

ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・ 痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対する drug delivery systemの開発

所 属 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
神経情報医学分野

研究者 梶 龍児

研究要旨：ボツリヌス神経毒素の抗体の認識部位を決定し、ボツリヌスA型神経毒素の精製法を開発した。ヒトにおいて安全性を検証し、有効性についても良好な見通しを得た。抗毒素抗体はA型の場合もB型同様、神経毒素重鎖の親水性残基に結合することを明らかにした。

分担研究者

- (1) 大阪府立大学大学院 小崎俊司
- (2) 岡山大学大学院 小熊恵二
- (3) (財)化学及び血清療法研究所 原川哲博
- (4) 国立感染症研究所 高橋元秀

A. 研究目的

ボツリヌス菌が産生する毒素は神経・筋接合部に作用し、強力な弛緩性麻痺をきたす。この筋弛緩作用を利用し、微量の精製されたA型毒素がジストニアなどの筋緊張亢進症の治療に臨床応用されている。しかし現在用いられている毒素製剤は分子量90万の巨大蛋白であり、長期連用で抗体が産生され有効性が消失する例があり、問題となっている。また、その抗体の毒素認識部位もまだ明らかではない。我々はこの有効成分である分子量15万の神経毒素を単離することに成功した。この神経毒素は抗体ができにくくいばかりではなく従来の90万毒素に比べて、作用の持続が長く安全性が高い可能性を示す知見も得られた。本研究では、本毒素の臨床応用を図るために、安全性に細心の注意を払いながらこれらの特性を確認し、さらに長期保存にも耐える安定性を得るための方法を開発する。また、抗体の毒素認識部位についても明らかにする。A型に関して開発を急ぐ

ため、本年度はA型毒素の精製法について最適化をはかり、次年度にB-F型の有用性について検討を行うこととした。

B. 研究方法

(1) A型神経毒素中和抗体認識部位の検索

A型神経毒素のアミノ酸配列から、親水性に富み、毒素分子表面に存在することが予想された20エピトープとヒト抗毒素抗体と反応することが報告されている13エピトープについて抗体の結合部位を検討した。

(2) 神経毒素重鎖C末端領域(Hc)リコンビナント蛋白の調製と受容体結合活性

リコンビナントHcを調製しB型神経毒素受容体結合部位に関わるアミノ酸残基を同定した。

(3) 毒素の安全性を以下のように検討した。肝炎ウイルスB(PCR), C(RT-PCR), およびAIDSウイルス(RNA高感度定量法)による汚染の有無、プリオンの汚染「プリオンチェックWB」を用いウェスタンブロット法で調べ培養細胞に対する障害性も検討した。

(4) 製造方法の改良

菌培養に用いる毒素用ペプトンには動物由

来成分が含まれていることから、植物由来のペプトンに換えて A 型ボツリヌス菌の培養を行った。

(5) 動物における検討

複合筋活動電位 (CMAP) の振幅を指標とする毒素評価系を用いた。後肢下腿三頭筋に毒素を施注後、経時的に CMAP の投与前値との比を%表示し

(%CMAP)、毒素効力の指標とした。

(6) ヒトにおける臨床研究

徳島大学倫理委員会に諮りその答申を得た後に痙縮患者 6 名 (年齢 19 歳~67 歳)、脳血管障害後遺症 3 名 (年齢 23 歳~69 歳)、重症ジストニア患者 3 名 (年齢 24 歳~56 歳) の計 12 名において十分な説明に基づく同意を得た後に初回神経毒素 (NTX) 100 単位を罹患筋 1 箇所注射し、1 ヶ月ごとに初回と同じ筋、または他の異常な筋緊張を示す筋に最大 500 単位まで追加して検討した。安全性、有効性の評価は毎月行った。

C. 研究成果

A 型神経毒素分子上で予想される抗原決定基を含む合成ペプチ (34 種類) を調製し、ヒト、ウサギおよびウマ抗毒素抗体 (IgG 分画) との反応性を調べ抗体は受容体認識部位である Hc 内のペプチドに多く反応することを示した。また、リコンビナント Hc の調製にも成功した。A 型神経毒素を簡単に精製する方法を考案し米国特許を得た。またトレハロースが毒素の安定化に寄与することを初めて示した。動物由来成分を含まない培地を用いて毒素を製造する方法も開発し安定に凍結乾燥毒素を精製することに成功した。動物実験において、従来のボツリヌス毒素製剤ボトックス (BTX) に比較して NTX は図 1 に示すように有意に効果の発現が早く、その結果効果の持続時間も長いことを示し、NTX の効果は BTX の約 1.4 倍と考えられこれで補正をすると BTX よりも NTX のほうが治療の安全域が広いことを示した。また、ヒト健常者 5 名において動物実験で得られた 1.4 倍の単位補正をもとに、右短母指伸筋 (EDB) に BTX7 単位、左 EDB に NTX5 単位を注射し、その%CMAP に与える影響を調べた (図 2)。その結果、やはり補正を行っても BTX に比べ NTX の方が作用の発現が長く、持続も長いことが判明した。

痙縮・ジストニア患者での検討では累積使用量は 300 単位から 3900 単位に及んだが、重篤な副作用は見られなかった。ただし、累積投与量 1150 単位から 3900 単位の 3 例において非注射筋の脱力が見られたがすべて回復した。臨床効果に関して図 3 に示すように累積投与量が増えることにより、目標とした筋の緊張が低下しており、期待した効果が筋の単位では得られていることが判明した。また、従来 BTX では治療が不可能であった頸部ジストニアの患者において明らかな他覚所見・自覚症状の改善が見られ痙縮により歩行が不可能であった 1 例において杖歩行が可能となった。また全例において歩行速度が増加した。

D. 考察

抗体は毒素の重鎖成分親水基に結合することが判明し、筋萎縮性側索硬化症のための drug delivery system の開発のために不可欠なリコンビナントの重鎖を作成することに成功した。NTX は BTX に比して高い有効性と安全性を有することが示唆された。少数例ながら従来の治療法では治療不可能であった患者において日常生活上の動作の改善が認められた。今後さらに慎重に安全性を検討すると同時により重症の痙縮・ジストニア・その他不随意運動の治療を試みている根拠が得られた。

E. 結論

抗毒素抗体の認識抗原が重鎖であることを明らかにし、毒素有効成分 NTX は十分な安全性を持ち有効性においても従来のボツリヌス毒素製剤をしのぐ有効性・有用性が示唆された。drug delivery system の開発に必要なリコンビナント重鎖の精製に成功した。

F. 研究発表

論文発表

Yoneda, S., Shimazawa, M., Kato, M., Nonoyama, A., Torii, Y., Nishino, H., Sugimoto, N., Kozaki, S., and Hara, H. 2005. Comparison of the therapeutic indexes of different molecular forms of *Clostridium botulinum* type A. *European Journal of Pharmacology*, 508:223-229.

法を開発した (Infect. Immun. 71:1599-1603, 2003)。
この毒素の精製方法に関しては米国の特許を取得した (特開 2003-9897)

Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, D. W., Staats, H. F., Kiyono, H., McGhee, J. R., and Fujihashi, K. 2005. A novel botulinum neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. *J Immunol*, 174:2190-2195

Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y, Matsumura T, Kabumoto Y, Watanabe T, Ohyama T, Nishikawa A, and Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol.* 150: 1529-1538, 2004.

Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin SN, Mukamoto M, Murphy T, and Oguma K. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 496-502, 2004.

Nishikawa A, Uotsu N, Miura Y, Arimitsu H, Lee J, Fujinaga Y, Nakada H, Ohyama T, Sakano Y, and Oguma K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem. Biophysic Res. Communi.* 319: 327-333, 2004.

Hasegawa K, Watanabe T, Sato H, Sagane Y, Mutoh S, Suzuki T, Yamano A, Kouguchi H, Takeshi K, Kamaguchi A, Fujinaga Y, Oguma K, and Ohyama T. Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* serotype D 4947. *Protein J.* 23: 371-8, 2004.

N Murase, JC. Rothwell, R Kaji, R Urushihara, K Nakamura, N Murayama, T Igasaki, M Sakata-Igasaki, T Mima, A Ikeda and H Shibasaki: Subthreshold low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation over the premotor cortex modulates writer' s cramp. *Brain*, 128:104-115.

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許取得

HA がガラクトースに結合したことから、ラクトースゲルカラムを用いて神経毒素や神経毒素・無毒成分複合体を精製する簡単な方法、およびその保存方

図1 ラット後肢施注後の CMAP 変化

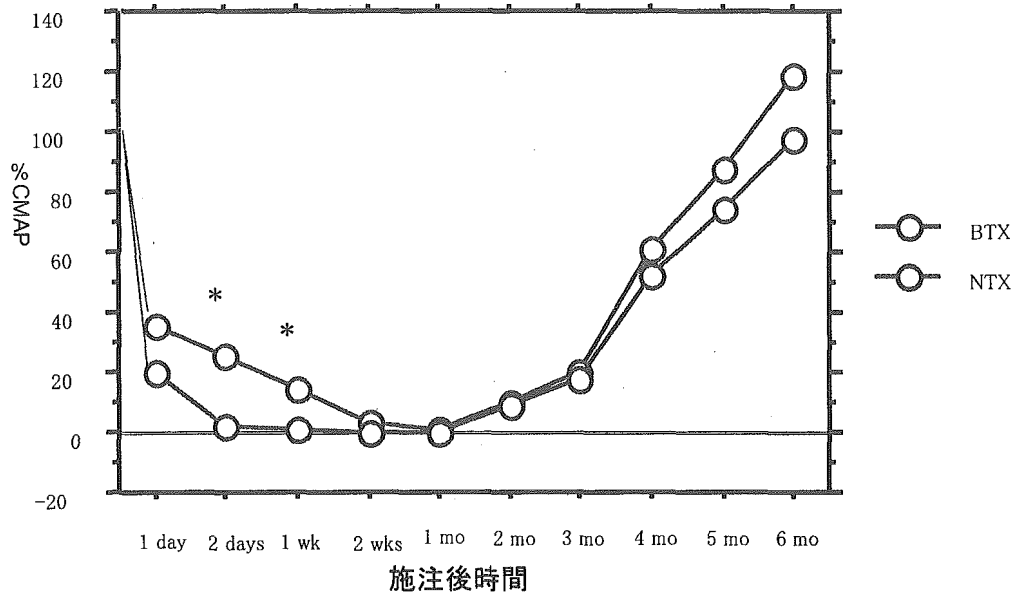


図2 ヒト正常者における EDB 施注後の CMAP (%) 変化

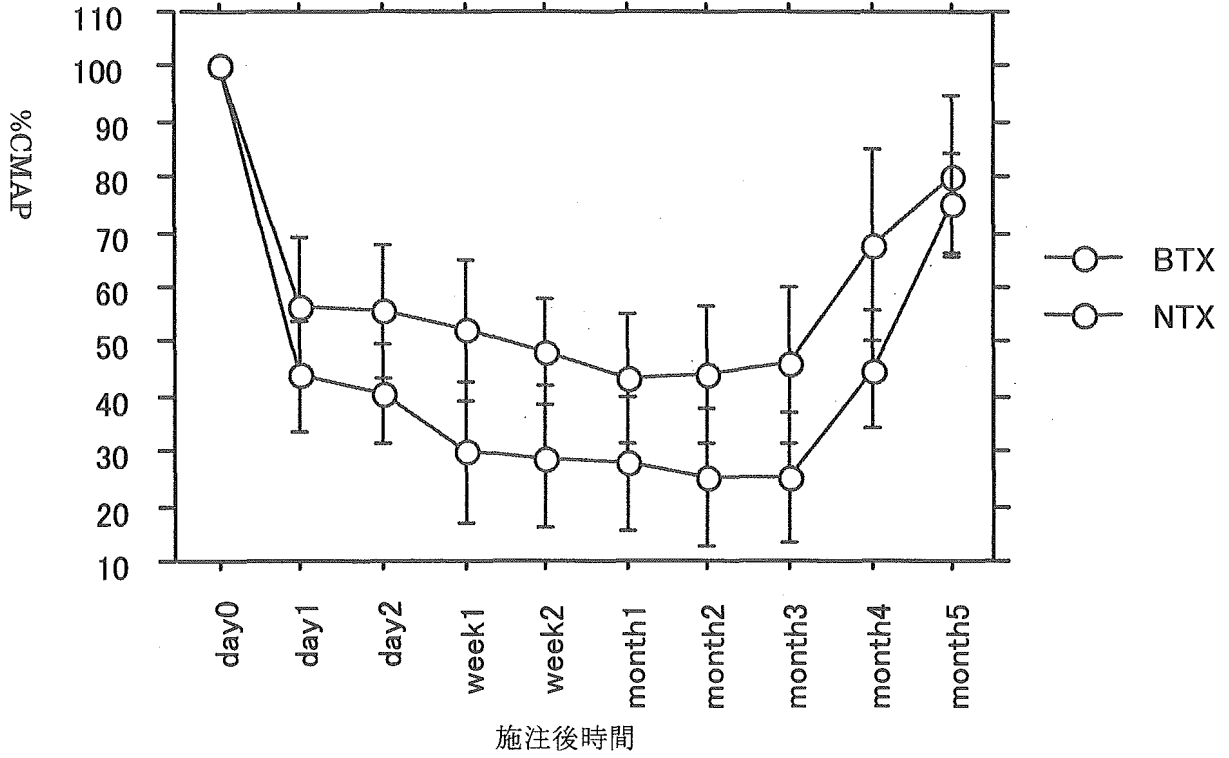


図3 痙縮患者における CMAP 変化と累積投与量

EDB:短指伸筋 GC:ひふく筋

