手引き・資料集、東京、平成 14 年 2 月、PP.106-114

梶 龍兒

- 1) 坂本 崇、梶 龍兒：ボツリヌス療法の将来展望 脳 21 420-423, Vol. 5, No. 4 2002

大月 洋

- 1) ○ Furuse T, Hasebe S, Ohtsuki H, Oguma K. Passive length-tensile properties of extraocular muscles under botulinum toxin type C. *Jpn. J. Ophthalmol.* 47(2), in press)

高橋 元秀

- 1) Takahashi M, Omori-Sato T. : What is the rabbit skin test method by Kondo et al.(1960) for determining hemorrhagic activities of snake venom? *Toxicon* 40, 2002.
- 2) ○ 高橋元秀、岩城正昭、荒川宜親 ボツリヌス症 感染症の診断・医療ガイドライン (生涯教育シリーズ51) 日本医師会雑誌 第128巻、第1号 2002.7.1
- 3)○ Torii Y, Tokumaru Y, Kawaguchia S, Izumia N, Maruyama S, Mukamoto M, Kozaki S, and Takahashi M. Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F)toxoid. *Vaccine* 20, 2556-2561, 2002.
- 4)Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naio S, Kato H, Taniguchi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K and Uchida T. Protection of Monkeys against Shiga Toxin Induced by Shiga Toxin-Liposome Conjugates. *International Archives of Allergy and Immunology* 127:294-298, 2002

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
- 2) 実用新案登録
- 3)その他「ボツリヌス毒素の分離・精製法」と称する発明の特許を出願した (受付番号 50100973438)。また神経毒素標品にアルブミンを添加すると、毒素活性が減弱しないことなどの発見についても特許を申請した (受付番号 50200455038)。