

厚生科学研究費補助金「新興・再興感染症研究事業」

食餌性ボツリヌス中毒および乳児ボツリヌス症に関する研究

平成10年度研究報告書

平成11年3月

「食餌性ボツリヌス中毒および乳児ボツリヌス症に関する研究」

平成10年度報告書

目 次

1. 厚生科学研究費報告書概要	
主任研究者 小熊 惠二 (岡山大学医学部細菌学講座)	1
2. 総括研究報告	
主任研究者 小熊 惠二 (岡山大学医学部細菌学講座)	5
3. 分担研究報告	
分担研究者 中村 信一 (金沢大学医学部微生物学講座)	11
4. 分担研究報告	
分担研究者 大山 徹 (北海道立衛生研究所生物工学室)	17
5. 分担研究報告	
分担研究者 高橋 元秀 (国立感染症研究所細菌・血液製剤部)	21
6. 分担研究報告	
分担研究者 小崎 俊司 (大阪府立大学農学部獣医公衆衛生学講座)	37
7. 分担研究報告	
主任研究者 小熊 惠二 (岡山大学医学部細菌学講座)	43

「厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要」

1. 研究費の名称＝ 厚生科学研究費

2. 研究事業名＝ 新興・再興感染症研究事業

3. 研究課題名＝ 食餌性ボツリヌス中毒および乳児ボツリヌス症に関する研究

4. 国庫補助金精算所要額＝ 24,000,000

5. 研究期間＝ 1998

6. 主任研究者名＝ 小熊恵二（岡山大学医学部）

7. 分担研究者名＝ 高橋元秀（国立感染症研究所）、中村信一（金沢大学医学部）、小崎俊司（大阪府立大学農学部）、大山徹（北海道立衛生研究所）

8. 研究目的＝ 現在我が国では食餌性ボツリヌス中毒は稀であるが、1984年辛子蓮根による中毒で11名が死亡した。乳児ボツリヌス症は1987年に9例認められたが、その年厚生省が乳児には蜂蜜を投与しないよう通達を出してから減少した。しかし1990年より今日まで、原因不明（1例は野菜スープが原因か）のものが4例発生している。各種の食品が輸入され、多様な保存食品が販売されている現実では、大発生が起こる危険性は高い。このため、ヒト型抗毒素血清あるいはモノクローナル抗体を用意しておくことは必要なことと思われる。また、乳児の突然死とボツリヌス中毒の関係を調査することは、我が国の国民の健康管理を考える上で重要と思われる。さらに、牛や水鳥に有効なワクチンを開発し、家畜や動物の中毒を予防することは、動物を助命する事のみでなく、自然界のボツリヌス芽胞による汚染の悪循環を断つ意味もあり重要である。

9. 研究方法＝ 1) 食品の汚染調和

金沢市内で市販している粉ミルク（15品目）、ベビーフード（51品目）、蜂蜜（6品目）、砂糖（5品目）、甘味料（11品目）、発酵調味料（12品目）の計100品目を調査した。各食品50gを滅菌生理食塩水（生食）で10倍に希釈し、10,000rpm、20分遠心した後、その沈査を2mlの生食に懸濁した。懸濁液1mlづつを10mlのチョップド・ミート培地に接種し、1体はそのまま、他方を65℃、20分間加熱した後、30℃、5日間培養した。培養液を濾過滅菌し、0.5%トリプシン処理した後、0.5mlをマウスの腹腔内に注射し、5日間生死を観察した。

2) PCRによる迅速検出法の開発

既にボツリヌスA～F型毒素のlight chainの特定の領域（300bp程）に対するプライ

マーを合成し、PCR法による同定法を開発しているで、今回は同様の方法によりボツリヌスG型、破傷風毒素を特異的に検出するプライマーを開発した。また*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*の場合は、これらの菌が共通に産生するレシチナーゼ遺伝子の特定領域（約350bp）をまず増幅し、次いで炭疽菌とセレウス菌は既報の毒素遺伝子用プライマーを用いるという方法も考案した。

3) ボツリヌスA、B、E、F型沈降トキシノイドの作製

C. botulinum type A-92、B-Okra、E-35396、F-Langelandを培養後、酸沈澱、硫酸塩析、ゲル濾過により部分精製毒素を得た。これをホルマリン（0.4%）処理により無毒化した後、その安全性を破傷風トキシノイドの生物的製剤基準の方法に準拠して、また有効性（抗体価の上昇）は各トキシノイドをモルモットに接種して調べた。最終的には各トキシノイドの量を一定にし、これに水酸化アルミニウムゲルを約0.03%に加え、沈降トキシノイドを作製した。

4) ヒト型モノクローナル抗体の作製

3) で作製したトキシノイドを1ヶ月間隔で4回、4名のボランティアに皮下免疫した。A型及びB型に対して抗体価の高かったヒトより採血（各15ml）し、Ficoll法によりリンパ球を分取した。このリンパ球をそのまま、あるいはpokeweed mitogenおよびボツリヌスA、B毒素（5ng/ml）でブラスト化（5日間）させた後、ヒト/マウスのヘテロミエロームであるRF-S1株と50%ポリエチグリコールで融合した。その後、96穴プレートにまき、HAT培地で選択した。生じた融合細胞が毒素に対する抗体を産生しているかはELISA法で、その毒性中和能はマウスを用いた中和試験で調べた。

5) トリ、牛用のワクチンの開発

ボツリヌス毒素が小腸より吸収されるためには神経毒素に結合している無毒成分（特にHA）が重要であることが判明したので、まず無毒成分しか産生しないC型変異株(C)-N71より無毒成分を精製した。またHAはHA1（～33kDa）、HA2（～17kDa）、Ha3a（～23kDa）、HA3b（～53kDa）より成り、上記の小腸上皮細胞の結合にはHA1とHA3bが特に重要であることも判明したので、これらが大腸菌を用いてGST融合蛋白として合成した。(C)-N71より得た無毒成分、人工合成したHA1+Ha3b、HA1+HA2+HA3（HA3a+HA3b）を、大腸菌LTの毒性を減弱した変異体をアジュバントとして、1週間隔で5回マウスを経鼻接種した。最終免疫より10日後に、各マウスに 10^4 ～ 10^5 のC型、D型毒素を経口投与し、ワクチン効果を調べた。

10. 結果と考察= 本研究班は1) ボツリヌス菌を含む病原性の強い芽胞形成菌による食品の汚染の調査、2) ボツリヌス中毒予防・治療のためのワクチンおよび抗体の作製、3) 突然死と乳児ボツリヌス症の関係の調査、である。1) に関しては中村らが中心となり市販の粉ミルク、ベビーフードなど100品目を検査したが、マウスを致死させるような菌は分離されなかった。これまでの検査では市販食品は“安全”であることが確認されたが、今後は輸入品も含め検討する予定である。

大山らは既にボツリヌスA～F型毒素遺伝子の特定領域に対するプライマーを作製し、PCR法による迅速診断法を開発しているが、本年はボツリヌスG型、破傷風毒素および

B. anthracis、*B. cereus*、*B. thuringiensis*用のプライマーを開発した。これらの他、既報に従いウェルシュ菌のプライマーも作製し、有害芽胞形成菌の迅速検出および定量法の確立を試みている。今後は定量性をより確実にすると共に、同定できる菌種を非病原性の芽胞形成菌などにも拡げる予定である。

2) に関しては高橋らがまず安全で免疫原性の高いボツリヌスA、B、E、F型沈降トキソイドを作製した。次いでこれを数人のボランティアに免疫し、小崎らがヒト型モノクローナル抗体の作製を試みた。これまで、抗体価の上昇したボランティアの末梢リンパ球を用い数回融合実験を試みたところ、A型およびB型毒素と反応する抗体産生細胞がそれぞれ17クローンと12クローン得られ、かつ、A型の2クローンは毒素中和能を有していた。今後とも、他の型の毒素を中和するモノクローナル抗体を得るよう努力したい。

小熊らはボツリヌスC型神経毒素に結合している無毒成分をマウスに経鼻免疫すると、C型、D型中毒を予防できることを確認した。人工合成したHAのサブコンポーネントのみでは効果は不十分であったが、今後は無毒成分とHAのサブコンポーネントの併用を考えると共に、無毒成分の免疫では、1回の経鼻接種でも良い効果が得られたので、本方法が実際に問題が起きているプロイラー、野鳥、牛などで応用可能か検討する予定である（まずオーストラリアの研究所に依頼し、牛での実験を進める予定である）。3) に関しては、中村、小熊らが多数の病院に、乳児の突然死（様）患者が出現した場合には検体を提供していただけるようお願いしたが、まだその例はない。

1 1. 結論= 本年度行ったことおよび判明したことは以下にまとめられる。

1) 市販されている粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖など100品目を検査したが、ボツリヌス菌を含め、マウスに致死をきたす菌による汚染は認められなかった。

2) ボツリヌスA~F型毒素遺伝子の他、ボツリヌスG型、破傷風毒素遺伝子、および*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*用のPCR法を開発した。

3) 安全で効果の高いボツリヌスA、B、E、F型沈降トキソイドを作製した。

4) 上記のトキソイドをボランティアに免疫し、ヒト型の抗ボツリヌス毒素モノクローナル抗体を作製したところ、A型で17クローン、B型で12クローン得られた。B型のクローンは中和能を産生していなかったが、A型17クローン中2クローンは中和抗体を産生していた。

5) ボツリヌスC型神経毒素に結合している無毒成分を経鼻接種すると、腸管での免疫が確立され、C型、D型の両方の食中毒が防げることが判明した。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

食餌性ボツリヌス中毒および乳児ボツリヌス症に関する研究

主任研究者 小熊 恵二 岡山大学医学部 細菌学講座 教授

研究要旨 本研究班の目的は1) ボツリヌス菌を含む病原性の強い芽胞形成菌による食品の汚染の調査、2) ボツリヌス中毒予防・治療のためのワクチンおよび抗体の作製、3) 突然死と乳児ボツリヌス症の關係の調査、である。1) に関しては市販の粉ミルク、ベビーフードなど100品目を検査したが、マウスを致死させるような菌は分離されなかった。我々は既にボツリヌスA～F型毒素遺伝子の特定領域に対するプライマーを作製し、PCR法による迅速診断法を開発しているが、本年はボツリヌスG型、破傷風毒素および*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*用のプライマーを開発した。今後、調査品目を増加させると共に、上記以外の菌用のプライマーも作製し、（有害）芽胞形成菌の迅速検出および定量法の確立を試みる予定である。2) に関してはまず安全で免疫原性の高いボツリヌスA、B、E、F型沈降トキソイドを作製した。次いでこれを数人のボランティアに免疫し、ヒト型モノクローナル抗体の作製を試みたところ、A型およびB型毒素と反応する抗体産生細胞（クローン）がそれぞれ17株と12株得られた。このうちA型の2株は、毒性を中和する抗体を産生していた。今後、A型以外の毒素を中和するモノクローナル抗体も作製したい。トリやウシのボツリヌスC型、D型食中毒の予防のためには、C型神経毒素に結合している無毒成分を経鼻接種すると、腸管での免疫が確立され、C型、D型の両方の食中毒が防げることがマウスの実験で判明した。今後、本ワクチンの効果をトリや牛で試みたい。3) に関しては、多数の病院に、乳児の突然死（様）患者が出現した場合には検体を提供していただけるようお願いしたが、まだその例はない。

（分担）研究者

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長
中村信一 金沢大学医学部 微生物学講座 教授
小崎俊司 大阪府立大学農学部 獣医公衆衛生学講座 助教授
大山 徹 北海道立研究所 生物工学室 室長

A. 研究目的

現在我が国では食餌性ボツリヌス中毒は稀であるが、1984年辛子蓮根による中毒で11名が死亡した。乳児ボツリ

ヌス症は1987年に9例認められたが、その年厚生省が乳児には蜂蜜を投与しないよう通達を出してから減少した。しかし1990年より今日まで、原因不明（1例は野菜スープが原因か）のものが4例発生している。各種の食品が輸入され、多様な保存食品が販売されている現実では、大発生が起こる危険性は高い。このため、食品の汚染を迅速に検査する方法の確立、および治療法のヒト型抗毒素血清あるいはモノクローナル抗体を用意しておくことは必要なことと思われる。また、乳児の突然死とボツリヌス中毒の關係を調査することは、我が国の

国民の健康管理を考える上で重要と思われる。さらに、牛や水鳥に有効なワクチンを開発し、家畜や動物の中毒を予防することは、動物を助命する事のみでなく、自然界のボツリヌス芽胞による汚染の悪循環を断つ意味もあり重要である。

B. 研究方法

1) 食品の汚染調査

金沢市内で市販している粉ミルク(15品目)、ベビーフード(51品目)、蜂蜜(6品目)、砂糖(5品目)、甘味料(11品目)、発酵調味料(12品目)の計100品目を調査した。各食品50gを滅菌生理食塩水(生食)で10倍に希釈し、10,000rpm、20分遠心した後、その沈査を2mlの生食に懸濁した。懸濁液1mlづつを10mlのチョップド・ミート培地に接種し、1体はそのまま、他方を65℃、20分間加熱した後、30℃、5日間培養した。培養液を濾過滅菌し、0.5%トリプシン処理した後、0.5mlをマウスの腹腔内に注射し、5日間生死を観察した。

2) PCRによる迅速検出法の開発

既にボツリヌスA~F型毒素のlight chainの特定の領域(300bp程)に対するプライマーを合成し、PCR法による同定法を開発しているで、今回は同様の方法によりボツリヌスG型、破傷風毒素を特異的に検出するプライマーを開発した。また*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*の場合は、これらの菌が共通に産生するレシチナーゼ遺伝子の特定領域(約350bp)をまず増幅し、次いで炭疽菌とセレウス菌は既報の毒素遺伝子用プライマーを用いるという方法も考案した。

3) ボツリヌスA、B、E、F型沈降トキソイドの作製

C. botulinum type A-92、B-Okra、E-35396、F-Langelandを培養後、酸沈澱、硫酸塩析、ゲル濾過により部分精製毒素を得た。これをホルマリン(0.4%)処理により無毒化した後、その安全性を破傷風トキソイドの生物的製剤基準の方法に準拠して、また有効性(抗体価の上昇)は各トキソイドをモルモットに接種して調べた。最終的には各トキソイドの量を一定にし、これに水酸化アルミニウムゲルを約0.03%に加え、沈降トキソイドを作製した。

4) ヒト型モノクローナル抗体の作製

3)で作製したトキソイドを1ヶ月間隔で4回、4名のボランティアに皮下免疫した。A型及びB型に対して抗体価の高かったヒトより採血(各15ml)し、Ficoll法によりリンパ球を分取した。このリンパ球をそのまま、あるいはpokeweed mitogenおよびボツリヌスA、B毒素(5ng/ml)でブラスト化(5日間)させた後、ヒト/マウスのヘテロミエロームであるRF-S1株と50%ポリエチグリコールで融合した。その後、96穴プレートにまき、HAT培地で選択した。生じた融合細胞が毒素に対する抗体を産生しているかはELISA法で、その毒性中和能はマウスを用いた中和試験で調べた。

5) トリ、牛用のワクチンの開発

ボツリヌス毒素が小腸より吸収されるためには神経毒素に結合している無毒成分(特にHA)が重要であると判明したので、まず無毒成分しか産生しないC型変異株(C)-N71より無毒成分を精製した。またHAはHA1(~33kDa)、HA2(~17kDa)、Ha3a(~23kDa)、HA3b(~53kDa)より成り、上記の小腸上皮細胞の結合にはHA1とHA3bが特に重要であることも判明したので、これらが大腸菌を用いてGST融合蛋白として合成し

た。(C)-N71より得た無毒成分、人工合成したHA1+Ha3b、HA1+HA2+HA3 (HA3a+HA3b)を、大腸菌LTの毒性を減弱した変異体をアジュバントとして、1週間隔で5回マウスを経鼻接種した。最終免疫より10日後に、各マウスに 10^4 ~ 10^5 のC型、D型毒素を経口投与し、ワクチン効果を調べた。

C. 研究結果

本研究班の目的は1) ボツリヌス菌を含む病原性の強い芽胞形成菌による食品の汚染の調査、2) ボツリヌス中毒予防・治療のためのワクチンおよび抗体の作製、3) 突然死と乳児ボツリヌス症の関係の調査、である。1) に関しては中村らが中心となり市販の粉ミルク、ベビーフードなど100品目を検査したが、マウスを致死させるような菌は分離されなかった。大山らは既にボツリヌスA~F型毒素遺伝子の特定領域に対するプライマーを作製し、PCR法による迅速診断法を開発しているが、本年はボツリヌスG型、破傷風毒素および*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*用のプライマーを開発した。これらの他、既報に従いウェルシュ菌のプライマーも作製し、有害芽胞形成菌の迅速検出および定量法の確立を試みている。2) に関しては高橋らがまず安全で免疫原性の高いボツリヌスA、B、E、F型沈降トキソイドを作製した。次いでこれを数人のボランティアに免疫し、現在、小崎らがヒト型モノクローナル抗体を作製中である。これまでに抗体価の上昇したボランティアの末梢リンパ球を用い融合実験を試みたところ、A型およびB型毒素と反応する抗体産生細胞(クローン)がそれぞれ17株と12株得られた。このうちA型の2株は、毒性を中和する抗体を産生していた。小熊らはマウ

スを人工合成したC型HAのサブコンポーネントで5回免疫してもそのワクチン効果は低かったが、C型無毒成分で免疫した場合は、1回の接種でも腸において高力価のIgAとIgGが分泌され、C型とD型の両方の毒素に対して効果があることを認めた。3) に関しては、中村、小熊らが多数の病院に、乳児の突然死(様)患者が出現した場合には検体を提供していただけるようお願いしたが、まだその例はない。

D. 考察

中村らによるこれまでの100品目の食品検査ではボツリヌス菌などは検出されず、“安全”であることが確認されたが、今後は輸入品も含め検討する予定である。

大山らの迅速診断法も定量性をより確実にすると共に、同定できる菌種を非病原性の芽胞形成菌などにも拡げる予定である。

高橋、小崎らによるヒト型抗体の作製は、既に抗Aモノクローナル抗体が得られた。今後は他の型の毒素に対するモノクローナル抗体を用意すべく努力したい。

小熊らのC型、D型中毒予防のワクチン開発は、実際に問題が起きているブロイラー、野鳥、牛などで応用可能か検討する予定である(まずオーストラリアの研究所に依頼し、牛での実験を進める予定である)。

突然死と乳児ボツリヌス症との関係は、そのような患者が出現した際には直ちに検査できるように準備を整えている。

E. 結論

本年度行ったことおよび判明したことは以下にまとめられる。

- 1) 市販されている粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖など100品目を検査したが、ボツリヌス菌を含め、マウスに致死をきたす菌による汚染は認められなかった。
- 2) ボツリヌスA～F型毒素遺伝子の他、ボツリヌスG型、破傷風毒素遺伝子、および*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. thuringiensis*用のPCR法を開発した。
- 3) 安全で効果の高いボツリヌスA、B、D、F型沈降トキシイドを作製した。
- 4) 上記のトキシイドをボランティアに免疫し、ヒト型の抗ボツリヌス毒素モノクローナル抗体を作製したところ、A型で17クローン、B型で12クローン得られた。B型のクローンは中和能を産生していなかったが、A型17クローン中2クローンは中和抗体を産生していた。
- 5) ボツリヌスC型神経毒素に結合している無毒成分を経鼻接種すると、腸管での免疫が確立され、C型、D型の両方の食中毒が防げる事が判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima, H. K. Inoue, T. Ikeda, Y. Fujinaga, H. Sunagawa, K. Takeshi, T. Ohyama, T. Watanabe, K. Inoue, and K. Oguma. Molecular composition of the 16S toxin produced by a *Clostridium botulinum* type D strain, 1873. *Microbiol. Immunol.*, 42: 599-605, 1998
- 2) J. C. Marvaud, Gibert M, Inoue K, Fujinaga Y, Oguma K. and Popoff M. R. botR/A is a positive regulator of botulinum neurotoxin and associated

non-toxin protein genes in *Clostridium botulinum* A. *Mol. Microbiol.* 29: 1009-1018. 1998.

- 3) Yokota K, Fujinaga Y, Inoue K, Seo G, Takeshi K, Nagamachi E and Oguma K. Classification of *Clostridium butyricum* based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *Anaerobe* 4: 177-181. 1998
- 4) Omori-Satoh, T., Takahashi M., Nagaoka, Y. and Mebs, D. Comparison of antihemorrhagic activities in skeletal muscle extracts from various animals against Bothrops Jararaca snake venom. *Toxicon.* 36. (2) 421-423. 1998
- 5) Naito, S., Horino, A., Komiya, T., Fukuda, Y., Takahashi, M., Ami, Y., Suzaki, Oka, T., Okuma, K., Morokuma, M., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komueo, K, and Uchida, T. Induction of protection against tetanus toxin in mice by tetanus toxoid-liposome conjugate. *International archives of allergy and immunology.* 116: 215-219, 1998
- 6) Fukuda, Y., Komiya, T., Takahashi, M., Arakawa, Y., Ami, Y., Suzaki, Y., Naito, S., Horino, A., Nagata, N., Satoh, S., Gondaira, F., Sugiyama, J., Nakano, Y., Nishinohara, S., Komuro, K, and Uchida, T. Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate. *International archives of allergy and immunology.* 116: 313-317, 1998

- 7) D. Ikeda, T. Karasawa, K. Yamakawa, R. Tanaka, M. Namiki and S. Nakamura. Effect of isoleucine on toxin production by *Clostridium difficile* in a defined medium. Zbl. Bakt. 287: 375-386, 1998
- 8) K. Yamakawa, T. Karasawa, T. Ohta, H. Hayashi and S. Nakamura. Inhibition of the enhanced toxin production by *Clostridium difficile* in biotin-limited conditions. J. Med. Microbiol, 47: 767-771, 1998
- 9) X. Meng, K. Yamakawa, K. Zou, X. Wang, X. Kuang, C. Lu, C. Wang, T. Karasawa and S. Nakamura. Isolation and characterization of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* from soil of China. J. Med. Microbiol. 1998 (in press)
- 10) Kozaki, S., Y. Kamata, S. Watarai, T. Nishiki, and S. Mochida. Ganglioside GT1b as a complement receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. Microb. Pathog. 25: 91-99. 1998.
- 11) Kozaki, S., Y. Kamata, T. Nishiki, H. Kakinuma, H. Maruyama, H. Takahashi, T. Karasawa, K. Yamakawa, and S. Nakamura. Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. Infect. Immun. 66: 4811-4816. 1998.
- 12) 奥井 登代、館 延忠、大山 徹
色素性乾皮症 (XP) 由来細胞の紫外線感受性と遺伝子解析 北海道立衛生研究所報、第44集、99-102, 1998

- 13) 鈴木智宏、古屋宏二、高野敬志、伊藤八十男、大山 徹 北海道産の牛の糞便から分離された *Cryptosporidium parvum* の遺伝子解析 北海道立衛生研究所報、第44集、88-90, 1998

2. 学会発表

- 1) 井上薫, 藤永由佳子, ナズラマホモテイ, 孝口裕一, 渡部俊弘, 井上勝弘, 小熊恵二 ポツリヌスC型菌由来無毒株 (C) -N71, の血球凝集活性含有成分の精製 第51回中国・四国支部会, 日本細菌誌 53 (1998)
- 2) 藤永由佳子, 井上薫, 横田憲治, 武士甲一, 大山 徹, 渡部俊弘, 井上勝弘, 小熊恵二 ポツリヌス progenitor toxinのHAサブコンポーネントの機能解析: 小腸微絨毛および赤血球への結合活性について 第45回毒素シンポジウム 長野 (1998)
- 3) 藤永由佳子, 井上薫, 横田憲治, 長町榮子, 小熊恵二 ポツリヌス progenitor toxinのHAサブコンポーネントの小腸微絨毛および赤血球への結合活性について 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 1061 (1999)
- 4) 井上薫, 藤永由佳子, 渡部俊弘, 武士甲一, 大山徹, 井上勝弘, 小熊恵二 ポツリヌスA型progenitor toxin HA成分の糖鎖に対する結合 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 1062 (1999)
- 5) 円谷悦造, 塚本義則, 小熊恵二 ポツリヌス菌に対する食酢の抗菌作用 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 2060 (1999)

- 6) 高橋元秀, 長岡芳昭, 小崎俊司
都内で発生したグリーンオリーブによるB型ボツリヌス患者へのウマ抗毒素治療について 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 2059 (1999)
- 7) 唐澤忠宏, 王 興民, 前側恒男, 中村信一 中国土壌からのE型ボツリヌス毒素産生性*Clostridium butyricum*の分離と分子疫学解析 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 2067 (1999)
- 8) 木村紀代, 小崎俊司 ボツリヌスB型毒素受容体シナプトタグミンIIの機能発現に参与するアミノ酸の同定 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 1050 (1999)
- 9) 杉本央, 小崎俊司, 笹川千尋
A型ボツリヌス神経毒素の神経・筋シグナル伝達遮断作用の同毒素重鎖C端フラグメントHcによる抑制 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 1060 (1999)
- 10) 渡部俊弘, 相根義昌, 孝口裕一, 大山徹, 井上薫, 藤永由佳子, 小熊恵二, 井上勝弘 アルキル化チオヒダントイン法によるボツリヌスCおよびD型神経毒素軽鎖のC-末端アミノ酸配列の分析、軽・重鎖間のnick siteの同定 第72回総会, 東京, 日本細菌誌 54, 1049 (1999)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

乳児ボツリヌス症の検討および食品のボツリヌス芽胞による汚染調査に関する研究

（分担）研究者 中村 信一 金沢大学医学部 微生物学講座教授

研究要旨

乳児ボツリヌス症は、頑固な便秘、吸乳力や泣き声の低下、首や手足に力が入らない等の症状を示すボツリヌス中毒の一様式である。非典型的な症例では突然死を来すこともある。これらは、食品を介して経口的に摂取されたボツリヌス毒素産生菌やその芽胞が腸管内で定着するために起こる。本研究では、突然死した乳児の臨床検体から、毒素の検出や菌分離を行い、突然死とボツリヌス中毒の関係を調査する予定であったが、今までのところ、検体採取を依頼した医療機関において突然死の症例は無い。一方、乳児が摂食する可能性がある食品100品目について、ボツリヌス毒素産生菌による汚染を調査したが、汚染された食品は見つからなかった。突然死の症例はまれであり、市販食品の汚染頻度も低いため、限られた調査期間では陽性例に遭遇することは無かったが、今後もこの調査は根気強く継続的に行い、データを蓄積してゆく事が重要であると考えられる。

A. 研究目的

乳児の突然死の原因としては、様々な要因があげられるが、米国の乳児突然死における、少なくとも数%程度はボツリヌス中毒によって起こっていると考えられている。日本では、乳児の突然死とボツリヌス中毒との関係についての報告が無いため、実情は不明であるが、このような症例では、患児は典型的な乳児ボツリヌス症の症状を示さず、突然呼吸不全等を起こして死亡する。乳児ボツリヌス症は離乳食等に混入したボツリヌス菌芽胞が経口的に摂取され、腸管内で発芽、増殖し、その際産生される毒素により中毒を来す事によって起こる。厚生省による指導が効を奏して、蜂蜜による乳児ボツリヌス症は激減したが、最近の症例では感染源が不明である場合の方が多く、一般に流通している食品が、事実上どの程度本菌芽胞により汚染されているのかを調査、把握することは医学上だけでなく、行政的にも重要であると考えられ

る。しかし、本菌は嫌気性菌であり、菌の分離培養や毒素の検出には、特殊な方法と、ある程度熟練した技術が必要であることも要因となり、これまでは十分な調査が行われてきたとは言えない状況にある。

本研究では、突然死した乳児の臨床検体から、毒素の検出と菌分離を試み、突然死とボツリヌス中毒の関係について調査する。また、乳児が摂食する可能性がある市販食品中からボツリヌス毒素産生菌の検索を行い、実際に流通している食品の汚染程度を調査する。

B. 研究方法

（1）乳児の突然死とボツリヌス中毒との関連調査

石川、富山、福井の三県における金沢大学医学部小児科関連病院、および開業医で細菌学に日頃より高い感心を持っている計30の医療機関に、突然死した乳児の臨床検体（血液、便等）および推定

原因食品の採取を依頼した。

(2) 食品の汚染調査

1) 食品検体

金沢市内で流通している、粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖、甘味料、およびソース等の発酵調味料を対象に調査を行った。調査品目数は、粉ミルク15品目、ベビーフード51品目、蜂蜜6品目、砂糖5品目、甘味料11品目、発酵調味料12品目の合計100品目であった。粉ミルクおよびベビーフード以外の食品は、実際に金沢市内の小売店にて購入した。粉ミルクについては、明治乳業、森永乳業、雪印乳業の3社から発売され、一般小売店で入手可能な銘柄すべてを、ベビーフードについては上記3社の商品の中から無作為に選択したものを、それぞれメーカーから取り寄せて用いた。

各食品検体50 gに滅菌精製水950 mlを加えて乳化後、室温で1時間静置して大きな粒子を沈降させた後、得られた上清を遠心(10,000 rpm、20 min、10℃)し、その沈渣を培地への接種材料とした(図1)。

2) 培地および培養

培地はCMG培地(Chopped meat-glucose medium)をYamakawaらの方法¹⁾に準じて作製した。

上述の食品沈渣は滅菌生理食塩水で1回洗浄後、2 mlの滅菌生理食塩水に再懸濁し、10 mlのCMG培地2本に1 mlづつ接種した。2本のCMG培地の内1本はそのまま、1本は65℃、20分間加熱後、30℃で5日間培養した(図1)。

なお、培地の滅菌、検体の接種、および培養などの操作は、全て嫌氣的条件下で行った。

3) マウス致死試験

培養後の培地を遠心(3,000 rpm、20分)し、上清を-20℃で凍結融解後、0.45 μmのフィルターを用いて濾過滅菌

した。この培養濾液の約半量を別の容器に分取し、同体積の0.5%トリブシン溶液(pH 6.0)を加えて37℃、30分間保温した。トリブシン処理培養濾液については0.5 mlを、未処理培養濾液については0.25 mlを、マウス(DDY、雄、4週齢)の腹腔内に注射し、5日間生死を観察した。

4) PCR試験

CMG培地の培養液 1.5 ml から遠心(13,000 rpm、10分、4℃)により菌体を集め、TEバッファーで1回洗浄後、100 μlの同バッファーに再懸濁し、100℃、10分間加熱してDNAを抽出した。再度遠心(同上)して得られた上清に対して、フェノール抽出とエタノール沈澱を行い、精製DNAを得た。この精製DNAは、1反応あたり500 ngづつを用い、A-F各型のボツリヌス毒素遺伝子に特異的なプライマー(表1)を加えてPCRを行い、各遺伝子の有無を試験した。サーマルサイクラーはGeneAmp 9700(パーキンエルマー)を用い、増幅反応は94℃:1分、55℃:1分、72℃:1分を30サイクル行った²⁾。増幅産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

C. 研究結果

検体採取を依頼した30医療機関において、乳児突然死の症例は一例も無かったため、今までのところ、臨床検体の試験は行っていない。

市販食品の調査の結果、接種材料の加熱、非加熱または、培養濾液のトリブシン処理の有無に関わらず、マウス致死試験は全て陰性であった。また、PCR法によるボツリヌス毒素遺伝子検索も接種材料の加熱、非加熱に関わらず全て陰性であった。これらの結果から、今回調査

した100品目の食品は全て、ボツリヌス毒素産生菌による汚染を受けていなかったと考えられた。

D. 考察

過去に日本国内で発生したボツリヌス菌による食中毒は、いずし、きりこみなどの魚の発酵食品が、E型菌により汚染されて起こる場合が多かったが、近年は食生活の多様化や、輸入食品や食材の増加により、E型以外の菌による食中毒例が増えつつある。また、食品流通の大規模化により、食中毒事例も大規模な例が目立つようになり、輸入食品等からの本菌検出例が大きく報道されるなど、一般の関心も高くなってきている。このような状況の中、1996年には石川県において、日本で初めてのB型菌による乳児ボツリヌス症の症例が報告された。また、近年我々は、E型ボツリヌス毒素を産生するクロストリディウム・ブチリカム菌が、従来考えられていたよりも広く自然界に分布している可能性を示し、注目を集めている。

食品内で産生された毒素によって起こる食中毒とは違い、乳児ボツリヌス症や、一部の乳児突然死は、食品を介して経口的に摂取された本菌やその芽胞が腸管内で定着するために起こると考えられるため、乳児が摂食する可能性がある食品中から極少量の本菌汚染を検出することは、極めて高い意義がある。そこで本研究では、ボツリヌス毒素の検出感度が最も高いマウス致死試験と、毒素遺伝子を高感度に検出できるPCR法の両方を併用して試験を行ったが、今回調査した100品目の食品については、全ての試験が陰性であり、ボツリヌス毒素産生菌による汚染はを受けていなかったものと考えられた。

また、今回の調査期間内には、検体採

取を依頼した医療機関において、乳児突然死の症例は無かったが、引き続き調査を行っていく予定である。

E. 結論

乳児突然死の症例はまれであり、また、一般に流通している食品の本菌による汚染頻度は低いと考えられるが、ボツリヌス毒素が極めて強力であることや、それによってもたらされる結果の重大性から、今回のような調査は根気強く継続的に行い、データを蓄積する事が重要であると考えられた。

参考文献

- 1) K. Yamakawa et al. (1988)
Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China., *Microbiol. Immunol.*, 32, 579 - 587.
- 2) 小熊恵二他、(1996) 病原細菌の分離・同定と病原因子の検索、*日本細菌学雑誌*51、1055-1089.

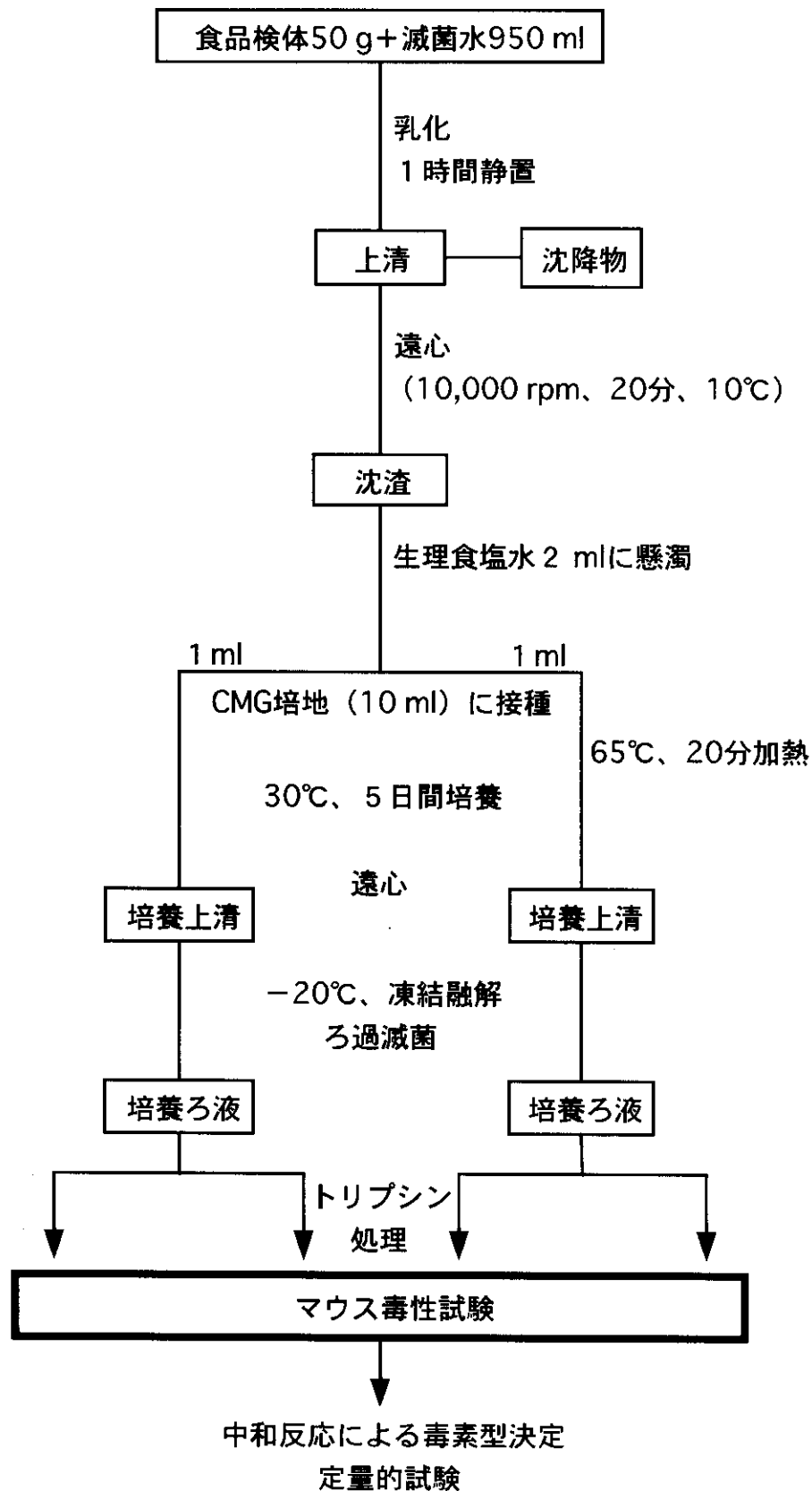


図1 食品中のボツリヌス毒素産生菌検出法

表1 ポツリヌス毒素遺伝子検出用プライマー

毒素型	プライマー名	塩基配列	増幅産物 (bp)
A	AS-11	5'-TGCAGGACAAATGCAACCAGT-3'	283
	AS-22	5'-TCCACCCCAAAATGGTATTCC-3'	
B	BS-11	5'-CCTCCATTTGCGAGAGGTACG-3'	315
	BS-22	5'-CTCTTCGAGTGGAACACGTCT-3'	
C	CS-11	5'-ATACACTAGCTAATGAGCCTG-3'	290
	CS-22	5'-TGGAGTATTGTTATTCCCAGG-3'	
D	DS-11	5'-GTGATCCTGTTAATGACAATG-3'	497
	DS-22	5'-TCCTTGCAATGTAAGGGATGC-3'	
E	ES-11	5'-CAGGCGGTTGTCAAGAATTTTA-3'	266
	ES-22	5'-ATTAGCTTTTGACAGTTCTTC-3'	
F	FS-11	5'-CAATAGGAACGAATCCTAGTG-3'	332
	FS-22	5'-ATCAGGTCCTGCTCCCAATAC-3'	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

食品の検査に関する研究

－芽胞形成細菌の迅速検出法の開発－

（分担）研究者 樋野 大山 徹，船越 武士甲一，北海道立衛生研究所

〔研究要旨〕 遺伝子工学的手法を用い、食品中の芽胞形成細菌の迅速検出を試みた。芽胞形成細菌についてはA～G型までのボツリヌス菌とボツリヌスE型神経毒素を産生するブチリカム菌およびF型神経毒を産生するバラチ菌、ならびにレシチナーゼ陽性セレウス菌群（セレウス菌、ミコイデス菌、スーリンゲンシス菌）を対象とした。プライマーは、A～G型までのボツリヌス神経毒素遺伝子およびレシチナーゼ陽性セレウス菌群のレシチナーゼ遺伝子を増幅するプライマーオリゴヌクレオチドを各々用いた。試料は10倍乳剤とし、その1mlを鋳型DNA調製用の出発材料とした。鋳型DNAの調製についてはアクロモペプチダーゼ・セパジーン処理で行い、鋳型DNA調製後は内部標準による競合PCRを行ってPCR測定の実量性について検討した。PCR反応液を調製した後、PCRの至適条件を検討した。

PCR法の実施と並行して培養試験を行い、PCR法での結果を培養試験およびマウス毒性試験での結果と比較・検討した。

A. 研究目的

芽胞形成細菌の食品における分布についてはわが国では十分な調査がされておらず、食品の製造を行うときには、これら芽胞形成細菌の存在を考慮した加工工程を構築すべきであるとする。

近年、食品製造におけるHACCP方式が注目され、種々の食品においてその導入が検討されている。HACCP方式の中で生物学的危害分析、特に食品原材料に由来する微生物学的危害を分析することは、HACCP方式の実施上極めて重要なステップとなる。わが国は世界中から食品原材料を輸入し、輸入原材料の増加に伴って新たな食品衛生上の事故が発生している。これら食品衛生上の事故としてイタリー産オリーブ漬やオイスターソースのボツリヌス菌による汚染などが挙げられ、芽胞形成細菌の食品汚染については今後十分な注意を払う必要がある。

本研究では、食品中の芽胞形成細菌の分布を調べる上で必要な迅速かつ簡易な手法を遺伝子工学的手法により開発し、その手法をHACCP方式の一環として実施する危害分析に応用して安全な食品製造に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 菌株

以下の菌株を試験に用いた。

- C. botulinum type A strain A-190A
- C. botulinum type B strain B-Lamanna
- C. botulinum type C strain C-Stockholm
- C. botulinum type D strain D-S.A.
- C. botulinum type E strain E-Iwanai
- C. botulinum type F strain F-Langeland
- C. botulinum type G strain G-2740
- B. cereus (emetic type)
- B. cereus (diarrhoeal type)
- B. mycoides

(2) プライマー

プライマーは、A～G型までのボツリヌス神経毒素遺伝子の特異的に増幅する7組、セレウス菌群のレシチナーゼ（ホスホリパーゼC）遺伝子の特異的に増幅する1組を各々用いた。各増幅に用いるプライマーの塩基配列等を表1に示す。

(3) 内部標準の調製

遺伝子増幅に定量性を持たせるため、ボツリヌスE型菌およびセレウス菌（嘔吐型）より調製した菌体DNAを用い、内部標準を作製した。内部標準調製用のプライマーの塩基

配列は以下のとおりである。

ボツリヌスE型毒素遺伝子内部標準

BotEinF:5' -CAGCGGTTGTCAAGAATTTTATTGGAT
AATCCAGAGAG-3' (Forward)

BotEinR:5' -ATTAGCTTTTGACAGTCTTCTAATAAAA
TCCCTCTCG-3' (Reverse)

PCR product 240-bp

レシチナーゼ遺伝子内部標準

BcinF:5' -GAGTTAGAGAACGGTATTTATGCTGCGCACA
TTTGCTTCACATTC-3' (Forward)

BcinR:5' -CTACTGCCGCTCCATGAATCCAATACCCATT
TCCATCCG-3' (Reverse)

PCR product 350-bp

(3) 鋳型DNAの調製

増菌培養液からの鋳型DNAの調製についてはキット (Dr. GeneTLE™, 錫) を用いる。

培養操作を行わずに直接食品試料から細菌DNAを調製する場合はアクロモペプチダーゼ処理-セバジーン抽出法によることとし、その概要は以下のとおりである。

- 1) 試料液の1mlをマイクロチューブにとり、これを15,000rpmで3分間遠心する。
- 2) 沈渣100 μ lのTE緩衝液に浮遊させ、1 μ lのアクロモペプチダーゼ (和光純薬, リン酸緩衝液に5万U/mlに溶解) を加え、55 $^{\circ}$ Cで10分間加温する。
- 3) セバジーン試薬IIを100 μ l入れ、緩やかに混和する。
- 4) セバジーン試薬III700 μ lおよび、試薬IV400 μ lを加え、乳濁化するまで約10秒間激しく攪拌し、15,000rpmで10分間遠心する。
- 5) 上層を新しいチューブに回収し (約500 μ l)、試薬Vを50 μ l、グリコゲン (2 μ g/ μ l) を10 μ l加えて混和する。
- 6) イソプロピルアルコールを500 μ l加え、遠心する。
- 7) 70%エタノールを加えて遠心する。
- 8) 減圧下で乾燥させる。
- 9) 50 μ lの蒸留水に溶解し、これを鋳型DNAとする。

C. 研究結果と考察

(1) 菌株より抽出したDNAを基質とするPCR

A~F型までのボツリヌス菌より調製したDNAを基質とするPCRにより、283-bp (type A), 315-bp (type B), 290-bp (type C), 497-bp (type D), 266-bp (type E), 332-bp (type F) の型特異的増幅産物が検出された。各増幅産物は制限酵素処理により、予想されたサイズのフラグメントに切断された。これを図1に示す。PCRによる各型の毒素遺伝子の検出は、マウスを用いた毒性試験とその中和試験での結果と完全に一致した。

(2) 内部標準によるPCRの定量性

今回は芽胞形成細菌を対象とした試験を実施することができなかった。しかし、今回たまたま赤痢菌 (*S. sonnei*) を対象として、内部標準を用いたPCRの定量性について検討する機会を得たので報告する。プライマーは赤痢菌および細胞侵入性大腸菌の侵入因子をコードする遺伝子を増幅する *invE* 遺伝子増幅用プライマーを用いた。 *invE* 増幅用プライマーによる増幅断片および内部標準の増幅断片のサイズは各々382-bpおよび333-bpである。菌株より調製した鋳型DNAを10倍階段希釈し、各々の希釈溶液にコピー数が 10^4 個になるように調製した内部標準を加えて競合PCRを行うと各レーンに2本のバンドが増幅され、バンドの太さが同じ太さであるレーン6の試料中のコピー数が 10^4 個であると判定された。

以上の結果から、今回用いたボツリヌス毒素遺伝子増幅用プライマーは検出感度と特異性にすぐれ、また、赤痢菌において実施した内部標準によるPCRの定量性の有用性が確認されたので、今後、食品中の芽胞形成細菌の迅速検出に応用が可能であると結論づけられた。

表1 遺伝子増幅法に用いるプライマー等の一覧

Toxin type	Oligonucleotide primers				Digestion pattern	
	Name	Sequence	Nucleotide position	Product (bp)	Enzyme	Flagment (bp)
A	<i>CbAF</i>	5' -TGCAGGACAAATGCAACCAGT-3'	78~98	283	<i>Hpa</i> I	246 + 37
	<i>CbAR</i>	5' -TCCACCCCAAAATGGTATTCC-3'	340~360			
B	<i>CbBF</i>	5' -CCTCCATTGCGAGAGGTACG-3'	70~90	315	<i>Ssp</i> I	167 + 148
	<i>CbBR</i>	5' -CTCTTCGAGTGGAACACGTCT-3'	364~384			
C	<i>CbCF</i>	5' -ATACACTAGCTAATGAGCCTG-3'	80~100	290	<i>Rsa</i> I	155 + 135
	<i>CbCR</i>	5' -TGGAGTATTGTTATTCCCAGG-3'	349~369			
D	<i>CbDF</i>	5' -GTGATCCTGTTAATGACAATG-3'	32~52	497	<i>Rsa</i> I	332 + 165
	<i>CbDR</i>	5' -TCCTTGCAATGTAAGGGATGC-3'	508~528			
E	<i>CbEF</i>	5' -CAGGCGGTTGTCAAGAATTTTA-3'	68~89	266	<i>Aha</i> III	184 + 82
	<i>CbER</i>	5' -ATTAGCTTTTGACAGTTCTTC-3'	313~333			
F	<i>CbFF</i>	5' -CAATAGGAACGAATCCTAGTG-3'	152~172	332	<i>Aha</i> III	220 + 112
	<i>CbFR</i>	5' -ATCAGGTCCTGCTCCCAATAC-3'	463~482			
G	<i>CbGF</i>	5' -GATGGAACCATTCAATGACC-3'	63~82	488	<i>Aha</i> III	171 + 317
	<i>CbGR</i>	5' -ATATTGGGGAATGGCCATTC-3'	531~550			

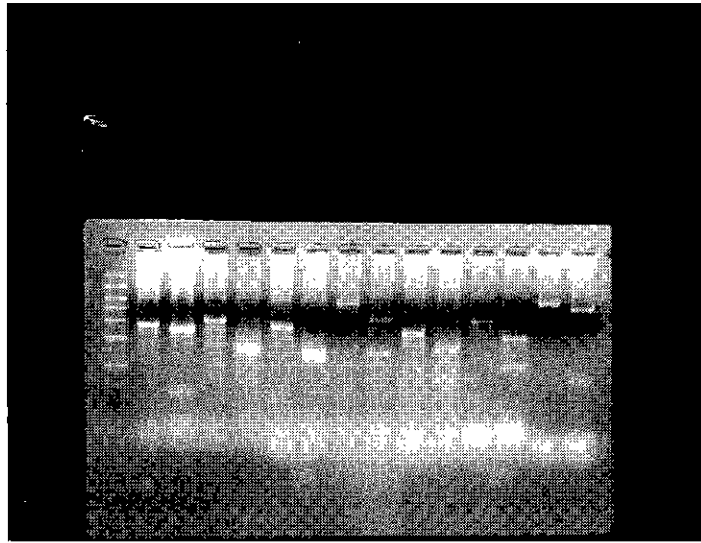


図1 ボツリヌス毒素遺伝子の増幅と増幅断片の切断パターン

競合PCRによる標的DNAの半定量

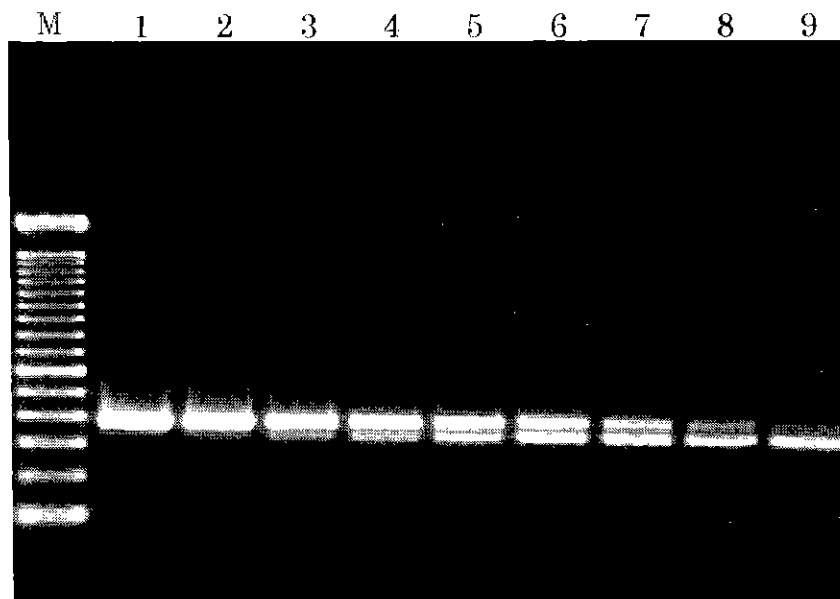


図2 競合PCRによる赤痢菌 *invE* gene の半定量