

称号及び氏名	博士(獣医学) 鳥居 恭司
学位授与の日付	平成22年3月31日
論文名	複合筋活動電位 (CMAP) を用いたボツリヌス毒素および抗毒素の定量法の開発
論文審査委員	主査 小崎 俊司 副査 竹内 正吉 副査 岡田 利也 副査 向本 雅郁

論文要旨

緒論

ボツリヌス菌は偏性嫌気性グラム陽性の桿菌であり、耐熱性芽胞を形成する。菌は産生する毒素の抗原性の違いによりA~G型の7型に分類されている。毒素は神経筋接合部に作用し、アセチルコリン放出抑制により筋弛緩効果を呈する。ヒトに病原性を示すのはA、B、EおよびF型菌であり、CおよびD型は動物に中毒を引き起こす。ヒトのボツリヌス症は発症機序により、食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症などに分けられる。これらボツリヌス症の治療はウマの免疫血清を用いた抗毒素製剤が使用され、最近ではヒト抗血清由来のグロブリン製剤も使用されている。ボツリヌス毒素は特異的な神経作用を持つため、この活性を利用して眼瞼けいれん、斜頸、ジストニアなどの治療に使用されている。毒素の生物活性および抗毒素の中和抗体価の定量には、マウス腹腔内 (ip) LD₅₀試験法およびマウス中和試験法がそれぞれ標準法として用いられている。これらの試験法は、マウスの致死が評価基準であり、十分な精度を得るために多数のマウスが必要であることから、動物愛護の観点から問題となっている。

本研究では代替法を考える上で、毒素の持つ神経筋伝達抑制効果を直接測定できる試

験系として、臨床現場で各種神経疾患の診断に使用されている複合筋活動電位 (CMAP) に着目した。神経からの興奮は神経伝達物質により筋肉に伝達され、筋肉側が興奮し活動電位を呈して筋線維が収縮する。CMAP は筋線維の興奮時に生じる MUP (motor unit potential) の総和である。筋肉内に投与された毒素は神経筋接合部に作用し、神経伝達物質の放出を阻害し、筋肉への興奮伝達が遮断されるため CMAP 振幅が低下する。本研究では、毒素の活性および抗毒素の中和抗体価の測定に CMAP を応用し、精度の高い定量法を確立することを目的とした。

第 1 章 複合筋活動電位 (CMAP) によるボツリヌス毒素活性の測定

第 1 節 CMAP によるボツリヌス毒素の生物活性の定量

麻酔した 8 週齢の雌性 S/D 系ラットの脊柱を電気刺激し、左右腓腹筋筋腹の CMAP を測定した。A、B、C、C/D、D、E および F 型ボツリヌス神経毒素 (150kDa) をラットの左側腓腹筋に投与し、投与後 1、2、4、7 および 14 日に CMAP を測定した。その結果、CMAP 振幅はすべての型において毒素の用量に依存して低下した。各型毒素の投与後の CMAP 振幅を解析したところ、A、B、C、C/D および D 型毒素では投与後 1~14 日目まで回帰直線が得られ、E および F 型毒素は投与後 1~4 日目まで回帰直線が得られた。これらの結果は、毒素投与後長期間に渡り毒性の評価が可能であることを示している。マウス ip LD₅₀ 法は投与後評価するまで少なくとも 4 日間が必要であり、投与後 1 日目から評価できる CMAP 試験法は測定の迅速化が可能であることを示した。各型毒素における CMAP 試験法の測定感度を比較したところ、A、C、C/D および E 型毒素はそれぞれ 0.01、0.1、0.03 および 0.1 ip LD₅₀ 以上の投与で CMAP 振幅が低下した。マウス ip LD₅₀ 試験法の測定限界は 1 ip LD₅₀ であることから、これらの型の毒素については、マウス ip LD₅₀ 試験法よりも高感度に測定が可能であった。B、D および F 型毒素については、10、30 および 1 ip LD₅₀ 以上の投与で CMAP 振幅が低下し、マウス ip LD₅₀ 試験法と同等あるいはそれより感度が悪い結果となった。これらの結果は、マウスおよびラットの毒素に対する感受性の違いを示していると考えられた。

CMAP 試験法の再現性を確認するために、A 型毒素を用いてマウス ip LD₅₀ 試験法との試験精度を比較した。各試験法の試験の変動係数 (CV 値) を算出したところ、マウス ip LD₅₀ 試験法の CV 値は 11.5% であるのに対し、CMAP 試験法は 5.9% であった。既存の A 型ボツリヌス毒素製剤の生物活性測定の CV 値は、3.75% 以内であることが求められている。このために、マウス ip LD₅₀ 試験法ではこの基準を満たすためには 10 回以上の

測定を要するのに対して、CMAP試験法は3回の試験で十分である。従って、CMAP試験法は毒素の活性測定の際に使用する動物数の削減にも寄与できると考えられた。

第2節 各型ボツリヌス毒素の神経筋伝達抑制効果ならびに筋弛緩効果の比較

現在AおよびB型毒素は製剤化され、様々な神経疾患の治療に利用されている。C、EおよびF型毒素についても、臨床研究に関する報告があり、これらの型の毒素も同様に治療に有効であることが示されている。毒素を治療薬として使用する場合、投与部位のみ確実に効果を示し、他の部位への拡散（副作用）はできるだけ少ないことが望ましい。CMAPは投与側筋肉および非投与側筋肉を測定することが出来るため、各型毒素の有効性ばかりでなく副作用（拡散）を評価する手段として使用できると考えられる。各型毒素の薬効および全身性の拡散を評価するために、投与側および非投与側CMAPデータを測定し比較検討した。その結果、A型毒素が最も効果が強く、C/D、C、EおよびF型毒素は、B型毒素よりも効果が強かった。各型の非投与筋における神経筋伝達抑制効果について、非投与側のCMAP振幅を20%低下させるのに必要な毒素量（TD₂₀）を比較した。その結果、C/D型毒素は最も少ない量で非投与側のCMAPを低下させたが、D型毒素は最も多く毒素が必要であった。各型毒素の投与側での効果ならびに非投与側への拡散を同時に比較するために、TD₂₀/ED₅₀を安全域と定義したところ、C、D、EおよびF型毒素は、A型毒素よりも広い安全域を示した。以上の結果は、CMAP試験法が毒力の測定だけでなく、各型毒素の神経筋伝達抑制効果の特性を理解する上で有用であることを示している。各型毒素の神経筋伝達抑制効果と筋弛緩作用との相関性を調べるためにDigit abduction scoring assay（DAS assay）を用いて筋弛緩効果を測定した。A、CおよびC/D型毒素の筋弛緩効果は最も強く、E型およびF型毒素の筋弛緩効果はB型毒素よりも強いことが明らかになった。神経筋伝達抑制効果および筋弛緩作用の関係については、C型以外の型で、各効果の強さはそれぞれ相関していた。C型毒素については、神経筋伝達抑制効果はAおよびC/D型毒素よりも弱い、筋弛緩効果はA型毒素と同等であった。これは、C型毒素が他の型の毒素とは異なり、直接筋肉に作用するなどの他の作用機序を介して筋弛緩効果を促進する可能性が示唆された。

第2章 CMAPを用いたボツリヌス抗毒素の定量

治療用毒素の頻回投与による効果減弱が数多く報告されている。効果減弱の原因として、毒素に対する中和抗体の出現が考えられている。患者血清に含まれる毒素中和抗体

の定量は、標準法であるマウス中和試験法により行われているが、その測定限界は 10～100 mU/mL と報告されている。しかしながら、毒素の治療効果の減弱は、マウス中和試験法の測定限界値よりも少ない抗体量を血中に含有することで生じていることが推測されている。従って、中和抗体により毒素の治療効果が減弱していると診断するためには、高感度な測定系の開発が必要である。そこで、前章で確立した CMAP を用いて抗毒素の中和抗体価の測定を試みた。A、B、E および F 型の標準抗毒素を各型試験毒素と反応させ、反応液をラット左側腓腹筋に投与し、投与後 1 日目の CMAP を測定した。その結果、投与後 1 日目の CMAP 振幅の変化には、抗体量に応じた用量反応性が認められた。A、B、E および F 型の抗毒素の作用にはそれぞれ、1、25、1 および 3 mU/mL まで直線性が認められ、すべての型の抗毒素でマウス中和試験法よりも高感度の測定が可能であった。また、投与後 1 日目で早期に抗体価測定ができることも明らかにした。

実際に患者血清中に存在する微量な抗体を実際に測定できるか検討するため、7 名の A 型ボツリヌス毒素治療不応答患者の血清を用いて、マウス中和試験法および CMAP 中和試験法により中和抗体価を測定した。その結果、マウス中和試験法では 1 名のみ抗体陽性が認められたのに対し、CMAP 中和試験法ではすべての患者の血清中から 3～50 mIU/mL の抗体が検出され、治療効果の減弱の原因は予想どおり毒素を抗原として産生された中和抗体であると考えられた。

CMAP 中和試験法は、マウス中和試験法よりも高感度に測定可能であり、患者の治療において投与量の変更、あるいは他の型の毒素製剤への変更を検討するのに有用であることが示された。

総括

CMAP 試験法および CMAP 中和試験法は標準法であるマウス ip LD₅₀ 試験法およびマウス中和試験法よりも以下の利点があることが示された。

1. 毒素の生物活性測定 (A、C、C/D および E 型) および中和抗体価測定において、標準法よりも高感度である。
2. 標準法による毒素の生物活性あるいは中和抗体価を判定するのに 4 日かかるのに対し、CMAP 試験法および CMAP 中和試験法は投与後 1 日目に評価できる。
3. 再現性に優れていることから、試験回数を標準法よりも減少できる。
4. 標準法が 1 試験につき 100 匹以上のマウスを使用するのにに対し、CMAP 試験法お

よび CMAP 中和試験法は 20～30 匹のラットで測定が出来る。このため、動物数の削減に寄与できる。

5. 毒素の生物活性測定および中和抗体価測定において、投与する毒素量は筋肉の麻痺まで至らないため、動物の運動機能を低下させることはない。さらに測定は麻酔下で行うため、動物に与える苦痛も少ない。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌は偏性嫌気性グラム陽性の桿菌であり、耐熱性芽胞を形成する。菌は産生する毒素の抗原性の違いによりA～G型の7型に分類されている。毒素は神経筋接合部に作用し、神経伝達物質の放出を特異的に抑制することにより筋弛緩効果を引き起こす。この特異的な神経作用を利用して、毒素は眼瞼痙攣、斜頸などジストニアの治療薬として使用されている。一般に毒素の生物活性および抗毒素の中和抗体価の定量には、マウスの致死を評価基準とするマウス腹腔内 (ip) LD₅₀試験法およびマウス中和試験法が標準法として用いられているが、十分な精度を得るために多数のマウスが必要である。本研究では、これらの代替法として毒素の神経筋伝達抑制効果を直接測定でき、各種神経疾患の診断に使用されている複合筋活動電位 (CMAP) に着目し、これを毒素活性および抗毒素の中和抗体価測定に応用することで精度の高い定量法を確立することを目的とした。

CMAPによる毒素活性を測定するために、ラットの左側腓腹筋にA、B、C、C/D、D、EおよびF型ボツリヌス神経毒を投与し、1、2、4、7 および 14 日後に活動電位を測定した。その結果、CMAP振幅はすべての型において毒素の用量に依存して低下した。各型毒素によるCMAP振幅低下を調べたところ、投与後1日目から回帰直線が得られた。マウス ip LD₅₀法の毒素活性測定には4日間必要であることから、CMAP試験法により測定の迅速化が図れることがわかった。A、C、C/DおよびE型毒素はそれぞれ0.01、0.1、0.03 および 0.1 ip LD₅₀以上の投与でCMAP振幅が低下したことから、マウス ip LD₅₀試験法よりも高感度に測定が可能であった。次にA型毒素を用いてマウス ip LD₅₀試験法との試験精度を比較した。マウス ip LD₅₀試験法の変動係数 (CV値) は 11.5%に対し、CMAP試験法は 5.9%

であった。毒素製剤の生物活性測定_{のCV値は3.75%以内であることが求められていることから、}マウス ip LD₅₀試験法では10回以上の試験が必要であるが、CMAP試験法は3回の試験で十分であり動物数の削減が可能であることを明らかにした。

CMAPは投与側筋肉および非投与側筋肉で測定することが出来るため、各型毒素の副作用（拡散）の評価が可能である。各型毒素の薬効評価（ED₅₀）では、A型毒素が最も効果が強かった。各型毒素の非投与側のCMAP振幅を20%低下させるのに必要な毒素量（TD₂₀）を比較した結果、C/D型毒素が最も少ない量で非投与側のCMAPを低下させたが、D型毒素は最も多く毒素が必要であった。各型毒素の投与側での効果ならびに非投与側への拡散を同時に比較するために、TD₂₀/ED₅₀を安全域と定義したところ、C、D、EおよびF型毒素は、A型毒素よりも広い安全域を示した。各型毒素の神経筋伝達抑制効果と筋弛緩作用との相関性を調べるためにDigit abduction scoring assay（DAS assay）を用いて筋弛緩効果を測定した。A、CおよびC/D型毒素の筋弛緩効果は最も強く、E型およびF型毒素の筋弛緩効果はB型毒素よりも強いことから、CMAP試験法との間に相関性が認められた。

治療用毒素の頻回投与による効果減弱が数多く報告され、その原因として毒素に対する中和抗体の出現が考えられている。そこで標準抗毒素と試験毒素の反応液をラット左側腓腹筋に投与し、投与後1日目のCMAPを測定した。その結果、抗体量に応じた用量反応性が認められ、A、B、EおよびF型抗毒素はそれぞれ、1、25、1および3 mU/mLまで測定が可能であった。実際に患者血清中に存在する微量な抗体を測定できるかを検討するため、A型毒素治療不応答患者の血清を用いて、マウス中和試験法およびCMAP中和試験法により中和抗体価を測定した。その結果、マウス中和試験法では1名のみ抗体陽性が認められたのに対し、CMAP中和試験法ではすべての患者の血清中から3~50 mU/mLの抗体が検出され、治療効果の減弱の原因は予想どおり毒素に対する中和抗体の出現であると考えられた。

以上の結果から、CMAP試験法は標準法であるマウス ip LD₅₀試験法より優れた再現性を有し、高感度で毒素活性、抗体価の測定が可能であり、動物福祉の面でも動物数の削減を図れる有用な方法であることを示した。本論文の成果は、細菌毒素学および毒素の治療薬への応用に大きく貢献すると考えられ、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。