

平成21年 6月 21日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390126

研究課題名（和文）

バイオテロを含むボツリヌス中毒への新しい対策の確立と毒素の治療への応用

研究課題名（英文）

Establishment of new procedure for botulism including bioterrorism, and application of botulinum toxin to the treatment.

研究代表者

小熊 恵二（OGUMA KEIJI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00002262

研究成果の概要：

ボツリヌス菌や毒素、抗毒素抗体の検出方法と毒素の治療への応用を検討した。菌の検出法としては、A-F型毒素遺伝子を増幅できるPCRを開発した。毒素の検出法としてはイムノクロマト法を開発したが、現在、改良中である。抗体の検出法としては、毒素の一部を結合させたカラムを用いて抗体を濃縮して検出する方法を開発した。治療への応用としては、三叉神経痛と前立腺肥大症に適用できることをとラットを用いて実証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性、感染免疫、疫学、遺伝、分類、診断、構造・生理

研究開始当初の背景

近年、感染症の変遷およびバイオテロ対策の強化に伴い、新たなる感染症法が施行された。ボツリヌス菌および毒素は、この感染症新法ではバイオテロに悪用されうる代表的なものの一つとして挙げられている。また、ボツリヌス中毒は致命率の高い毒素型食中毒の代表例である。近年、発生数は少なくなったが、レトルト類似食品等を介した食中毒や原因不明の乳児ボツリヌス症は散発している。

バイオテロ対策および中毒の際の診断の為には、簡単に短時間で菌や毒素を証明できる方法が必須である。本研究ではこの点を検討した。他方、ボツリヌス毒素の致死量以下を皮下や筋肉内に注射し、眼瞼や顔面の痙攣、斜視、斜頸、その他の筋肉が過剰に興奮しているために生じる各種の疾患を治療することが試みられている。しかし、毒素の効果は数ヶ月であり、治療効果を継続するためには毒素を再注射しなければならない。現在治療

に用いられているのは神経毒素に無毒成分の結合した複合体である。私達は複合体毒素は神経毒素に比較し安定であるが、無毒成分の一つである赤血球凝集素 (HA) にはアジュバント活性があり、この毒素を接種し続けると抗毒素抗体が産生する可能性が高いことを認めた。従って治療には、複合体毒素よりも神経毒素単独で行う方が良いと考え、A および B 型神経毒素を簡単に精製する方法や、毒素活性を低下させずに長期に保存出来る方法を開発した。さらには、この A 型神経毒素を他の薬では治療出来ない尿失禁の患者数十名に接種すると、複合体毒素と同様に良い効果が得られることを認めた。今回はその他の疾患に対する応用を動物実験を中心に検討した。

2. 研究の目的

背景の項で記載したように、本研究では簡単に短時間で菌や毒素を証明できる方法、特に A-F 型の菌 (毒素遺伝子) や毒素を一度に検出できる方法の開発を試みた。

また、治療中に産生される微量の抗毒素抗体の検出方法の開発も試みた。さらには、毒素の治療への応用としては、前立腺肥大症と三叉神経痛に対して主にラットを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) A-F 型毒素遺伝子を検出する PCR の開発

ボツリヌス菌の DNA 塩基配列は AT リッチで、各型の神経毒素 (*ntx*) 遺伝子の配列の相同性が低いことから、A-F 型毒素遺伝子を一度に検出する PCR の開発は困難であった。しかし、相同性の高い領域も一部は認められることから、① *ntx* 遺伝子に対するミックスプライマーを用いて全型の *ntx* 遺伝子を検出

する、および、② *ntx* 遺伝子とポリシストロニックに転写されると考えられている non-toxic non-HA の遺伝子 (*ntnh*) を指標に、*ntx* 遺伝子の有無を確認する試みを行った。ClustalW 解析ソフトにより、A-F 型ボツリヌス菌の *ntx* 遺伝子及び *ntnh* 遺伝子のアライメントを作成し、相同性の高い領域に対して forward 及び reverse プライマーを数種類設計し、異なるプライマーペアで PCR の条件を検討した。鋳型に用いた DNA は、A 型菌 (3 株)、B 型菌 (3 株)、C 型菌 (有毒 : 3 株、無毒 : 4 株)、D 型菌 (3 株)、E 型菌 (1 株)、F 型菌 (5 株)、G 型菌 (1 株)、E 型菌 の近縁の *C. butyricum* (有毒 : 1 株、無毒 : 1 株) より単離した。

(2) 毒素検出用イムノクロマト法の開発

イムノクロマトに使用する抗体を得るために、型間で比較的相違性に富んだ領域である Hc の C-末端 50 kDa (Hc-50) のリコンビナントタンパク質を A-F 型について作製し、これを抗原としてウサギに免疫した。得られた抗血清から、硫安沈殿と DEAE-陰イオンクロマトグラフィーにより IgG を粗精製した後、これを検出用 (金コロイド標識) 抗体及びキャプチャー用 (固相化) 抗体として用いたイムノクロマトテストストリップを作製した。そして、それぞれのテストストリップの検出感度を、各型のボツリヌス菌培養液及び精製ボツリヌス progenitor 毒素を用いて測定した。

(3) 抗毒素抗体を検出する ELISA 法の開発

A 型毒素の Hc の C-末端約 50 kDa (A-Hc-50) の遺伝子を pET-32 Ek/LIC 発現ベクターにクローニングして、大腸菌内で A-Hc-50 リコンビナントタンパク質を発現させた。可溶性タンパク質として得られた His-trx (チオレドキシン) タグ融合 A-Hc-50 を、Ni-キレート

クロマトグラフィーと DEAE-陰イオンクロマトグラフィーにより精製した。この His-trx 融合 A-Hc-50 を bait として Ni-カラムに結合させ、これに抗毒素抗体を含む血清をアプライし、吸着・濃縮した後、イミダゾールにより抗毒素抗体を His-trx 融合 A-Hc-50 との複合体として溶出した。その後は結果の項に示したように ELISA を用いて抗体量を測定した。

(4) 毒素の治療への応用

毒素は末梢の運動神経の末端である神経・筋接合部、及び、副交感神経のシナプスで、それらの部位の伝達物質であるアセチルコリンの遊離を阻害する。しかし、最近では知覚神経を阻害するという報告もみられる。今回は三叉神経痛への効用を検討した。まずラットの三叉神経節を取り出しカバーグラス上で培養した後、KCl (75mM) の刺激により小胞から放出される伝達物質量を、membrane-uptake marker である FM4-64 の蛍光を測定することにより解析した。次いでこれに及ぼす A 型神経毒素 (10 ng/60 μ l) の効果を観察した。さらに、三叉神経痛への毒素の効用を、眼窩下の神経を圧迫して起こした三叉神経障害モデル (ラットは痛みの為、顔面への弱い圧刺激に対しても反応し逃れようとする) を使用し、圧迫した神経の末梢皮下に毒素 (100 pg/100 μ l) を接種した後の、三叉神経節よりの小胞性伝達物質の放出状態と、圧刺激に対する顔面逃避閾値を観察することにより判定した。

泌尿器科領域では、前立腺肥大症に効果があるとの報告もあるので、その点を検討した。A 型神経毒素 5 単位 (5MLD) をラットの前立腺に接種した後、1 週と 4 週目に前立腺を摘出し、組織切片を HE 染色の他、synaptophysin 陽性細胞の数を特異抗体を用いた免疫染色により、また、アポトーシスの有無を TUNEL

法により観察した。さらには、 α -ブロッカーが効かない 10 名の軽度の前立腺肥大症の患者に投与し、その効果を観察した。

4. 研究成果

(1) A-F 型毒素遺伝子を検出する PCR の開発

A-F 型毒素遺伝子を増幅できる PCR 用のプライマーを 2 種類 (2 セット) 開発した。1 つは non-toxic non-HA の特定の配列を利用し 500-600bp のプロダクトを得るものであるが、これでは F 型菌の一部において増幅されないものが認められた。2 つ目は神経毒素の軽鎖と重鎖の配列を利用し約 2,000bp のプロダクトを得る方法であるが、両領域は多少塩基配列が異なることから mix primer を開発したところ、上記の F 型菌も含め全ての菌でプロダクトが得られた。

(2) 毒素検出用イムノクロマト法の開発

Western 解析により各抗 Hc-50 抗体の特異性を調べたところ、型特異的に神経毒素を認識することが確認出来たので、これらの抗体を検出及びキャプチャー抗体として用いたイムノクロマトテストストリップを作製し、それらの検出感度を調べた。A 型用では 150 ng、C 型用では 150 ng、また D 型毒素用イムノクロマトは 100 ng の progenitor 毒素を検出することが出来た。また、A 型用では、キャプチャー用抗体として抗 A 型 16S・19S progenitor 毒素抗体を用いることで、検出感度を 50 ng まで上げることが出来た。一方、ELISA で測定された E 型及び F 型の抗 Hc-50 抗体のスペックは他の型と同程度であるにもかかわらず、E 型及び F 型毒素用イムノクロマトは感度が悪く、現在改良を検討中である。

(3) 抗毒素抗体を検出する ELISA 法の開発
抗毒素抗体を含む血清を、His-trx 融合 A-Hc-50 リコンビナントタンパク質を固定化した Ni-NTA ビーズにアプライした後、イミダゾールにより抗毒素抗体を His 融合 A-Hc-50 との複合体として溶出した。次いで、抗 IgG 抗体をコーティングした ELISA プレートにこの溶出液を反応させた後、HRP 標識抗 His 抗体を用いて検出を行った。

段階希釈した 2 種類のウサギ抗血清、i) 抗 A-Hc 抗血清、ii) 抗 A-16S/19S 抗血清を用いて実験を行ったところ、抗毒素抗体は、His-trx タグ固定化 Ni-NTA (ネガティブコントロール) には結合せず、His-trx タグ融合 A-Hc 固定化 Ni-NTA にのみ特異的に結合することが示された。また、ELISA の結果は、アプライ量に応じて、抗毒素抗体をアフィニティーキャプチャー出来ることが判明した。

(4) 毒素の治療への応用

ラットの三叉神経節を取り出し、KCl(75mM)の刺激により小胞から放出される伝達物質量を測定したところ、コントロール神経節では刺激により遊離が観察され、刺激開始 40 秒後においては、蛍光輝度で 22%の低下が記録された。それに対して、ボツリヌス毒素で処理することにより蛍光輝度の変化は 8%と有意に減少することが認められた。また、三叉神経障害ラットモデルでも、毒素接種により小胞性の伝達物質の放出量が刺激開始 40 秒後において、27%から 15%に低下した。また、毒素接種により、14 日後の圧刺激に対する顔面部の逃避反射閾値が、23g から 30g に改善された。

前立腺への応用研究では、摘出されたラットの 前立腺 の 上 皮 中 に 存 在 す る synaptophysin 陽性細胞が減少し、前立腺が小さくなることを認めると共に、実際に 10

名の軽度の前立腺肥大症の患者に投与したところ、前立腺が縮小し症状の改善が認められた。

従って、毒素は三叉神経痛や前立腺肥大症に効果があると結論された。

(5) その他、

毒素や無毒成分、毒素の C 端側 5 万の領域の性状や、赤血球凝集素(HA)の構成成分である HA3 の 3 次構造やレセプターへの結合様式の解析や、ボツリヌス C2 毒素遺伝子が存在するプラスミドの全塩基配列の決定を行った。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Nishiyama Y, Yokoyama T, Tomizawa K, Okamura K, Lee L. C, Matsui H, Oguma K, Nagai A, Kumon H. The effects of purified newly developed botulinum neurotoxin type A in rat prostate. Urology (in press) 査読有り
- ② Sakaguchi Y, Hayashi T, Yamamoto Y, Nakayama K, Zhang K, Ma S, Arimitsu H, and Oguma K. Molecular analysis of an extrachromosomal element encoding the C2 toxin gene discovered in *Clostridium botulinum* type C. J Bacteriol. (in press) 査読有り
- ③ Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kuboki T, and Oguma K. Botulinum toxin type A (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. Neuroscience. 159: 1422-29. 2009. 査読有り
- ④ Nakamura T, Kotani M, Tonozuka T, Ide A, Oguma K, Nishikawa A. Crystal structure of the HA3 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C

- progenitor toxin. J Mol Biol. 385: 1193-206. 2009. 査読有り
- ⑤ Arimitsu H, Sakaguchi Y, Lee JC, Ochi S, Tsukamoto K, Yamamoto Y, Ma S, Tsuji T, and Oguma K. Molecular properties of each subcomponent in *Clostridium botulinum* type B haemagglutinin complex. Microb Pathog. 45: 142-9. 2008 査読有り
- ⑥ Matsumura T, Jin Y, Kabumoto Y, Takegahara Y, Oguma K, Lencer WI, and Fujinaga Y. The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. Cell Microbiol. 10: 355-364, 2008. 査読有り
- ⑦ Nakamura T, Tonozuka T, Idea A, Yuzawa T, Oguma K and Nishikawa A. Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. J. Mol Biol. 376: 854-867, 2008. 査読有り
- ⑧ Nakamura T, Tonozuka T, Kotani M, Kanae Obata K, Oguma K and Nishikawa A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the HA3 component of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin. Acta Cryst. F63, 1038-1040, 2007. 査読有り
- ⑨ Lee JC, Yokoyama T, Hwang HJ, Arimitsu H, Yamamoto Y, Kawasaki M, Takigawa T, Takeshi K, Nishikawa A, Kumon H, and Oguma K. Clinical application of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin purified by a simple procedure for patients with urinary incontinence caused by refractory detrusor overactivity. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51: 201-211, 2007. 査読有り
- ⑩ Suzuki T, Kouguchi H, Watanabe T, Hasegawa K, Yoneyama T, Niwa K, Nishikawa A, Lee JC, Oguma K, Ohyama T. Effect of nicking the C-terminal region of the *Clostridium botulinum* serotype D neurotoxin heavy chain on its toxicity and molecular properties. Protein J. 26: 173-181, 2007. 査読有り
- ⑪ Lee JC, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Yamamoto Y, Arimitsu H, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Tsuchiya T, and Oguma K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. Microbiol. Immunol. 51: 445-455, 2007. 査読有り
- ⑫ Hwang HJ, Lee JC, Yamamoto Y, Sarker MR, Tsuchiya T, Oguma K. Identification of structural genes for *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage particles. FEMS Microbiol. Lett. 270: 82-89, 2007. 査読有り
- ⑬ Matsumura T, Fujinaga Y, Jin Y, Kabumoto Y, Oguma K. Human milk SIgA binds to botulinum type B 16S toxin and limits toxin adherence on T84 cells. Biochem. Biophysic Res. Communi. 352: 867-872, 2007. 査読有り
- ⑭ Nakamura T, Takada N, Tonozuka T, Sakano Y, Oguma K, and Nishikawa A. Binding properties of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin to mucins. Biochim. Biophys. Acta. 1770 : 551-555, 2007. 査読有り
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 阪口義彦、林哲也、中山恵介、山本由弥子、馬少博、橋本夕佳、張凱、小熊惠二. C型とD型ボツリヌスC2毒素遺伝子をコードするプラスミドの解析. 第82回日本細菌学会総会. 2009. 3. 12~14. 名古屋
- ② Yoichi Kitamura, Yoshizo Matsuka, Yoshihiro Ishihara, Igor Spigelman, Yumiko Yamamoto, Wataru Sonoyama, Horoshi Kamioka, Takashi Yamashiro, Keiji Oguma and Takuro Kuboki. Botulinum toxin blocks neurotransmitter release from somata of rat neuropathic trigeminal ganglion neurons. The 6th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins. 2008. 4. 22-24. Italy
- ③ Yoshizo Matsuka, Yoichi Kitamura, Igor Spigelman, Rahena Akther, Yumiko Yamamoto, Wataru Sonoyama, Keiji Oguma and Takuro Kuboki. The effect of peripheral administration of botulinum toxin type A in rats with neuropathic

pain. The 6th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins, 2008. 4. 22-24. Italy

- ④ 小熊惠二, 横田憲治, 綾田 潔. ボツリヌス毒素および抗体の検出方法の開発. 第82回日本感染症学会総会. 2008. 4. 17-18. 島根
- ⑤ Keiji Oguma. *Clostridium botulinum* Structure of Progenitor toxin; structure and function of hemagglutinin (HA). 1st U. S. - Japan Medical Biodefense Research & Bioterrorism Symposium USA. 2007. 6. 11-13. Arlington, USA

[図書] (計 2件)

- ① 小熊惠二. 近代出版. 臨床と微生物 Vol. 135 No. 4. 2008. 353-358
- ② 小熊惠二. 共立出版. 構造生物学-ポストゲノム時代のタンパク質研究-2.7 各種不随意運動の治療に用いられている最強の毒素; ボツリヌス毒素. 2007. 113-124

[産業財産権]

○出願状況 (計 3件)

- ①名称: ボツリヌス毒素由来のポリペプチド及びボツリヌス毒素の検出方法
発明者: 小熊惠二
権利者: 同上
種類: 特許権
番号: 特願 2008-272678
出願年月日: 2008. 10. 23
国内外の別: 国内
- ②名称: ボツリヌス毒素由来のポリペプチドを有効成分として含む鎮痛作用を有する医薬組成物
発明者: 窪木拓男・小熊惠二
権利者: 同上
種類: 特許権
番号: 特願 2008-182218
出願年月日: 2008. 7. 14
国内外の別: 国内
- ③名称: ボツリヌス毒素成分HAを核酸の細胞内導入キャリアーとして利用する方法
発明者: (財) 科学及血清療法研究所・小熊惠二
権利者: 同上
種類: 特許権

番号: 特願 2007-251502
出願年月日: 2007. 9. 27
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小熊 惠二 (OGUMA KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00002262

(2) 研究分担者

横田 憲治 (YOKOTA KENJI)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号: 00243460

綾田 潔 (AYADA KIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 00379835

阪口 義彦 (SAKAGUCHI YOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 70403491

山本 由弥子 (YAMAMOTO YUMIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20403496

有満 秀幸 (ARIMITSU HIDEYUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 40367701

(3) 連携研究者

なし