

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	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	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

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

研究要旨

A型神経毒素はヒトにおいてもBOTOXより良い効果を示すこと、また、B型の場合、神経毒素よりも16S毒素接種の方が抗神経毒素抗体が上昇することを認めた。微量の毒素を簡単に測定できるイムノクロマト法の開発や、D型16S毒素の分子構成の解析も行った。

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 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 梶龍児
- (5) 国立感染症研究所細菌第2部 高橋元秀
- (6) エーザイ株式会社臨床研究センター
尾沢英男

A. 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。本年は、既にA, B, C, D, E型神経毒素の場合は、ヒトアルブミンを添加すると安定することが判明したので、その詳細とF型毒素の安定性を検討した。

また、A型神経毒素の効果をボランティアに接種し確かめた。さらに、神経毒素単独接種よりもprogenitor toxinを接種すると抗神経毒素抗体が産生されやすいと言われているので、その点を確かめた。その他、微量の毒素を簡単に測定できる方法の開発、D型progenitor toxinの分子構成の解析を行った。

B. 研究方法

1) 毒素の精製と安定性の解析

これまでのようにA～F型神経毒素を精製した。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) 毒素の活性の解析

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、ヒトの後脚を用いて電気生理学的に検討した。

3) B型HA各成分の作製と免疫増強作用の解析

抗体産生増強作用を検討するため、B型の各HA成分をGST融合タンパク質として大腸菌で作製した。これらよりGSTおよび大腸菌由来のLPSを完全に除いて実験に用いた。神経毒素(NTX)と16S毒素はホルマリン処理によりトキシド化した。免疫増強作用は以下の2方法により解析した。

<in vivoの実験>

作製した抗原を単独あるいは種々混合してマウス(BALB/c)を1週間おきに6回免疫した後、得られた血清中の抗NTX抗体の濃度をELISA法にて測定した(n=10)。

<in vitroの実験>

マウスの脾臓細胞を24-48時間刺激した後、IFN- γ 、IL-6、IL-4の濃度をImmunoassayにて測定した。

4) イムノクロマト法の開発

家兎の抗B型神経毒素抗体を精製し、これに金コロイドを標識し、イムノクロマト法を開発した。この方法の、精製毒素や食品中に存在する毒素を検出する特異性と感度を検討した。

C. 研究結果

- 1) F型神経毒素の毒性は、A、E型神経毒素と同様にヒトアルブミンを0.5%添加すると安定であった。
- 2) A型毒素を投与したヒトの後脚の筋電図をとることにより、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効果を示した。
- 3) 神経毒素単独よりも16S毒素の方が、ま

た、神経毒素にHA1あるいはHA3bを添加すると抗神経毒素抗体が上昇したことから、HA1とHA3bに免疫増強作用があることが推察された。このことは脾臓のリンパ球を用いたin vitroの実験からも支持された；HA1あるいはHA3bの刺激によりIL6の産生が亢進された。

- 4) イムノクロマト法の感度は20MLD/mlであり、特異性も高く、遅くとも30分以内に判定できるすぐれたものであった。
- 5) D型16S毒素の構成分子比は、神経毒素：non-toxic non-HA：HA1：HA2：HA3が1：1：4：4：2であった。

D. 考察

F型神経毒素の毒性は、A、E型神経毒素と同様にヒトアルブミンを0.5%添加すると安定であったことから、本毒素も利用可能であることが判明した。A型毒素はヒトにおいてもBOTOXと同等あるいはそれ以上の効果を示したので、実際に治療可能であることが確認された。神経毒素単独よりも16S毒素の方が、また、神経毒素にHA1あるいはHA3bを添加すると抗神経毒素抗体が上昇したことから、HA1とHA3bに免疫増強作用があることが推察された。従って、ボツリヌス毒素による治療の際には、progenitor toxinよりも神経毒素を用いるべきであることが判明した。

E. 結論

A型毒素はヒトにおいてもBOTOXと同等あるいはそれ以上の効果を示したので、また、神経毒素単独接種よりも16S毒素接種の方が、HA1あるいはHA3bの免疫増強作用により抗神経毒素抗体が上昇したことから、ボツリヌス毒素による治療の際には、BOTOXや16S毒素などのprogenitor toxinよりも神経毒素を用いるべきであることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y, Matsumura T, Kabumoto Y, Watanabe T, Ohyama T, Nishikawa A, Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. Microbiol. (in press)

Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin SN, Mukamoto M, Murphy T, Oguma K. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (in press).

Inoue K, Sobhany M, Transue TR, Oguma K, Pederson LC, Negishi M. Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a hemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. Microbiol. 149: 3361-3370, 2003.

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 Ohyama T. Molecular characterization of GroES and GroEL homologues from *Clostridium botulinum*. J. Protein. Chem. 22: 99-108, 2003.

Woodward LA, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K. Expression of Hc subunits from *Clostridium botulinum* types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice. Infect. Immun. 71: 2941-2944, 2003.

Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Hirst R, and Oguma K. Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with Dystonia. Infect. Immun. 71: 1599-1603, 2003.

Furuse T, Hasebe S, Ohtsuki H, Oguma K. Passive length-tensile properties of extraocular muscles under botulinum toxin type C. Jpn. J. Ophthalmol. 47: 145-150, 2003.

Ihara, H., Kohda, T., Morimoto, F., Tsukamoto, K., Karasawa, T., Nakamura, S., Mukamoto, F., and Kozaki, S. 2003. Sequence of the gene for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism,

expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity. Biochim. Biohys. Acta, 1625:19-26, 2003.

Mutoh, S., Kouguchi, H., Sagane, Y., Suzuki, T., Hasegawa, K., Watanabe, T., and Ohyama, T. Complete Subunit Structure of *Clostridium botulinum* Type D Toxin Complex via Intermediate Assembly with Nontoxic Components. *Biochemistry*, 42: 10991-10997, 2003.

Nakai K, Takahashi M and Tomita M : The equine antitoxins supply system for biological poisons in Japan. *Toxicon* Vol. 42, (5), 561-562, 2003.

2. 学会発表

K. Oguma, H. Arimitsu, K. Inoue, Y. Sakaguchi, J. Lee, Y. Fujinaga. Establishment of a new procedure for purifying fully activated *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003.4.26-4.30)

K. Inoue, M. Sobhany, K. Oguma and L. C. Pedersen and M. Negishi. Crystal structure of hemagglutinin(HA1) in *C. botulinum* type C 16S toxin and its binding to sugar. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003.4.26-4.30)

Y. Fujinaga, H. Arimitsu, Y. Sakaguchi, J. Lee, K. Inoue, W. I. Lencer, and K. Oguma. Identification of functional subunits of *C. botulinum* type C 16S toxin involved in binding to intestinal epithelial cells and erythrocytes. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003.4.26-4.30)

K. Ougma, K. Takeshi, C. Monma. Risk of botulism in

low-acid food products and a botulism case caused by one of them. 38th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, UNITED STATE-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES. Tokyo. (2003. 11. 11 - 12).

小熊恵二: ボツリヌス毒素およびボツリヌス中毒について, 第 24 回日本食品微生物学会学術総会 (特別講演) (2003. 10. 2~3) 岡山

長谷川仁子, 武藤信吾, 鈴木智典, 相根義昌, 孝口裕一, 渡部俊弘, 砂川紘之, 小熊恵二, 大山徹: ボツリヌス D 型菌 4947 株の GroES および GroEL 様タンパク質の分子特性および遺伝子のプロモーター解析, 第 76 回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)

萩山桐子, 永浜政博, 山口明雄, 小林敬子, 阪口義彦, 小熊恵二, 櫻井純: ボツリヌス菌 C2 毒素 Component II の細胞への結合, 第 76 回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)

有満秀幸, 阪口義彦, 李在哲, 林松男, 関鋭, 藤永由佳子, 小熊恵二: リコンビナント神経毒素重鎖 (Hc) を用いたボツリヌスワクチンの効果について, 第 76 回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)

藤永由佳子, 有満秀幸, 阪口義彦, 李在哲, 小熊恵二: コレラ毒素やボツリヌス毒素の宿主腸上皮細胞内輸送, 第 76 回総会, 熊本, 日本細菌学雑誌, 58 (1) (2003)

藤永由佳子, Anne Wolf, Chiara Rodighiero, Wayne Lencer, 有満秀幸, 李在哲, 阪口義彦, 小熊恵二: コ

レラ毒素やボツリヌス毒素の宿主腸上皮細胞内輸送について, 第 50 回毒素シンポジウム 白浜温泉 (和歌山) (2003.7.9~11) .

株本祐子, 藤永由佳子, 金英姫, 松村拓大, 李在哲, 阪口義彦, 小熊恵二: ボツリヌス B 型神経毒素複合体の腸管上皮細胞バリア通過機構の解析, 第 56 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2003) 徳島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願請求取得

*工業所有権の名称: 筋緊張亢進疾患治療剤, 発明者: 小熊恵二, 工業所有権の種類・番号: W003/082315, 出願年月日: 平成 15 年 2 月 25 日

*特願 2001-287967

発明の名称: ハロー撮影装置およびハロー撮影方法

発明者: 笹川伸之, 武士甲一

*特許取得: 日本国特許出願 2002-94698 「ボツリヌス神経毒素を含有する医薬組成物」

2. 実用新案登録

3. その他

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社