

表 2. 抗体産生ハイブリドーマ形成数

Fusion No.	ハイブリドーマ 形成率 (%)	抗体産生ハイブリドーマ		中和抗体産生ハイブリドーマ	
		A型	B型	A型	B型
1	89.7	2	1	0	0
2	76.7	0	0	0	0
3	93.0	4	2	0	0
4	88.0	6	5	0	0
5	92.1	5	4	2	0

# 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

### ボツリヌスC型、D型中毒に対するワクチンに関する研究

主任研究者 小熊 惠二 岡山大学・医学部・細菌学講座・教授

協力研究者 藤永 由佳子 岡山大学医学部  
井上 薫 〃  
横田 憲治 〃  
ナズラマホモティ 〃

**研究要旨** 現在、オーストラリアでは放牧により飼育されている牛がC、D型ボツリヌス中毒により死亡するケースが多くなってきている。これまでに開発されている牛用のワクチンは神経毒素をホルマリンやグルタルデヒドで変性させ、無毒化したものを筋肉注射あるいは静脈注射して使用している。これらのワクチンは安全性の面で不安が残る上に、抗体の持続性も低いという欠点がある。そこで、ボツリヌス菌の培養上清中あるいは食品中で神経毒素と会合している無毒成分をワクチンとして用いることにより、安全でより効果的なワクチンの作成を試みた。以前の研究から神経毒素は産生せず、無毒成分のみを産生する変異株(C)-N71が得られていたので、この菌株の培養上清から無毒成分のみを精製し、抗原（ワクチン）として使用した。このほかに、神経毒素-無毒成分複合体から精製した無毒成分、大腸菌で発現させた無毒成分のサブコンポーネントを抗原として使用し、マウスを用いてワクチンの効果を調べた。

#### A. 研究目的

ボツリヌス神経毒素は、抗原性によりA～G型の7種に分類されており、菌もそれに伴いA～G型に分類されている。これらの神経毒素は、培養上清中では無毒成分と結合して複合体 (progenitor toxin, pTox) を形成している。C型とD型菌は神経毒素(neurotoxin, nTox, 分子量約15万)と血球凝集 (HA) 活性を持たない無毒成分 (NTNH, 分子量約14万) から成る12S毒素(nTox+NTNH, 分子量約30万)と、これにHA活性を持つ無毒成分 (HA, 分子量約20万) が結合した16S毒素(nTox+NTNH+HA, 分子量約50万)の2種類のpToxを産生する。これまでに我々は、C型菌が産生するpToxを精製し、また、その構造遺伝子の全塩基配列を決定することにより、無毒成分の構造と機能の解析を行ってきた。その結果、

1) HAは分子量約33k、23-22k、53kの

各サブコンポーネントより成る（これらをそれぞれHA1、HA2、HA3a、HA3bと命名）、

2) HA3a、HA3bはまずHA3（分子量約70K）が作られた（翻訳された）後、プロセッシングがおこり形成される、

3) HAは赤血球のみならず小腸上皮細胞への結合に関与している。従って16S毒素のみが効率よく小腸より吸収される、

4) HAの各成分を人工合成し、その性状を調べたところ、HA1、HA3bが細胞への結合に関与している、5) C型とD型の無毒成分のアミノ酸配列は同一である、ということを見いだした。

以前から、C型菌(C-ST)をニトロソグアニジン処理することによって得られた無毒株、(C)-N71、の培養上清は、神経毒素活性を有しないにも関わらず、HA活性を示すことが知られていた。今回、(C)-N71株の蛋白を精製したところ、この菌

はnToxは産生しないが、他の菌と同一の無毒成分(NTNH+HA)を産生することを認めた。以上のことから

1) 16S毒素より精製した無毒成分(NTNH+HA)、2) (C)-N71より精製した無毒成分(NTNH+HA)、3) 大腸菌を用いて合成した各HA成分(HA1、HA2、HA3a、HA3)を用いて、これらがボツリヌス中毒予防のワクチンとして利用できるかを調べた。なお本実験では、大腸菌易熱性毒素(LT)の変異体をアジュバントとして用いたが、本品は藤田保健衛生大学の辻孝雄教授より分与して頂いた。

## B. 研究方法

### 1. 16S毒素より無毒成分の精製

常法に従いボツリヌスC-ST株の培養上清から精製した16S毒素を50mM Tris-HCl (pH 8.5)に透析して神経毒素と無毒成分を分離させた後、DEAE-Toyopearl 650Mによるカラムクロマトグラフィーを行い無毒成分を分離精製した。神経毒素は静脈注射および皮下注射では100 pgでもマウスに対して致死活性を示すため、標品は0.6%ホルマリン、20 mMりん酸緩衝液(pH 6.0)に一週間透析して無毒化した後使用した。

### 2. (C)-N71より無毒成分の精製

C型菌N-71株を35℃で5日間培養し、得られた培養上清を60%飽和の硫酸アンモニウムで分画し、10 mMりん酸緩衝液(pH 6.0)に透析し、透析中に生じた沈殿を遠心により分離した。得られた沈殿を50 mM酢酸緩衝液(pH 4.2)に透析した後、SP-Toyopearl 650M、Hydroxyapatiteによるカラムクロマトグラフィーを行い、HA活性を指標としてHAを含む無毒成分を精製した。

### 3. HA1、HA3b、HA3リコンビナント蛋白の作製

それぞれのHA成分に対応するプライマーを作製し、PCR法によりそのコード領域を増幅した。増幅産物をBamh1とSal1で処理し、pGEX5X-3 (ファルマシア)のBamh1とSal1部に組込み、大腸菌DH5 $\alpha$ に導入した。培養後、菌体の超音波破碎物により glutathione affinity columnを用いて各蛋白を精製した。

### 4. 免疫方法

抗原蛋白質に大腸菌LTの変異体をアジュバントとして加え、経鼻と経口から接種を行った。一匹のマウスに一回につき10~15  $\mu$ gのC-ST株無毒成分あるいは(C)-N71株無毒成分と10  $\mu$ gのLTの混合溶液を接種した。大腸菌で発現させたHAのサブコンポーネントを抗原として用いた場合には、各サブコンポーネント15~50  $\mu$ gに10  $\mu$ gのLTを加えて接種を行った。

最後の接種から10日後に3 x 10<sup>4</sup>、または3 x 10<sup>5</sup> MLDのC型とD型の16S毒素混合液を経口投与してワクチンの効果を観察した。

## C, D 研究結果、考察

結果を表1に示した。C-ST株の無毒成分を5回経鼻接種したマウスは経口投与された16S毒素に対して強い抵抗性を示し、3 x 10<sup>5</sup> MLDの毒素を投与した場合でも、症状さえも観察されなかった。これに対して、(C)-N71株の無毒成分やリコンビナントのHAのサブコンポーネントの混合溶液を5回経鼻接種したマウスは、免疫を行っていないマウスに比較して、死亡までに要する時間に

やや遅延が認められた。経口投与する16S毒素を $3 \times 10^4$  MLDに下げた場合、(C)-N71株の無毒成分を5回経鼻接種したマウスは毒素に対して抵抗性を示したが、リコンビナントのHAのサブコンポーネントを抗原としたマウスは、死亡までに要する時間に遅延が認められたのみであった。(C)-N71株の無毒成分を経口から4回接種したマウスは毒素に対する抵抗性を全く示さなかったが、経鼻接種を1回行った後に経口接種を3回行ったマウスは経鼻接種を5回行ったマウスと同程度の抵抗性を示した。

これらの結果から、今回抗原として用いた3種類の蛋白質のなかでは、C-ST株の無毒成分がワクチンとして最も効果的であることが明らかになった。さらに接種方法を変化させた実験の結果から、経口接種よりも経鼻接種が効果的であることが判明した。

次に、これらの抗原と接種方法で免疫されたマウスの血清と腸管の洗浄液の、無毒成分に対する抗体価をELISAにより測定した。毒素の経口投与の実験から予想された通り、C-ST株の無毒成分を抗原としたマウスが、血清、腸管洗浄液共に最も高い抗体価を示した。(C)-N71株の無毒成分を1回経鼻接種したマウスではわずかに抗体価の上昇が観察されたが、経口接種4回のマウスでは全く観察されなかった。その他のマウスはほぼ同じ程度の抗体価を示した。

以上の結果から、マウスに無毒成分を経鼻免疫することによって、抗体価が上昇し、毒素に対する抵抗性が上昇することが明らかになった。また、血清、腸洗浄液においてより高い抗体価を示したマウスが毒素に対してより強い抵抗性を示すことが判明した。

## E. 結論

今回の結果から、無毒成分を用いてマウスを免疫することによって、完全ではないがある程度ボツリヌス毒素の経口毒性を抑制する効果があることが明らかになった。また、接種方法としては経口よりも経鼻の方が非常に効果的であることが示唆された。

今後、更に効果的なワクチンの開発のために、抗原蛋白質、投与方法、投与回数について検討を進めて行きたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Y. Fujinaga, K. Inoue, M. Ito, T. Nomura, J. Sasaki, C. Marvaud. M. R. Popoff, S. Kozaki, and K. Oguma.

Identification and characterization of adhesive subcomponents of the haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin. Microbiology. (投稿中)

2) K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Honke, K. Yokota, T. Ikeda, T. Ohyama, K. Takeshi, T. Watanabe, K. Inoue, and K. Oguma. Characterization of hemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins, and one subcomponent of Ha (HA1). Microbiology. (投稿中)

### 2. 学会発表

1) 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 ボツリヌス 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)

- 2) 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 ボツリヌス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, (1998)
- 3) K. Oguma, K. Inoue, Y. Fujinaga, K.  
Yokota, N. Mahmut, T. Tsuji, L.  
Hughes, and R. Hirst. Nontoxic  
compnents associated with *C.*  
*botulinum* type C neurotoxin can be  
used as vacine against both type C  
and D food-borne botulism.  
IXth Congress of Bacteriology &  
Applied Microbaiology and Mycology  
(第9回 細菌学及び応用微生物学  
会議) (IUMS発表予定)

表1. 各抗原のワクチン効果

抗 原	免疫方法	ワクチン効果 チャレンジ毒素量		抗体価上昇
		$3 \times 10^4$	$3 \times 10^5$	
C-ST (NTNH+HA)	鼻×5	ND	+++	↑
(C)-N71 (NTNH+HA)	鼻×5	+++	±	↑
HA1+HA2+HA3	鼻×5	±	±	↑
HA1+HA3b	鼻×5	ND	±	↑
(C)-N71 (NTNH+HA)	鼻×1, □×3	+++	±	↑
"	□×4	—	—	→

ND, not done