

19990447

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11年度研究報告書

平成12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11年度報告書

### 目 次

1. 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)	1
2. 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)	8
3. 分担研究報告			
分担研究者	武士 甲一	(北海道立衛生研究所食品科学部)	18
4. 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)	24
5. 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疫学講座)	29
6. 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)	36
7. 分担研究報告			
分担研究者	松田 守弘	(甲子園大学栄養学部)	46

# 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 本研究班は以下の研究内容を検討している。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や環境の汚染の調査、2) ボツリヌス菌や毒素の迅速診断法の開発、3) 突然死と乳児ボツリヌス症の関係の調査、4) ボツリヌス中毒の治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製、5) トリヤウシの中毒予防のためのワクチンの開発、6) 破傷風治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製。これらに関し、これまでに得られた結果は以下のようにまとめられる。1) 市販されている粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖など120品目を検査したところ、中国産の蜂蜜1品目がD型により汚染されていた。2) 由来の異なるE型毒素を産生するブチリカム菌をPFGEで解析したところ、それぞれ異なるプロファイルを示した。3) ボツリヌスA～G型毒素および破傷風毒素遺伝子同定用のPCR法を開発した。さらに、A、B、E型毒素遺伝子のコピー数を推察出来る競合PCR法、およびそれら毒素の存在を、特異性と感度良く簡便に判定出来る逆受身ラテックス凝集反応を開発した。4) 安全で効果の高いボツリヌスA、B、D、F型沈降トキソイドを作製した。5) 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型で中和抗体を産生しているクローンが3種類確立された。6) 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、毒素量が少ない場合には、C型、D型の両方の食中毒を防げることが判明した。赤血球や腸管上皮細胞への結合の際には、A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。7) 安定して高中和性ヒト型抗毒素モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、そのFabフラグメントの遺伝子をクローニングした後、重鎖、軽鎖の可変部遺伝子をリンカーを用いてタンデムに結合し、これを大腸菌を用いて発現させたところ、中和活性を持つ一本鎖の組換え抗体フラグメントが作製できた。

#### (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 獣医疫学講座 教授  
武士甲一 北海道立研究所 食品科学部 主任研究員

松田守弘 甲子園大学栄養学部 教授

#### 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例は野菜スーパが原因か）のものが5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、より迅速で簡単な診断方法を開発し、食品の汚染を検査したい。また、近年、E型ボツリヌス毒素を産生するブチリカム菌による食餌性中毒や乳児ボツリヌス症が報告されている。ブチリカム菌は動物の腸内にも棲息しているので、本菌の環境汚染の実態を調査したい。乳児の突然死とボツリヌス中毒の関係を調査することおよび治療用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も必要なことと思われる。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) 食品および土壌の汚染調査、ブチリカム菌の分子疫学調査

a) 乳児が摂食する可能性のある食品のボツリヌス菌による汚染調査を昨年度に引き続き同様の方法で20検体行った。

b) 石川県浅野川流域15ヶ所より土壌を採取し検査した。1土壌試料につき1gの土壌試料を5本のchopped-meat-glucose培地(10ml)に摂取し、30℃にて5日間培養した後、その培養上清をマウス毒性試験に用いた。

c) E型毒素産生ブチリカム菌の疫学を行うため、イタリアの乳児ボツリヌス症(1986)由来2株、中華人民共和国での食中毒(1997)由来6株、中華人民共和国の土壌由来株5株の計13株、および毒素を産生しない通常のブチリカム菌2株のバルスフィールド電気泳動(PFGF)を行

った。制限酵素としてはSmaIとXhoIを用いた。

## 2) 迅速検出法の開発

既に毒素遺伝子を同定するPCR法を開発したので、食品を汚染している毒素遺伝子のコピー数(菌数)を推察するための競合PCRを開発した。PCRにより増幅される各毒素遺伝子にそれぞれ対応する内部標準増幅用プライマーを作製し競合PCRを行った。

A、B、E型毒素の存在を確認するための逆受身ラテックス凝集反応(RPLA)をデンカ生研と共同で開発した。各精製毒素を家畜に免疫し、抗毒素血清を作製した。抗体をアフィニティカラムを用いて精製した後、ラテックスに結合させた。

## 3) ボツリヌス毒素に対する人型モノクローナル抗体の作製

A、B、E、F型毒素を精製し、フォルマリンで無毒化した。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。本トキソイドを4名のボランティアに1ヶ月間隔で4回皮下接種した。抗体上昇の高いヒトより末梢リンパ球を採取し、ヒト/マウスのヘテロミエロマ細胞であるRF-S1株と50%ポリエチレングリコールで融合させた。得られた抗体産生細胞のクローニングを数回行い、中和活性を持つ抗体産生単クローン細胞の分離を試みると共に、その抗体の毒素との反応性および中和活性をそれぞれELISA、マウスを用いた中和試験で調べた。また、得られた抗体産生細胞を牛胎児血清(FCS)非存在下で増殖させるため、FCS量を減少させた培地で培養した。

## 4) トリ、ウシ用ワクチンの開発

ボツリヌスC型、D型毒素はトリやウシに中毒をきたす。C型、D型の神経毒素の抗原構造は複雑であるが神経毒素に結合している無毒成分はほとんど同一である。無毒成

分には赤血球凝集活性を示すもの (HA) と示さないものが存在するが、HAは赤血球のみならず腸上皮細胞に高い親和性で結合するため、毒素の吸収を効率よくさせる。本研究では無毒成分に対する腸管免疫を亢進させ中毒の予防に利用することを考えている。

HAはHA1 (~33kDa)、HA2 (~17kDa)、HA3a (~23kDa)、HA3b (~53kDa) より成るが、どのサブコンポーネントが腸上皮細胞や赤血球に結合するのかわ、またそのレセプターは何であるかを決定するため、A型とC型の各サブコンポーネントをGST融合蛋白として大腸菌を用いて合成し、これらをモルモットの腸上皮細胞の切片やヒト赤血球より抽出した糖蛋白や糖脂質に反応させた。

#### 5) 破傷風毒素に対するヒト型モノクローナル抗体の作製

ボツリヌス毒素と非常に類似した破傷風毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体を産生する融合細胞は既に5株確立されている。ヒトに安全に使用できる中和抗体を大量生産するため、大腸菌を用いて一本鎖組み換え抗体フラグメント (ScFv) を産生させる方法を試みた。最も中和能の高いG6株 (毒素の $\beta$ フラグメントを認識している) よりmRNAを抽出し、RT-PCR法により抗体可変部領域をコードするcDNA断片を単離した後、pBluescript SK-ベクターに導入した。次いでこのベクターに組み込んだVH、VK (G6株の軽鎖は $\kappa$ である) のcDNA断片をオリゴヌクレオチドリンカーを介して結合させ、pCANTAB5Eファージミドのg3シグナルとE-タグ、アンバーコドン (TAG) の間に導入した

(pCANTAB5E-G6と命名)。

cCANTAB5E-G6をko7ヘルパーファージと共に大腸菌の非アンバーサブレッサー株 (TG1株) に感染 (形質転換) させ、破傷

風トキソイドをコートした96穴プレートを用いたELISA (パンニング法) により、ScFvを産生しているファージを選択した。パンニング法を3回繰り返し得られた24個のファージクローンより最も破傷風トキソイドとの反応が強いクローンを同定した (pScFv-G6と命名)。次いでファージpScFv-G6をサブレッサー株 (HB2151株) に感染させ可溶性のScFvを産生させた。本抗体が菌の培養上清中あるいは抗E-タグ抗体を用いたELISAやウェスタンブロット法により解析したところ、細胞質過分に多く認められたので、これを硫酸分画、Sephadex G-75、Toyopal SPイオン交換カラムを用いて精製した。

(倫理面での配慮)

患者さんや乳児よりの便の採取、ボランティアへのワクチンの接種に際しては十分な説明を行い、親あるいは本人の承諾を得ている。ワクチン接種時には少量をまず皮内接種し、アレルギー反応が無いことを確かめている。全ての動物実験は、各施設の動物実験委員会の許可を得ており、使用後の実験動物に関しても、規定通り処置している。

#### C. 研究結果

本研究班は以下の研究内容を検討している。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や環境の汚染の調査、2) ボツリヌス菌や毒素の迅速診断法の開発、3) 突然死と乳児ボツリヌス症の関係の調査、4) ボツリヌス中毒の治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製、5) トリやウシの中毒予防のためのワクチンの開発、6) 破傷風治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製。これらに関し、これまでに得られた結果は以下のようにまとめられる。1) 市販されている粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖など12

0品目を検査したところ、中国産の蜂蜜1品目がD型により汚染されていた。2)由来の異なるE型毒素を産生するブチリカム菌をPFGEで解析したところ、それぞれ異なるプロファイルを示した。3)ボツリヌスA~G型毒素および破傷風毒素遺伝子同定用のPCR法を開発した。さらに、A、B、E型毒素遺伝子のコピー数を推察出来る競合PCR法、およびそれら毒素の存在を、特異性と感度良く簡便に判定出来る逆受身ラテックス凝集反応を開発した。4)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。5)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型で中和抗体を産生しているクローンが3種類確立された。

6)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、毒素量が少ない場合には、C型、D型の両方の食中毒を防げることが判明した。赤血球や腸管上皮細胞への結合の際には、A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。7)安定して高中和性ヒト型抗毒素モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、そのFabフラグメントの遺伝子をクローニングした後、重鎖、軽鎖の可変部遺伝子をリンカーを用いてタンデムに結合し、これを大腸菌を用いて発現させたところ、中和活性を持つ一本鎖の組換え抗体フラグメントが作製できた。

#### D. 考察

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や環境の汚染の調査；これまでの検査では粉ミルク、ベビーフードなどは“安全”であることが確認されたが、今後もさらに検討する予定である。E

型毒素を産生するブチリカム菌による土壌の汚染調査を、石川県のみならず全国的に行いたい。また、中華人民共和国の土壌および同国やイタリアで発生した中毒由来株の相違点の詳細を明らかにし、このような菌が出現した機序を解明したい。2)ボツリヌス菌や毒素の迅速診断法の開発；今回開発したPCR法、競合PCR法、および逆受身ラテックス凝集反応が、実用に使用できるかを検討し、結果がよければ大量に作製し、市販したい。3)突然死と乳児ボツリヌス症の関係の調査；再度、各病院に検体の提出を依頼し、調査を進めたい。4)ボツリヌス中毒の治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製；A型を認識する3クローンが得られたので、これらの実用化を検討したい。また、他の型の毒素を中和するモノクローナル抗体も得るよう努力したい。5)トリやウシの中毒予防のためのワクチンの開発；トキシイドや無毒成分を用い、腸管免疫を含む免疫系を高めると良い効果がえられたので、今後は、本方法が実際に問題が起きているプロイラー、野鳥、牛などで応用可能であるかを検討したい。6)破傷風治療のためのヒト型モノクローナル抗体の作製；大腸菌を用いて中和活性を持つ一本鎖の組換え抗体フラグメントが作製できたので、今後、このクローンを用い大量生産の系を開発し、実用化を目指したい。

#### E. 結論

これまでに行ったことおよび判明したことは以下のようにまとめられる。

1)市販されている粉ミルク、ベビーフード、蜂蜜、砂糖など120品目を検査したところ、中国産の蜂蜜1品目がD型により汚染されていた。

2)由来の異なるE型毒素を産生するブチリカム菌をPFGEで解析したところ、それ

ぞれ異なるプロファイルを示した。

3) ボツリヌスA~G型毒素および破傷風毒素遺伝子同定用のPCR法を開発した。さらに、A、B、E型毒素遺伝子のコピー数を推察出来る競合PCR法、およびそれら毒素の存在を、特異性と感度良く簡便に判定出来る逆受身ラテックス凝集反応を開発した。

4) 安全で効果の高いボツリヌスA、B、D、F型沈降トキシドを作製した。5) 上記のトキシ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型で中和抗体を産生しているクローンが3種類確立された。

6) 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、毒素量が少ない場合には、C型、D型の両方の食中毒を防げることが判明した。赤血球や腸管上皮細胞への結合の際には、A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。

7) 安定して高中和性ヒト型抗毒素モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、そのFabフラグメントの遺伝子をクローニングした後、重鎖、軽鎖の可変部遺伝子をリンカーを用いてタンデムに結合し、これを大腸菌を用いて発現させたところ、中和活性を持つ一本鎖の組換え抗体フラグメントが作製できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inoue, K., 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). *Microbiol.* 145: 2533-2542, 1999.

- 2) Watanabe, T. Y. Sagane, H. Kouguchi, H. Sunagawa, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Oguma, and T. Ohyama. Molecular composition of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain 6813. *J. Protein Chemistry.* 18: 753-760, 1999.
- 3) Fujinaga, Y. K. Inoue, T. Nomura, J. Sasaki, J. C. Marvaud, M. R. Popoff, S. Kozaki, and K. Oguma. Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett.* 467: 179-183. 2000.
- 4) Oguma, K., Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., and Inoue, K. Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J. Toxicol. Toxin Reviews* 18:17-34, 1999.
- 5) Oguma, K., Y. Fujinaga, K. Inoue, K. Tomochika, T. Watanabe, K. Takeshi, T. Ohyama and K. Inoue. Structure and function of progenitor toxins produced by *Clostridium botulinum* type A, C, D, and E. p. 35-40, In Howard S Tranter (ed.) : Oxford (UK) Conference 1996 8th -11th July : Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. 1999.
- 6) Oguma, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., and Yokota K. Botulism: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis in *Clostridium botulinum*. p.273-293. In Linz J. E., Bhatnagar D., Stein M. A.,

and Cary J. W. (eds). : Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. ; Technomic Publishing Co., Inc., (USA). 1999.

- 7) Meng, X., Yamakawa, K., Zou, K., Wang X., Kuang, X., Lu, C., Wang, C., Karasawa, T. and Nakamura S. Isolation and characterization of neurotoxigenic *Clostridium butyricum* from soil of China. J. Med. Microbiol. 48: 133-137, 1999.
- 8) Kamata, Y., R. Tahara. and S. Kozaki. Difference in hydrophobicity between botulinum type B activated and non-activated neurotoxin under low pH conditions. Toxicon, in press
- 9) Matsuda M., M. Takahashi, D-L. Lei and N. Sugimoto. Improved vaccines and treatments of tetanus on the basis of the structure and function of the tetanus toxin molecule, to reduce tetanus deaths to zero. In H. S. Tranter(ed.), Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. Proceeding of International Conference Oxford. CAMR pp.22-29, 1999.

## 2. 学会発表

- 1) K. Oguma, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Yokota, N. Maphomaty, T. Tsuji, L. Hughes, and R. Hirst. Nontoxic components associated with *C. botulinum* type C neurotoxin can be used as vaccine against both type C and D food-borne botulism. IXth International Congress of Bacteriology & Applied Microbiology. (IUMS) Sydney, Australia. (1999. 8. 16-20)

- 2) K. Oguma, K. Inoue, Y. Fujinaga, A. Arimitsu, K. Yokota, Y. Sakaguchi, N. Maphomaty, and T. Tsuji. Significance of the nontoxic components associated with *Clostridium botulinum* neurotoxins. International Conference 1999: Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins. Florida, USA. (1999. 11. 15-19)
- 3) 井上薫, 藤永由佳子, 横田憲治, ナズラマホモテイ, 渡部俊弘, 武士甲一, 大山徹, 井上勝弘, 小熊恵二 ポツリヌス progenitor toxin 無毒成分の構造と機能の解析 第46回毒素シンポジウム 岩手 (1999)
- 4) ナズラマホモテイ, 井上薫, 藤永由佳子, 有満秀幸, 阪口義彦, 長町榮子, 小熊恵二 ポツリヌスC型菌の産生する赤血球凝集素に対するモノクローナル抗体の作製とその性状 第52回中国・四国支部会, 日本細菌誌 54 (1999)
- 5) 井上薫, 藤永由佳子, 渡部俊弘, 武士甲一, 大山徹, 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回日本生化学会大会 (1999. 10. 6~9)
- 6) 小熊恵二 ポツリヌス中毒; その基礎と臨床 第69回日本感染症学会西日本地方会総会 (1999. 11. 25~26)
- 7) 円谷悦造, 塚本義則, 小熊恵二 ポツリヌス菌およびカンピロバクターに対する食酢の抗菌作用 第20回先端技術講演会 (第3回共同研究成果報告会) (1999. 11. 26)
- 8) 小熊恵二 ポツリヌス Progenitor toxin の構造と機能 長崎大学熱帯医学研究所研究集会「細菌感染メカニズムの分子生物学的解析」 (1999. 12. 10)



- 9) 王 興民, 前側恒男, 唐澤忠宏, 刑部陽宅, 山川清孝, 小崎俊司, 加藤はる, 中村信一 神経毒素産生性 *Clostridium butyricum* の分子疫学解析 第36回日本細菌学会中部支部総会 金沢 (1999. 10)
- 10) 武士甲一 PCR法を用いたボツリヌス菌の検査法について 衛生微生物技術協議会第20回研究会 49頁 名古屋 (1999. 7)
- 11) 宮原倫子, 木全直樹, 三和奈緒子, 樋口千恵子, 久保和雄, 阿岸鉄三, 高橋元秀, 二瓶 宏 免疫吸着法により症状が改善したボツリヌス中毒神経障害患者の一例 日本透析医学会 横浜 (1999. 6)
- 12) 小崎俊司, 木村紀代, 向本雅郁, 塚本健太郎, 森本文宏, 居原 秀 ボツリヌスB型毒素受容体シナプトタグミン II 分子の毒素認識に関与するアミノ酸の同定 第46回毒素シンポジウム 岩手 (1999)
- 13) Matsuda, M., M. Katahira, M. Kamei, S. Hashizume. Immunology of tetanus toxin-Anti-tetanus, immunogenic toxin fragments and human monoclonal antibodies. 5th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins Plenary Lecture Abstr. p.32, Pattaya, Thailand(Oct. 12-15, 1999)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 武士 甲一 (出願中)

出題名: ボツリヌス毒素遺伝子検出用プライマー 出願番号: 特願平 6-301310

受付番号: 29420802181

受付日: 平成6年10月31日

2) 発明者: 松田守弘, 亀井優徳  
出願者: 松田守弘, 森永製菓 (株)  
整理番号: KP960089 平8-194095  
平成8年7月5日

# 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

食品のボツリヌス菌による汚染調査とE型ボツリヌス毒素産生性  
*Clostridium butyricum*（ブチリクム菌）のパルスフィールドゲル に関する研究  
電気泳動による解析

（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

1. 平成10年度に引き続き、乳児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、これ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報告は無かった。
2. 乳児が摂食する可能性がある食品20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。中国産蜂蜜1品目の培養液中にD型ボツリヌス毒素が検出され、培養液からDNAを精製してPCRをおこなったところ、毒素遺伝子が検出された。
3. E型ボツリヌス毒素産生性 *Clostridium butyricum*（ブチリクム菌）のイタリア株と中国株をパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）にて解析し、PFGEが本菌の疫学的調査に有用であることを明らかにした。また、本菌の日本の土壌における分布調査を続行中である。

### A. 研究目的

（1）平成10年度に引き続き、乳児突然死とボツリヌス中毒との関係を検討するため、関係医療機関に乳児の突然死症例における検体採取を依頼した。また、乳児が摂食する可能性がある市販食品中におけるボツリヌス毒素産生菌の検索を行った。

（2）E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌は、イタリアの乳児ボツリヌス症例 [Aureli et al., 1986] において1986年に初めて報告され、その後中国の食中毒事例からも分離された [Meng et al., 1997]。1998年には本菌によると推定される食中毒がインドから報告され [Caudhry et al., 1998]、ごく最近、本菌によるintestinal toxicemia botulismの2症例がイタリアで発生した [Fenicia et al., 1999]。このように、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の世界的な分布が明らかとなり、今後本菌によるボツリヌス中毒事例がさらに増加すると思われる。

今回、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌をPFGEにて解析した。また、本菌の日本での存在はこれまで報告がないことから、本菌の土壌からの分離を試みた。

### 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

前年度に準じた [小熊他]。

（2）食品の汚染調査

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1品目、ベビーフード3品目、蜂蜜5品目、砂糖3品目、甘味料3品目、発酵調味料10品目の合計20品目であった。食品検体の処理法については前年度に準じた [小熊他]。

（3）培地・培養、マウス毒性試験、PCR試験

前年度に準じた〔小熊他〕。

#### (4) PFGE

使用したブチリクム菌15菌株は次の通りである。イタリア乳児ボツリヌス症由来2株 (BL 5262, BL 6340), 中国ボツリヌス食中毒事例由来6株 (LCL 155, LCL 063, LCL 095, KZ 1897, KZ 1897, KZ 1899), 中国微山湖周辺土壌由来5株 (KZ 1886, KZ 1887, KZ 1889, KZ 1890, KZ 1891), 2無毒株 (IFO 13949, IFO 3315)。

BHIにて12時間培養した菌体を懸濁液 (10 mM Tris, pH 7.2, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl) にて懸濁し, 1.2%低融点アガロースにてプラグを作製した。プラグを溶菌液 (10 mM Tris, pH 7.2, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2% Na deoxycholate, 0.5% Na lauryl sarcosine, 1 mg/ml lysozyme, 20 U/ml mutanolysin) 中に37°C5時間, さらに洗浄後, 溶解液 (1 mg/ml proteinase K, 100 mM EDTA, pH 8, 50 mM NaCl, 0.2% Na deoxycholate, 1% Na lauryl sarcosine) 中で50°C16時間インキュベーションし, 洗浄後, 制限酵素消化を20時間行った。電気泳動は × 0.5 TBE, 1%アガロースにて, CHEF-DR II (バイオ・ラッド) を使用し, 14°C, 6 V/cm, スイッチタイム3-20秒 (*Sma*I) または3-25秒 (*Xho*I) の条件で行った。

#### (5) 土壌調査

石川県を流れる浅野川15カ所にて土壌を採取した。1土壌試料につき 1 g の土壌試料を5本のchopped-meat-glucose培地 (10 ml) に摂取し, 30°Cにて5日間培養した [Yamakawa, et al., 1988, 1992]。培養上清をマウス毒性試験に用いた [Yamakawa, et al., 1988, 1992]。

### C. 研究結果

#### (1) 乳児の突然死とボツリヌス中毒と

#### の関連調査

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1例も無かったため, 今までのところ, ボツリヌスに関する各種試験は行っていない。Fisher症候群 (多発性神経根炎のひとつ) の1症例の糞便検体においてマウス毒性試験を行ったが, ボツリヌス毒性は検出されなかった。

#### (2) 食品の汚染調査

20品目の市販食品の調査の結果, 蜂蜜1品目においてD型ボツリヌス毒性が検出された。食品試料培養液中の毒性は256 minimum lethal dose (MLD)/mlであった。トリプシン処理によって2048 MLD/mlまで活性が上昇した。食品試料培養液からインスタジーンマトリクス (バイオ・ラッド) を用いてPCR増幅用DNAを簡易精製してPCRを行った場合には, D型毒素遺伝子に相当するバンドがわずかに検出されたが, D型毒素遺伝子検出を断定するには至らなかった。培養液からフェノール・クロロホルム処理を行ってDNAを抽出しPCRを行ったところ, D型毒素遺伝子のバンドが鮮明に検出された (図1)。毒性が検出された蜂蜜は中国産であった。

#### (3) E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌のPFGE

*Sma*I, *Xho*I両制限酵素の切断パターンプロファイルによって3つのクラスターに型別できた (図2)。すなわち, クラスター1: イタリア乳児ボツリヌス症由来株 (BL 5262, BL 6340), クラスター2: 中国ボツリヌス食中毒事例由来株 (LCL 155, LCL 063, LCL 095, KZ 1897, KZ 1897, KZ 1899), クラスター3: 中国微山湖周辺土壌由来株 (KZ 1886, KZ 1887, KZ 1889, KZ 1890, KZ 1891) であった。

無毒2株のプロファイルは, 両制限酵

素においていずれの有毒株とも異なっていた。

#### (4) E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の土壌調査

浅野川15カ所のうち、河口近くの1カ所からC型ボツリヌス毒性が検出されたが、E型ボツリヌス毒性は検出されなかった。

### D. 考察

#### (1) 乳児の突然死とボツリヌス中毒との関連調査

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。また、Fisher症候群の糞便検体においてマウス毒性試験を行ったが、ボツリヌス毒性は検出されなかった。乳児突然死の症例以外であっても、神経症状を伴う原因不明の疾患では積極的にボツリヌス毒素の検索を行う予定である。

#### (2) 食品の汚染調査

本年度の食品調査では1蜂蜜試料からD型ボツリヌス毒素が検出された。今回用いたPCR反応系では、食品試料培養液から毒素遺伝子を検出するには鋳型となるDNAの精製度が重要であると考えられたことから、マウス毒性試験とPCR試験を比較すると、マウス毒性試験の方が多数検体を扱うスクリーニングにおいては優れていると考えられた。ただし、1例のみの検討であるので最終的に結論づけることはできない。今回の調査で明らかのように、(D型ではあったが)改めて蜂蜜におけるボツリヌス菌(芽胞)の混入に対する注意喚起が必要である。

#### (3) E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌のPFGE

今回のE型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌15株はPFGEプロファイルから3つのクラスターに型別することができ

た。その3つのクラスターはそれぞれの株の由来と一致していることから、広範囲な地域における本菌の単クローン的分布が示唆された。従って、PFGE解析は本菌の疫学解析に有効な手段であると考えられる。現在、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の流行・分布を調査するための分子疫学解析手段をさらに検討中である[F-(2)-1, -2]。

#### (4) E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の土壌調査

これまでに我々は中国微山湖周辺の土壌からE型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌を分離し、さらに微山湖近隣に位置する済寧と沛県で起きた過去の2例のE型ボツリヌス中毒がブチリクム菌によることを示した[F-(1)-1, F-(2)-1]。日本国内で発生するボツリヌス中毒は、いずし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い。中国におけるE型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の土壌からの分離を契機として、我々は日本においてもE型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌によるボツリヌス中毒があるのではないかと推測するようになった。今回、本菌の日本の土壌からの分離を試みたが分離されなかった。しかし、本土壌調査は継続していく予定である。なお、今回の浅野川土壌の調査で河口付近の土壌からC型ボツリヌス毒素が検出されたが、その結果は過去における調査と合致していた[Serikawa et al., 1977]。

### E. 結論

1. 乳児突然死の症例検体、流通食品試料におけるボツリヌス菌(毒素)調査は、継続的に行いデータを蓄積することが重要である。
2. 今後日本において、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌によるボツリヌス

症発生を否定できない。本菌における分子疫学的手法の検討の必要がある。

#### 参考文献

小熊恵二他. 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

Aureli, P. et al. (1986) Two cases of type E botulism caused by neurotoxigenic *Clostridium butyricum* in Italy., J. Infect. Dis., 154, 207-211.

Caudhry, R. et al. (1998) Outbreak of suspected *Clostridium butyricum* botulism in India., Emerg. Infect. Dis., 4, 506-507.

Fenicia, L. et al. (1999) Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* type E., Clin. Infect. Dis., 29, 1381-1387.

Meng, X. et al. (1997) Characterization of a neurotoxigenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism., J. Clin. Microbiol. 35, 2160-2162.

Serikawa, T. et al. (1977) Distribution of *Clostridium botulinum* type C in Ishikawa prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *Clostridium botulinum* type C., Microbiol. Immunol., 21, 127-136.

Yamakawa, K. et al. (1988) Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China., Microbiol. Immunol., 32, 579-587.

Yamakawa, K. et al. (1992) Prevalence of *Clostridium botulinum* type E and coexistence of *C. botulinum* nonproteolytic type B in the river of Japan., Microbiol. Immunol., 32, 579-587.

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Meng, X., Yamakawa, K., Zou, K., Wang, X., Kuang, X., Lu, C., Wang, C., Karasawa, T. and S.

Nakamura. (1999) Isolation and characterization of neurotoxigenic *Clostridium butyricum* from soil of China. J. Med. Microbiol., 48, 133-137.

##### (2) 学会発表

1. 第72回日本細菌学会総会 (1999年3月24-26日, 東京). 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. 唐澤忠宏、王 興民、前側恒男、中村信一. (3月25日発表) [日本細菌学雑誌 54, 202, 1999]

2. 第36回日本細菌学会中部支部総会 (10月16-17日, 金沢). 神経毒素産生性 *Clostridium butyricum* の分子疫学解析. 王 興民、前側恒男、唐澤忠宏、刑部陽宅、山川清孝、小崎俊司、加藤はる、中村信一. (10月17日発表)

##### 協力研究者:

前側恒男 金沢大学医学部  
加藤はる 金沢大学医学部  
王 興民 金沢大学医学部  
唐澤忠宏 金沢大学医学部

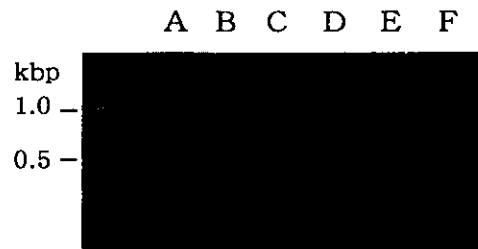


図1. PCR法による蜂蜜試料培養液からのボツリヌス毒素遺伝子の検出  
 レーンA-Fにはそれぞれの毒素型特異的なプライマーを用いたPCR産物を電気泳動した。

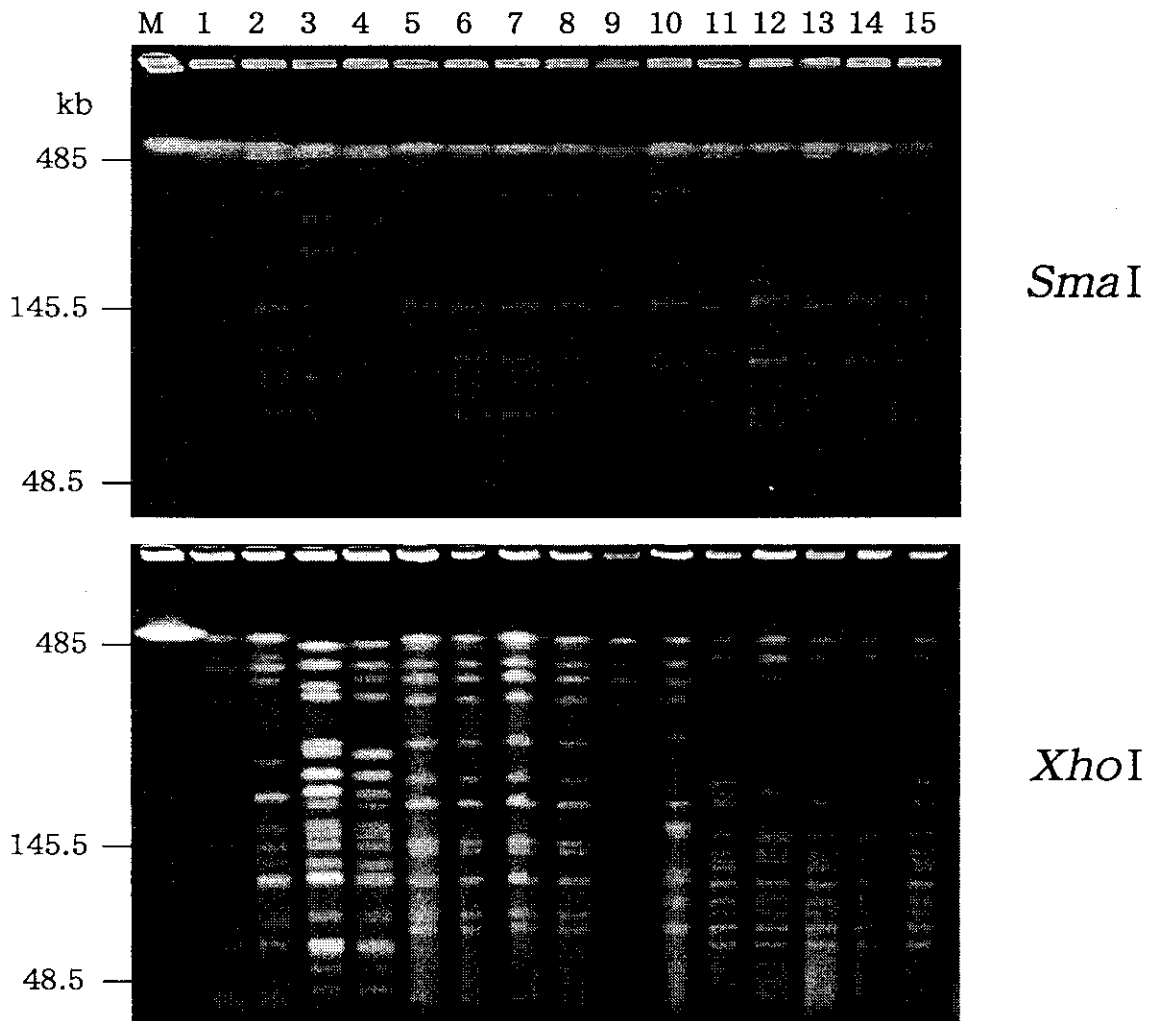


図2. E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌のPFGE

M, 分子量マーカー；レーン1と2, 無毒株（それぞれ IFO 13949, IFO 3315）；レーン3と4, イタリア乳児ボツリヌス症由来株（それぞれ BL 5262, BL 6340）；レーン5から10, 中国ボツリヌス食中毒事例由来株（それぞれ LCL 155, LCL 063, LCL 095, KZ 1897, KZ 1897, KZ 1899）；レーン11から15, 中国微山湖周辺土壌由来株（それぞれ KZ 1886, KZ 1887, KZ 1889, KZ 1890, KZ 1891）。

19990447

p.13-17 は雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Isolation and characterisation of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* from soil in China

X. Meng, K. Yamakawa, K. Zou, X. Wang, X. Kuang, C. Lu, C. Wang, T. Karasawa and S. Nakamura

J. Med. Microbiol. Vol. 48: 133-137, 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

「内部標準を用いた芽胞形成細菌遺伝子の半定量と  
RPLAによるボツリヌス毒素の検出について」に関する研究

（分担）研究者 武士甲一 北海道立衛生研究所 主任研究員

## 研究要旨

ボツリヌス症は致死性の高い疾病で、その診断や食品の衛生検査には常に迅速な対応が求められる。我々は、ボツリヌス症発生時の迅速スクリーニング法としてPCR法及びRPLA法に着目し、各々、菌体より抽出したDNA及びボツリヌス菌の培養上清を用いて実験を行った。PCR法については定量性を考慮し、内部標準を用いた競合PCRをA型、B型及びE型菌について検討した。RPLA試験については、プロゲニタートキシンから無毒成分を除いた神経毒素に対する抗体を用い、感作ラテックスを同じくA型、B型及びE型について調製した。本PCRにおける毒素遺伝子の検出感度は $10^1$ cfu/mlで、競合PCRにおいては $10^3 \sim 10^5$ cfu/mlの範囲で菌数と毒素遺伝子コピー数との間に相関が認められた。RPLAにおける精製毒素の検出感度はA型75pg, B型625pg, E型625pg/0.25mlであった。これらのRPLA試験の結果は特異性と検出感度に優れ、実用に供し得るものであった。今回考案したシステムにより、菌と毒素の迅速スクリーニングの実施が可能となった。

## A. 研究目的

食餌性、創傷性及び乳児ボツリヌス症の病型をとるボツリヌス症は致死性の高い疾病であることが知られており、疾病発生時の診断や原因となる食品や環境材料の衛生検査には常に迅速性が求められる。病原性因子であるボツリヌス毒素はA～G型までの7型に分類されており、疾病発生時に適切な抗毒素量を行うためには、中毒の原因となった毒素の型を早期に同定する必要がある。また、毒素の検定についてはこれまでマウスを用いており、その維持管理や動物愛護による倫理上の問題など種々の制約を受ける。

今回、我々は、現行の検査法の欠点を補い、且つ迅速性、特異性及び検出感度に優れた方法を考案したので報告する。

## B. 研究方法

### (1) 菌株

以下の菌株を用いた。

- C. botulinum* type A strain KZ 2
- C. botulinum* type B strain B-Lamanna
- C. botulinum* type E strain E-Iwanai

### (2) 鋳型DNAの調製

鋳型DNAの調製には、GeneTle™(宝酒造)及びアクロモペプチダーゼ処理後インスタジンによる方法を用いた。

### (3) 内部標準の作製

競合PCRに用いる内部標準は、予め内部標準作製用プライマーで増幅操作を行い、その吸光度( $OD_{260nm}$ )からコピー数を算定した後に $10^3 \sim 10^5$ コピー数に調製して用いた。

### (4) 毒素試料の調製

各菌株をクックドミート培地に接種し、30℃で5日間培養した。培養液を遠心し、その上清を毒素試料としてマウス毒性試験とRPLA試験に供した。

### (5) RPLA試験

最初に精製毒素を用いて凝集力価を求め、次



に菌株の培養上清を用いて同様に凝集力価を求め、その結果をマウス毒性試験の結果と比較・検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、試験に用いたマウスのうち、生残したマウスについては炭酸ガスにより安楽死させた。

## C. 研究結果

### (1) 鋳型DNAの調製

前処理としてアクロモペプチダーゼによる処理を行った場合と行わない場合について、検出感度に違いがあるか否かを検討した。前処理を行ったときの検出感度は $10^1$ cfu/mlであり、前処理を行わない場合は $10^2$ cfu/mlであった (Table 1)。

### (2) 競合PCR

各型毒素遺伝子の増幅用プライマーとその内部標準増幅用プライマーの塩基配列及び増幅産物のサイズをTable 2に示す。各型毒素遺伝子とその内部標準を用いた競合PCRにおいて、内部標準を $10^4$ コピー数に調製すると10倍階段希釈した標的遺伝子との間に定量的関係が認められた。競合PCRを行わず、標的遺伝子とその内部標準の増幅を各々別々のチューブ内で増幅させた場合は内部標準を $10^3 \sim 10^5$ に調製すると、標的遺伝子の増幅バンドと内部標準の増幅バンドとの間に一定の量的関係が成立した。

### (3) 毒素のRPLA試験

各精製毒素 $25 \mu\text{l}$ 中のRPLA試験における凝集力価はA型75pg, B型625pg, E型625pgであった。各株のクックドミート培地での毒力はA型 $2 \times 10^4$ , B型 $2 \times 10^3$ , E型 $4 \times 10^4$ MLD/mlで、これら毒素試料 $25 \mu\text{l}$ 中のRPLA試験における凝集力価は各々2,000倍, 400倍, 4,000倍であった (Table 3, 4)。

## D. 考察

ボツリヌス菌は芽胞の形で食品や環境などに分布する。しかし、その汚染は必ずしも広

汎且つ高密度ではないため、これら食品や土壌及び水を対象としてボツリヌス菌を検出しようとする場合には、より検出感度の高い方法で試験を行わねばならない。また、従来の検査法では毒素の検定にマウスが用いられており、そのためには常にマウスを維持・管理する必要があり、さらにマウスを毒性試験に用いることについては、動物愛護の観点から倫理上の問題が提起されていた。本研究は、これら培養法やマウス試験法の欠点を補い且つ簡易・迅速で検出感度に優れた試験法を考案することを目的とした。

アクロモペプチダーゼ処理後、インスタジーンを用いたDNA抽出法の検出感度は良好で、 $10^1$ 個のボツリヌス菌から調製したDNAにおいてPCR産物が増幅された。食中毒の原因食品はボツリヌス菌による汚染が濃厚であるため、培養操作をすることなく毒素遺伝子の増幅が可能となる。汚染が著しく低い試験材料やPCR阻害物質を多量に含む糞便については、数時間の増菌培養によりその検出が可能である。

PCRによるボツリヌス毒素遺伝子の定性的検出の後、内部標準を用いた競合PCRを行うことにより毒素遺伝子のコピー数を定量することが可能である。同一のPCR反応液中で競合PCRを行う場合には、内部標準のコピー数を $10^4$ 個に調製し、これを各々10倍階段希釈した鋳型DNA溶液(標的遺伝子)に接種して増幅操作を行うと、そのバンドの太さを比較することにより定量性が認められる。すなわち、内部標準のバンドと肉眼的に同じ太さを示すサンプルを認め、その希釈倍率を乗じると鋳型DNA溶液原液の標的遺伝子のコピー数が算定される。内部標準と標的遺伝子の増幅を別々に行う場合は、内部標準のコピー数を $10^3 \sim 10^5$ に調製して増幅を行う。この場合はサイクル数を17回に抑えるため、コピー数の検出感度が $10^3$ 個に低下することと、増幅率の違いによる結果の判断がやや不明確になるという欠点が生じる。しかし、この方

法ではCCD解析ソフトによりバンドの量的な表示が可能となるため、前記の方法より定量性において正確であり、内部標準の定量性は、細菌数から算定される標的遺伝子のコピー数との間に一定の比例関係が成立することが本研究で明らかとなった。

考案されたRPLA試験において、A型、B型及びE型の各毒素間に免疫学的交叉は認められなかった。各精製毒素の検出感度はA型で3ng/ml(75pg/25 $\mu$ l)、B型及びE型では各々25ng/ml(625pg/25 $\mu$ l)であった。A型毒素のマウス致死量を約10pg、B型及びE型毒素の致死量を約100pgと想定すると、本RPLA試験による検出感度は、各々マウス致死量においてA型で7.5MLD、B型及びE型で6.25MLDに相当する。クックドミート培養上清を毒素試料とした場合のRPLA試験における凝集力価はA型で2,000倍、B型で400倍、E型で4,000倍であった。これをマウス致死活性と比較すると、A型で10倍、B型で5倍、E型で10倍の差異が認められた。これらの結果から、本RPLA試験の検出感度はマウス試験の約1/10であり、実際に食中毒で得られる試料の毒素力価が100MLD以上であることから、今回考案されたRPLA試験は実用に供し得るものであると考えられた。

#### E. 結論

ボツリヌス菌を対象として鋳型DNAを調製する場合、アクロモペプチダーゼ処理後インスタジーンによる方法が最も良好であり、内部標準を用いた競合PCRを行うことにより、増幅遺伝子のコピー数の定量が可能となった。また、考案されたRPLA試験によりボツリヌス毒素の定量が可能となり、その検出感度は約10MLDであった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

衛生微生物技術協議会第20回研究会、49頁、PCR法を用いたボツリヌス菌の検査法に

ついて、1999年7月、名古屋市

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得(申請中)

出願名

ボツリヌス毒素遺伝子検出用プライマー

出願番号: 特願平 6-301310

受付番号: 29420802181

受付日: 平成6年10月31日

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

Table 1 PCR-product detection by various method  
for DNA extractions

DNA extraction	Numbers of <i>C. botulinum</i> cell					
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
Method 1*	-	-	+	+	+	+
Method 2*	-	-	+	+	+	+
Method 3*	-	+	+	+	+	+

\*Method 1:GeneTle™

Method 2:InstaGene™ Matrix(without achromopeptidase)

Method 3:InstaGene™ Matrix(with achromopeptidase)

Table 2 プライマーの塩基配列

Neurotoxin gene	Sequence	Size of product
Type A	5' -TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT-3'	284bp
	5' -TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC-3'	
Type A IS	5' -TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT TCA TAA TAA AAT ATG GGT TA-3'	253bp
	5' -TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC TAA CAA CAT TCT TCC AAG AT-3'	
Type B	5' -CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG-3'	315bp
	5' -CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT-3'	
Type B IS	5' -CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG GCT TTT AAA ATC ACA GAT CG-3'	278bp
	5' -CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT TAA CAA CAT TCT TCC AAG AT-3'	
Type E	5' -CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A-3'	266bp
	5' -ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC-3'	
Type E IS	5' -CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT ATT TGG ATA ATT CCA GAG AG-3'	240bp
	5' -ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTA TAA TAA AAT CCC TCC TG-3'	