

ボツリヌス毒素の特徴、治療への応用と分析法

Characteristics, therapeutic application, and analytical methods of botulinum toxins

鳥居 恭司
Yasushi Torii

東京農業大学農学部動物科学科 教授
Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture (Professor)

KEYWORD ▶

ボツリヌス毒素

ボツリヌス毒素療法

ボツリヌス毒素の分析法

はじめに

01

ボツリヌス毒素はグラム陽性偏性嫌気性細菌である *Clostridium botulinum* および関連する細菌種によって産生されるタンパク毒素であり、ヒトや動物で致死性のボツリヌス症を引き起こす。毒素は抗原性の違いによりA-G型の7つの血清型に分類される。本毒素は自然界で最も強力な毒性を持っているが、微量を投与することで様々な疾患の治療に有用である。今回、ボツリヌス毒素の特徴、治療への応用、毒素の分析法について紹介する。

ボツリヌス毒素について

02

2-1. ボツリヌス毒素の性状

ボツリヌス毒素は毒作用の本体である分子量150 kDaの神経毒素と分子量の異なる無毒成分が結合した複合体毒素の形で、菌体が溶菌する際に放出される。無毒成分は複数のタンパク質から構成され、その組み合わせにより分子量が異なる。複合体毒素にはM毒素(約300 kDa)、L毒素(約500 kDa)およびLL毒素(約900 kDa)の3種類がある¹⁾。A型菌は3種類の毒素を、B、C、D型菌はMおよびL毒素を、E、F型菌はM毒素のみを、G型菌

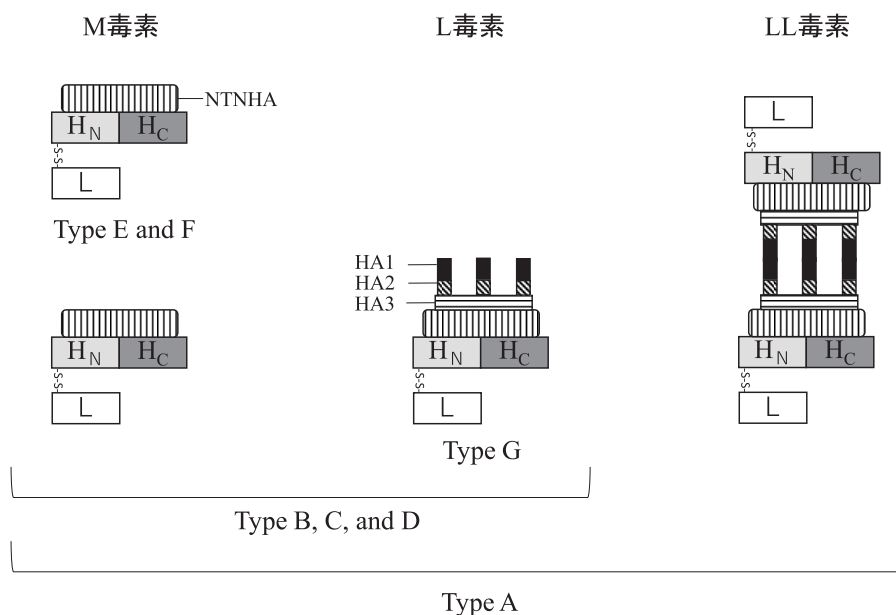


図1 ボツリヌス毒素の構造

L:毒素軽鎖、H_N:毒素重鎖N末端側領域、H_C:毒素重鎖C末端側領域
NTNHA:無毒成分、HA:血球凝集素

はL毒素のみをそれぞれ産生する(図1)。M毒素は神経毒素に血球凝集素を持たない無毒成分であるNTNHA(non-toxic non-hemagglutinin)が直接結合する。L毒素はM毒素のNTNHAに血球凝集素(hemagglutinin: HA)が結合している。NTNHAに結合するHAはHA1、HA2およびHA3の3つのコンポーネントから構成されている。また、LL毒素はHA3の部分で2つのL毒素が結合した構造をしている。

神経毒素は菌体内で150 kDaの1本鎖のポリペプチドの形で産生される。AおよびB型菌において、神経毒素は同時に産生されるタンパク分解酵素により培養液中で毒素分子内に開裂が生じ、50 kDaの軽鎖および100 kDaの重鎖の2本鎖構造に変化する。このとき、毒素の活性が数倍から数百倍に上昇する活性化現象が認められる。タンパク分解酵素を産生しないE型菌の神経毒素は未活性で産生されるが、毒素が腸管内に到達するとトリプシンのような消化酵素により活性化され、2本鎖構造に変化することで毒性を発現する。毒性の発現には神経毒素全体が必要であることが分かっている。実験的に軽鎖と重鎖を還元処理して分離した場合、単離された軽鎖、重鎖はそれぞれ動物に対して毒性を示さない。

神経毒素は3つのドメインから構成されていることが結晶構造の解析から明らかとなっている。これらのドメインは毒素が神経細胞に特異的に結合し、細胞内侵入、細胞質内への移行、細胞質内の標的タンパク質の修飾など、一連の毒性発現過程でそれぞれ機能を持つ。軽鎖は細胞質内での毒素発現活性、重鎖N末端側領域(H_N)には細胞内以降に関わる脂質二重膜にチャネル形成を行う活性、重鎖C末端側領域(H_C)には受容体への結合活性があることから、それぞれ毒性ドメイン、チャネル形成ドメイン、結合ドメインと呼ばれている。H_Cは毒素の受容体であるポリシアログングリオシド(PSG)および神経タンパク質受容体への結合に関

与する。 H_{10} は軽鎖が細胞質内に入るまで活性を保持するのに機能している。軽鎖は活性中心に亜鉛が結合しているメタロプロテアーゼである。

ボツリヌス毒素は血清型で分類されているが、近年の分子遺伝学による研究により同じ血清型の菌でも産生する神経毒素のアミノ酸配列が有意なレベルで違いがあることが明らかとなった。これはサブタイプと呼ばれ、現在41のサブタイプが特定されている、例えばA型ではA1-A8の8つのサブタイプに分かれており、サブタイプ間の神経毒素のアミノ酸配列は3-15%の違いが認められている²⁾。このような毒素のアミノ酸配列の違いは標的細胞への結合、細胞への侵入効率、軽鎖の活性、効果の持続時間、サブタイプ間の特異抗体に対する中和効率などに違いを生じさせることが明らかになっている。

CおよびD型については、CおよびD型毒素をそれぞれ産生する菌だけでなく、軽鎖およびH_NはC型、H_CはD型に非常に類似したアミノ酸配列であるC/Dモザイク毒素を産生するC/D型菌、軽鎖およびH_NはD型、H_CはC型に非常に類似したアミノ酸配列であるD/Cモザイク毒素を産生するD/C型菌が存在している。また、新型の血清型毒素としてH(F/A)型が報告されたが、軽鎖はF5型、重鎖はA型に非常に類似したアミノ酸配列であるF/A型毒素を産生することが明らかになっている³⁾。

2-2. ボツリヌス神経毒素の神経筋接合部における作用メカニズム

神経毒素は神経筋接合部に非常に特異的に作用する。神経毒素による作用メカニズムは、①神経終末への結合、②エンドサイトーシス、③小胞内の酸性化、④軽鎖の細胞質内への移行、⑤SNAREの切断による神経伝達物質の放出阻害の5つの段階に分けられる(図2)^{1, 4)}。

腸管から吸収あるいは注射によって体内に入った毒素は神経

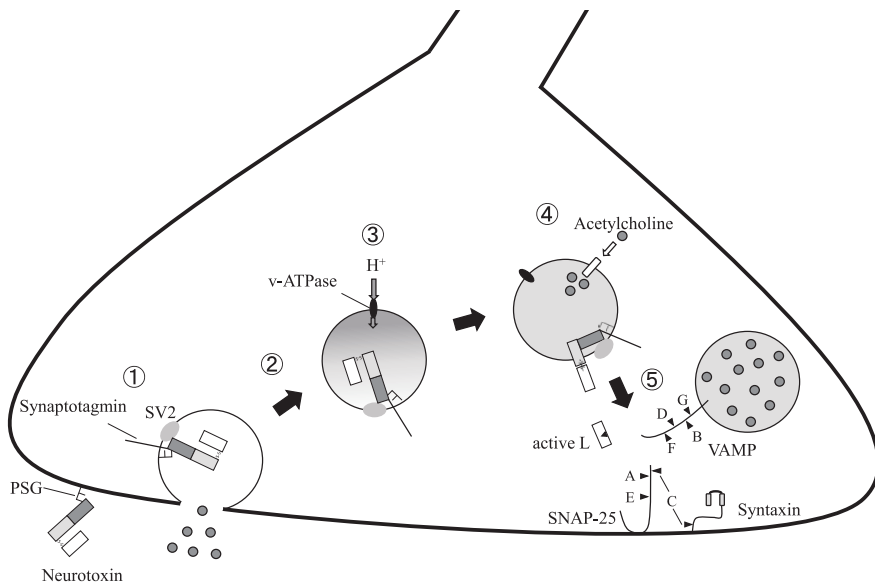


図2 ボツリヌス毒素の神経終末での作用メカニズム

- ① H₂領域はシナプス前膜のポリシアロガングリオシド(PSG)受容体に結合し、続いてタンパク質受容体に結合する。
- ② 毒素はシナプス小胞内に取り込まれる。
- ③ v-ATPaseによる小胞の酸性化(灰色化)が神経伝達物質の蓄積を促進する。
- ④ 毒素のプロトン化により、軽鎖はH₂領域の助けを借りて細胞質へ膜移行する。
- ⑤ 細胞質において、軽鎖はメタロプロテアーゼ活性を示す。B型、D型、F型、G型毒素はVAMPを切断し、A型およびE型毒素はSNAP-25を切断し、C型毒素はSNAP-25とシンタキシンの両方を切断する。

周囲液区画に到達し、毒素のHcが神経終末のシナプス前膜のPSGに結合する。その後、シナプス小胞の神経伝達物質の開口放出の際に、小胞とシナプス前膜の融合が起こると小胞内腔が細胞外に露出され、小胞内腔に存在する神経タンパク質受容体に毒素のHcが結合する。神経タンパク質受容体は、A、D、EおよびF型毒素はシナプス小胞タンパク質2 (SV2)、BおよびG型はシナプトグミンであることが明らかになっている。C型は神経タンパク質受容体が認められておらず、PSGとの相互作用が報告されている⁵⁾。

シナプス小胞内の受容体に結合した毒素はエンドサイトーシスによって神経細胞内に取り込まれる。軽鎖の細胞質内への移行はv-ATPaseプロトンポンプにより小胞内が酸性化(pH4.5-6)されることによって生じ、H_Nが小胞の膜と結合してチャネルを形成する。軽鎖はこのチャネルを介して膜を貫通して神経細胞の細胞質内に移行する。この細胞質内への移行時に軽鎖とH_NのS-S結合が還元され、軽鎖が分離される。

軽鎖はシナプス小胞内の神経伝達物質をシナプス前膜から放出する際に必要なSNAREタンパク質を特異的に分解する。SNAREタンパク質はシナプス小胞に存在しているv-SNAREとシナプス前膜に存在しているt-SNAREに大きく分けられる。このv-SNAREとt-SNAREが結合し、トランスSNARE複合体を形成し、融合孔を形成することでシナプス小胞内の神経伝達物質が放出される。軽鎖が切断するSNAREタンパク質は毒素型によって異なり、AおよびE型はt-SNAREの一種のSNAP-25を、B、D、FおよびG型はv-SNAREの一種のシナプトブレビン (Vesicle-associated Membrane Protein :VAMP) を、C型はt-SNAREの一種のSNAP-25およびシンタキシンをそれぞれ切断する。軽鎖はSNAREタンパク質を切断することで、SNARE複合体の形成を阻害し、結果としてシナプス小胞から神経伝達物質の放出が阻止される。

ボツリヌス毒素は近年の研究により、運動神経の神経筋接合部だけでなく、筋紡錘に対して脊髄への求心性は線維の興奮を減少させる作用⁶⁾、感覚神経への作用^{7, 8)}、中枢神経への作用^{9, 10)}など様々な作用を持つことが報告されている。

ボツリヌス毒素の治療への応用

03

3-1. ボツリヌス毒素製剤の開発の歴史と現在

ボツリヌス毒素の治療への応用の構想は1822年にドイツの詩人で地区の医務官であったJustinus Kernerが始めに報告したとされている。Kernerはソーセージによるボツリヌス症の研究から、ボツリヌス症を引き起こした毒素(当時は同定されていなかった)が運動・自律神経系の興奮を軽減・遮断することから、この毒素を少量用いることで、「交感神経(当時の概念では神経機能全般を示す)の過剰活動・過興奮性」また「発汗の亢進および粘液の異常分泌」をおさえることが出来ると考えた¹¹⁾。この毒

素は強力な毒性から、第二次世界大戦中にはアメリカをはじめとする各国で生物兵器として研究された。アメリカではアメリカ陸軍施設で研究が行われ、1946年にCarl LamannaがHall株由来のA型ボツリヌス毒素の結晶化を報告した。さらに第二次世界大戦後の1957年にJames Duffが毒素精製法の改良を報告し、Edward Shantzが大量生産させる方法を見いだした。1965年にDaniel Drachmanがヒヨコの筋肉にShantzの毒素を投与すると麻痺および萎縮を示すことを報告した。この報告を受けて眼科医のAllan Scottはこの毒素が斜視の治療に使用出来るのではないかと考えてShantzと共同研究をはじめ、1960～70年代に多くの研究がなされた。それらの研究を受けて1979年にアメリカ食品医薬品局(FDA)は毒素の臨床試験の承認を行った。1980年にScottは斜視患者に対する毒素の治療成績を発表し、その後も眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、頸部・体肢のジストニアなどに対しても治療を試みた。1989年にFDAはA型ボツリヌス毒素(Oculinum[®] 現在のBotox[®](AbbVie社))を斜視、眼瞼痙攣、12歳以下の片側顔面麻痺の治療薬として承認した。その後ボツリヌス療法が世界中で急速に普及し、2017年8月現在Botox[®]は90カ国以上で販売されている。当初はShantzが製造した毒素を使用していたが、普及するにつれ毒素に対する中和抗体産生や薬理効果が無効になる患者が認められるなどの問題が生じた。このため、2度にわたって製法を改良し現在では当初の約5倍タンパク比活性が高い製剤(4.8 ng/100 U)となっている。また、他社でもボツリヌス毒素製剤が開発され販売されている。ヨーロッパではイギリスでCentre for Applied Microbiology and ResearchでA型毒素が開発され1990年にヨーロッパでDysport[®](Ipsen社)が承認されて2022年現在90ヶ国以上で販売されている(日本国内未承認)。Botox[®]およびDysport[®]は複合体毒素であり、NTNHAおよびHAが含まれている。ドイツのMerz社はBotox[®]の当初の問題であった毒素に対する中和抗体産生、効果無効事例の低減を目指して、神経毒素のみ(150 kDa)を製剤としたXeomin[®]を開発し、2005年にドイツで承認され、現在世界各国で使用されている。その他A型毒素として、中国では蘭州生物製品研究所が衡力[®] BTXA、韓国ではMedytox社のMeditoxin[®]、Hugel社のBotulax[®]、Daewoong社のNabota[®]、ロシアではMicrogen社のRelatox[®]などが開発されている¹⁸⁾。B型毒素については、アイルランドのElan社が開発し、2000年にFDAからMYOBLOC[®]、2001年にヨーロッパでNeuroBloc[®]の名前で承認された(日本国内における販売名はNerBloc[®])。B型毒素はA型毒素に対する効果無効事例の患者にも有効であると考えられる。また、B型毒素は自律神経に対する効果および鎮痛作用が、運動神経に対する効果に比べて比較的大きいとされている。しかし、ヒトはB型毒素に対する感受性が低いため、Botox[®]との比較では多くの毒素量が必要になる。現在、日本国内において販売されているボツリヌス毒素製剤はBotox[®]/Botox Vista[®]、Xeomin[®]およびNerBloc[®]である。それぞれの製剤の特徴を表1に記載した。

現在世界で治療薬として販売されている毒素はA型ではA1

型、B型ではB1型の毒素である。日本国内において、A1型とはアミノ酸配列の異なるA2型の毒素を使用した製剤が開発中である。このA2型毒素製剤は神経毒素のみ(150 kDa)の製剤であり、サルを用いた試験ではA1型毒素よりも筋弛緩効果が強く、安全性に優れている結果が得られている¹²⁾。ヒトにおいても臨床研究として痙攣患者にA1あるいはA2型毒素を投与したところ、A2型毒素はA1型毒素よりも効果が強く、投与部位に留まりやすいという結果が得られている¹³⁾。今後、開発が進み治療に応用されていくと考えられる。

それ以外の血清型の毒素がヒトの治療で使用出来るか複合筋活動電位を用いて検討された¹⁴⁾。その結果、C型毒素はA型毒素と同様の神経筋伝達抑制効果および作用期間を持ち、EおよびF型毒素は早期に神経筋伝達抑制効果がなくなり回復することが明らかとなった。C型毒素は今後A1毒素同様に筋弛緩効果による治療薬として開発される可能性がある。また、E型毒素については、脳内投与による中枢神経への効果(てんかん等)が認められており、治療に応用される可能性がある。

3-2. ボツリヌス毒素製剤の薬理作用の発現と消失

毒素は筋肉内に投与されると直ちに神経終末への取り込みが

始まり、数時間以内に大部分が神経終末に取り込まれる。薬理作用は神経終末に取り込まれた後に徐々に発現し、臨床効果として確認出来るのは2-3日後であることが多い。臨床効果は投与から1-2週間で安定し、A型毒素製剤の場合数ヶ月間持続する。なお、高温環境では効果が低下することが報告されている。以前は毒素が作用した神経終末は永久に機能を失い、近傍から側枝が出て新たな神経筋接合部が形成されることで機能回復が生じると考えられていた。しかし、現在では元の神経接合部が再開通し、一時的に形成され機能を代行していた神経筋接合部はその後退縮して失われることが明らかとなっている。

筋弛緩効果の持続期間は毒素型、投与量、投与神経部位によって異なり、毒素型ではA型～C型>B型～D、F、G型>E型の順に効果の持続が長いと報告されている^{1, 14, 15)}。E型毒素の持続時間が短いのはE型毒素の軽鎖の神経細胞内半減期が1-2日であり、新しいSNAP-25が合成されると効果がなくなることが要因とされている。A型毒素の軽鎖は神経細胞内の分解酵素を回避する作用を持っていることで効果の持続が長く続くとされている。A型毒素の軽鎖の活性は*in vitro*の神経細胞では最大1年間、*in vivo*の中枢神経では最大5ヵ月持続する。投与量については、より多く用量を投与することで細胞内に多くの軽鎖が取り込

表1 日本国内で承認されているボツリヌス毒素製剤の比較

	Botox [®] / Botox Vista [®]	Xeomin [®]	NerBloc [®] (MYOBLOC [®] / NeuroBloc [®] *)
一般名	OnabotulinumtoxinA	IncobotulinumtoxinA	RimabotulinumtoxinB
メーカー名	AbbVie (USA)	Merz (Germany)	US WorldMed (USA)
菌株	Hall A	Hall A	Bean
毒素型	A1	A1	B1
分子量	900 kDa complex	150 kDa	700 kDa complex
製剤形態	Vaccuum-dried powder for reconstitution	Freeze-dried powder for reconstitution	Ready to use solution
保存温度と有効期間	2-8℃ 36 months	Room temperature 36 months	2-8℃ 24 months
pH	7.4	7.4	5.6
賦形剤	In 100 U vial: HSA 500 µg NaCl 900 µg	In 100 U vial: HSA 1 mg Sucrose 5 mg	HSA 500 µg Succinate 10 mM NaCl 100 mM
Unit/ vial	50, 100	50, 100, 200	2500 (1000, 2500, 10000 ^{*)})
タンパク量/ vial	4.8 ng / 100 U	0.44 ng / 100 U	55 ng / 2500 U
Clinical activity in relation to Botox	1	1	1:40-1:50

HSA: human serum albmin
*1 USAあるいはEUの製品名
*2 USAとEUの製品

まれ、持続時間が長くなると考えられる。また、投与神経部位については、A型毒素を骨格筋に投与した場合3-4ヵ月持続するのに対し、自律神経系コリン作動性神経終末は約1年持続すると報告されている¹⁾。

3-3. ボツリヌス毒素治療の適応症

ボツリヌス毒素による治療は神経内科領域を中心に応用が拡大しており、近年では泌尿器科、皮膚科領域など様々な疾患の治療に用いられている¹⁾。日本国内で承認されている治療薬は、A型毒素のBotox[®] (Botox Vista[®]を含む)、Xeomin[®]、B型毒素のNerBloc[®]である。適応症は①骨格筋緊張亢進症、②平滑筋緊張亢進症、③分泌腺の緊張亢進症、④美容、⑤痛み到大別される(図3)。①骨格筋緊張亢進症は、多くの運動異常症が含まれており、海外では臨床研究として様々な疾患の治療に使用されている。日本国内では一部の疾患について承認され保険適応で使用されている。Botox[®]では眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙攣性斜頸、上肢痙縮、下肢痙縮、2歳以上の脳性麻痺患者における下肢痙縮に伴う尖足、斜視および痙攣性発声障害について承認されている。Xeomin[®]は上肢痙縮、NerBloc[®]は痙攣性斜頸で承認されている。その他の疾患として、ジストニア、振戦、書痙、舞蹈病などの不随意運動などにも効果が認められるとの報告がある。②平滑筋緊張亢進症については、消化管や尿路についての疾患で使用

されている。こちらも日本国内では一部の疾患について承認され、Botox[®]では過活動膀胱における尿意切迫感・頻尿および切迫性尿失禁、神経因性膀胱による尿失禁について承認されている。その他の疾患として、前立腺肥大、アカラシアなどにも効果が認められるとの報告がある。③分泌腺の緊張亢進症については、日本国内ではBotox[®]で重度の原発性腋窩多汗症で承認されている。その他、手掌の多汗症、唾液分泌過多症などにも効果が認められるとの報告がある。④美容については、1987年に「顔面の皺」を目立たなくする効果が発見され、現在では美容目的の使用がボツリヌス毒素製剤の非常に大きい市場となっている。日本国内ではBotox Vista[®]が眉間・目尻の表情皺に対する投与で承認されているが、保険適用外である。その他の前額部の皺、咬筋(えらの張り)の萎縮、腓腹筋の萎縮などにも効果があり使用されている。この分野については医師による個人輸入で海外の様々な製剤が使用されている。⑤痛みについては、頸部ジストニアの治療事例で報告され、筋緊張異常症に合併する痛みの緩和に効果があることが明らかとなった。その後、緊張型頭痛、片頭痛などの治療にも応用されるようになり、片頭痛についてはアメリカでは治療薬として承認されている。その後様々な疾患で臨床研究が行われており、背部痛、神経因性疼痛、三叉神経痛などにも効果が認められるとの報告がある。

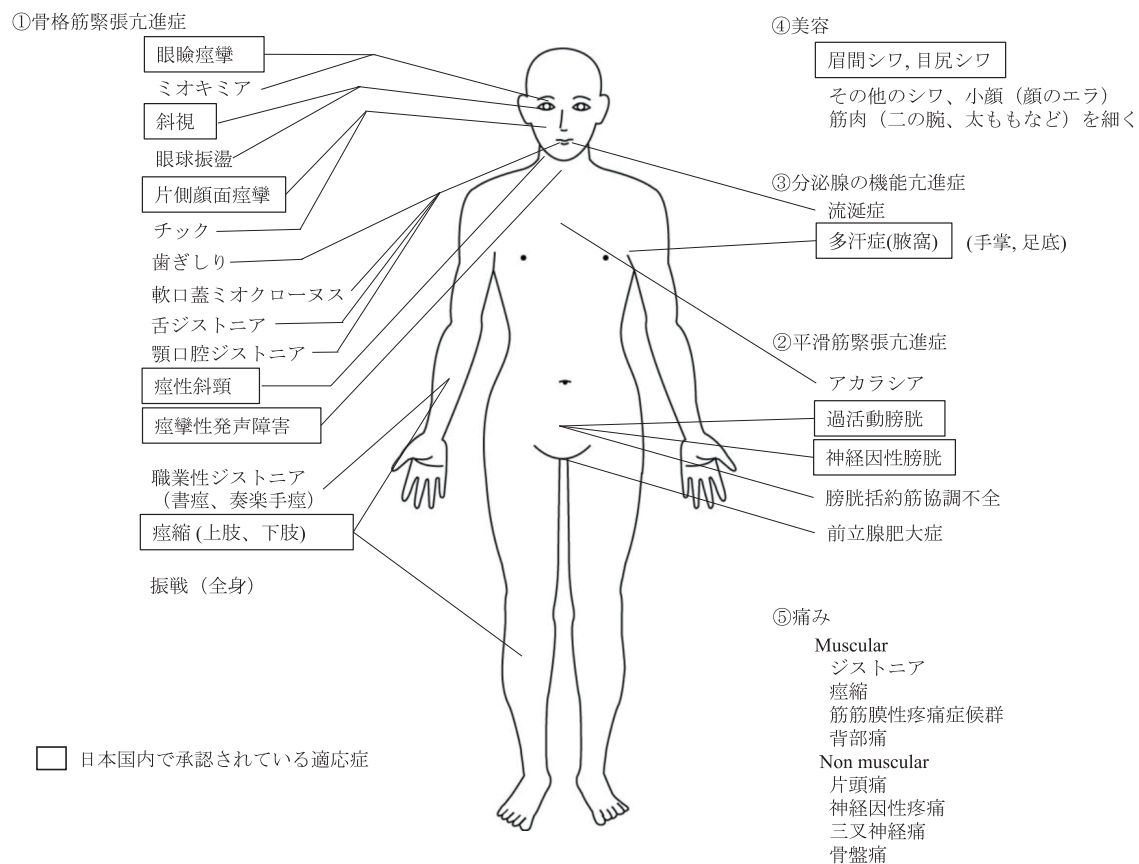


図3 ボツリヌス毒素製剤の主な適応症

ボツリヌス毒素の分析法

04

ボツリヌス毒素の分析については、食品、臨床検体からのボツリヌス毒素の検出、ボツリヌス毒素製剤の活性評価などの目的で用いられている^{16, 17)}。食品、臨床検体には様々な物質が含まれている状態でボツリヌス毒素を検出する必要があるため、できるだけ高感度の方法で分析を行う必要がある。これに対し、ボツリヌス毒素製剤の活性評価では製品の安全性と有効性を確保するために、毒素の活性を正確に測定する必要がある。ボツリヌス毒素は3つの領域それぞれの活性(受容体への結合、シナプス小胞に対するチャンネル形成による軽鎖の神経細胞質への移行、細胞内基質の切断)がともに有効であることを評価する必要がある。現在、最も高感度で信頼性が高く、世界的に実施されている分析法は、マウスの腹腔内に毒素を投与するマウスバイオアッセイである。この方法は1—10 pg/mLの毒素を検出できる高感度な方法であり、ボツリヌス毒素特有の症状である呼吸麻痺を示して死亡することを確認する方法である。非常に優れた方法であるが、マウスの系統ならびに個体差による毒素に対する感受性の違い、試験実施者や施設間差によるばらつきが大きいという問題がある。さらに、この方法は動物愛護の観点からも問題であることから、世界的な動物試験代替法会議が行われ、現在様々なボツリヌス毒素活性の測定法が検討されている(表2)。現在検討されている代替測定法について以下に紹介する。

Physical Methodとして、イムノアッセイ(sandwich ELISA)、Mass Spectrometry(MS)などがある。これらの方法は毒素分子全体を評価できる測定系であり、毒素を早期(数時間)に感度良く検出可能であるが、活性毒素と不活化毒素の区別がつかないという問題がある。

Functional Methodとして、Endopeptidase Assay、Cell-Based Assayなどがある。Endopeptidase Assayは軽鎖が切断する基質の切断産物を検出するものである。切断産物を

MS、Endopep-ELISA、Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Assayなどで評価する。毒素のうち軽鎖の活性のみを評価するものである。

Cell-Based Assayは培養神経細胞に毒素を添加し、細胞内の基質を軽鎖が切断した産物を評価する試験である。切断産物の検出は細胞溶解物を用いてウェスタンブロット、ELISA、免疫蛍光法などを用いて測定する。毒素の神経細胞への侵入および軽鎖の活性を評価できるものである。現在、Botox[®]を製造しているAllergan社(現AbbVie社)では、ヒト神経芽腫SiMa細胞株を用いたCell-Based Assayを開発した¹⁸⁾。この方法はSiMa細胞に毒素を作用させ、細胞を溶解させた後にECL-ELISAで評価する。現在FDAでも認可されている方法であり、AbbVie社ではこのCell-Based Assayとマウスバイオアッセイを併用して毒素製剤の活性評価を行っている。Cell-Based Assayを応用して、神経伝達物質の放出阻害も評価できるようにラジオアイソトープや蛍光標識した物質をマーカーとして用い、基底状態およびKClで脱分極したときの放出物質を評価する方法が検討されている。これらの方法はマウスバイオアッセイ法に匹敵する感度をもつが、培養神経細胞の維持やアッセイ感度の適切な再現性の保証など高度な技術が必要である。

in vivo、*ex vivo*の試験として、マウス横隔膜神経標本法、ラット複合筋活動電位測定法などがある。これらの方法はマウスバイオアッセイ同様に毒素の3つの領域の活性を評価できる試験系である。マウス横隔膜神経標本法は横隔膜と横隔神経標本に毒素を作用させ横隔膜の収縮抑制を評価する試験法である。マウスバイオアッセイの呼吸麻痺を定量的に評価できる試験系である。しかし、再現性を得るために高度な技術が必要である。ラット複合筋活動電位測定法は、筋線維が収縮することで発生する複合筋活動電位を利用するものである。臨床における毒素製剤を用いた治療で患部における毒素の効果を評価する方法を応用したものであり、毒素の筋弛緩作用を定量的に評価できる試験系である。比較的簡便にできる試験系であり、A、C型などではマ

表2 ボツリヌス毒素の代表的な分析方法

	分析法	検出時間	毒素型	感度 (pg/mL)
Physical Method	sandwich ELISA	6-7h	A-F	2-176
	Mass spectrometry	5-8h	A-F	0.1-1
Functional Method	Endopeptidase Assay (ELISA based or MS based)	7-8h	A-G	0.1-1000
	Cell-Based Assay	3-5day	A-E	0.55-1500
<i>ex vivo</i>	マウス横隔膜神経標本	5-9h	A-F	1-10
<i>in vivo</i>	マウスバイオアッセイ	4day	A-F	1-10
	ラット複合筋活動電位測定	2day	A-F	0.1-10

ウスバイオアッセイよりも感度良く測定が可能である。

以上、ボツリヌス毒素の分析法は様々な方法が開発されているが、現状まだマウスバイオアッセイが主流の方法となっている。今後も代替法についてさらに検討が進むと考えられる。

おわりに

05

ボツリヌス毒素は非常に高い毒性を有し、致死性のボツリヌス症を引き起こす。この毒素は非常に効率よく神経細胞内に侵入して神経伝達障害を起こすという特徴があり、これを生かして現在では世界中で様々な疾患の治療に使用されている。市販されているボツリヌス毒素製剤は現在のところA1およびB1型毒素が利用されているが、今後他の血清型およびサブタイプの毒素の研究が進むことで、それぞれの毒素の特徴を生かして様々な疾患の治療に応用されていく可能性がある。また、ボツリヌス毒素の分析法は毒素の3つの領域の活性が有効であることを評価する必要があり、世界的にマウスバイオアッセイで評価が行われている。動物愛護の観点もあり、今後も技術の進歩とともに適切な代替法が提案されることが考えられる。

参考文献

1. M. Pirazzini, O. Rossetto, R. Eleopra, and C. Montecucco. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology. *Pharmacol. Rev.* 2017, 69, 200-235.
2. C. Mazuet, C. Legeay, J. Sautereau, L. Ma, C. Bouchier, P. Bouvet, and M. R. Popoff. Diversity of group I and II *Clostridium botulinum* strains from France including recently identified subtypes. *Genome Biol. Evol.* 2016, 8, 1643-1660.
3. S. R. Kalb, J. Baudys, B. H. Raphael, J. K. Dykes, C. Lúquez, S. E. Maslanka, and J. R. Barr. Functional characterization of botulinum neurotoxin Serotype H as a hybrid of known Serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal. Chem.* 2015, 87, 3911-3917.
4. D. A. Tehran and M. Pirazzini. Novel botulinum neurotoxins: exploring underneath the iceberg tip. *Toxins*. 2018, 10, 190.
5. K. Tsukamoto, T. Kohda, M. Mukamoto, K. Takeuchi, H. Ihara, M. Saito, and S. Kozaki. Binding of *Clostridium botulinum* type C and d neurotoxins to ganglioside and phospholipid. novel insights into the receptor for *Clostridial* neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 35164-35171.
6. R. L. Rosales and D. Dressler. On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur. J. Neurol.* 2010, 17 (Suppl 1), 71-80.
7. N. Akaike, Y. Ito, M. C. Shin, K. Nonaka, Y. Torii, T. Harakawa, A. Ginnaga, S. Kozaki, and R. Kaji. Effect of A2 type botulinum toxin on spontaneous miniature and evoked transmitter release from the rat spinal excitatory and inhibitory synapses. *Toxicon*. 2010, 58, 1315-1326.
8. C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, N. García-Sanz, and A. Ferrer-Montiel. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 25665-25672.
9. 加藤啓子, 幸田知子, 小崎俊司. ボツリヌス毒素によるてんかんの治療. *Brain Nerve*. 2009, 61, 939-948.
10. M. Caleo, F. Antonucci, L. Restani, and R. Mazzocchio. A reappraisal of the central effects of botulinum neurotoxin type A: by what mechanism. *J. Neurochem.* 2009, 109, 15-24.
11. F. J. Erbguth. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.* 2004, Suppl. 8, S2-6.
12. Y. Torii, M. Sasaki, M. C. Shin, N. Akaike, and R. Kaji. Comparison of efficacy and toxicity between botulinum toxin subtypes A1 and A2 in cynomolgus macaques. *Toxicon*. 2018, 153, 114-119.
13. R. Kaji. Clinical differences between A1 and A2 botulinum toxin subtypes. *Toxicon*. 2015, 107, 85-88.
14. R. Eleopra, V. Tugnoli, R. Quatrala, O. Rossetto, and C. Montecucco. Different types of botulinum toxin in humans. *Mov. Disord.* 2004, 19 Suppl 8, S53-59.
15. P. G. Foran, N. Mohammed, G. O. Lisk, S. Nagwaney, G. W. Lawrence, E. Johnson, L. Smith, K. R. Aoki, and J. O. Dolly. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E, and F compared with the long lasting type A. Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 1363-1371.
16. 国立健康危機管理研究機構. ボツリヌス症. 2012. <https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/botulism121207.pdf>
17. C. Rasetti-Escargueil and M. R. Popoff. Recent developments in botulinum neurotoxins detection. *Microorganisms*. 2022, 10, 5, 1001.
18. E. Fernandez-Salas, J. Wang, Y. Molina, J. B. Nelson, B. P. S. Jacky, and K. R. Aoki. Botulinum neurotoxin serotype a specific Cell-Based potency assay to replace the mouse bioassay. *PLOS ONE*. 2012, 7, 2, e49516.

受理日：2025年5月27日