

厚生科学研究研究費補助金
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12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小熊 恵二

平成13（2001）年3月

目 次

I. 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	1
小熊 恵二 (岡山大学医学部細菌学講座)	
II. 分担研究報告書	
1. 「RPLAによるボツリヌス毒素の検出について」及び 「ボツリヌス毒素検出システムに関する研究－追加研究」	15
武士 甲一 (北海道立衛生研究所食品科学部)	
2. E型ボツリヌス毒素産生性 <i>Clostridium butyricum</i> の分子疫学に関する研究	21
中村 信一 (金沢大学医学部微生物学講座)	
3. ヒト型抗体の作製に関する研究	30
－試作沈降多価 (A, B, E及びF型) ボツリヌストキソイドのヒトの免疫応答－ (資料) ボツリヌス菌及び毒素取扱者へのトキソイド接種について (同意書・予診票)	
高橋 元秀 (国立感染症研究所細菌・血液製剤部)	
4. ヒト型モノクローナル抗体の作製に関する研究	41
小崎 俊司 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医疫学講座)	
5. ボツリヌス毒素と類縁の破傷風毒素の抗毒素をモデルとした ヒト型組換え抗毒素抗体作成に関する研究	47
松田 守弘 (甲子園大学栄養学部)	
6. ボツリヌスC型毒素の腸管よりの吸収機構の解析と、家畜、 トリ用のワクチンの開発	81
小熊 恵二 (岡山大学医学部細菌学講座)	
7. ボツリヌス症の早期診断法の確立	94
梶 龍兒 (徳島大学医学部付属病院難聴診療部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	97
IV. 研究成果の刊行物・別刷	99

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

本年は以下の事を行った。

- 1) ボツリヌス中毒の診断法としてA、B、F型毒素の存在を検査する逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）法を開発したので、その有効性について検討した。A、B、F型いずれの場合も、食品中や糞便中に10MLD（10マウス最小致死量）程の毒素が存在すると検出可能であったので、本方法は実際に応用可能であることが判明した。さらに少ない量の毒素をより短い時間で検出するため、各型抗体-proteinA-担体のカラムを作製し、このカラムに検体を反応させた後、溶出し毒素の存在をSDS-PAGEで検出するという方法も開発中である。
- 2) イタリアと中国で発生した食中毒の原因菌であるボツリヌスE型毒素を産生するブチリカム菌（E-ブチリカム菌と記載）、および中国の土壌から得られたE-ブチリカム菌、さらに通常の無毒の菌株の遺伝子の相同性を調べるため、毒素遺伝子配列の決定、random amplified polymorphic (RAPD) アッセイ、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) およびサザンブロットングを行った。E-ブチリカム菌は3群に分けられること、これらは全て無毒のブチリカム菌とは異なることが判明した。また、広範囲な地域において、E-ブチリカム菌の単クローンの分布が示唆された。
- 3) A、B、E、F型多価トキソイドワクチンの安全性と有効性を確認したので、血中抗体価の持続性について検討するため、3回免疫した4人のヒトの2週、9ヶ月、12ヶ月後の抗体価を測定した。接種後2週目と9ヶ月目を比較すると、いずれのヒトも9ヶ月目では約90%減少していた。9ヶ月後と12ヶ月後を比較すると、Aは35%、Eは50%の減少を示したが、BとFは減少しなかった。いずれにしても3回の免疫で抗体は良く上昇するが、1年もすると相当減少することが判明した。
- 4) 上記の多価トキソイドで免疫したヒト由来リンパ球をRF-S1株と融合して得た、A型毒素と反応し毒素を中和する3クローン（Mo-4D8、Ih-3H5、To-2H3）と、中和しない1クローン（To-12B10）、A、B両毒素と反応するが中和しない2クローン（Mu-2G3、To-2F6）の詳細を解析した。中和活性を有さない3クローンは全て毒素の重鎖を認識していたが、中和能を有する3クローンはimmunoblottingにおいて重鎖、軽鎖いずれに対しても反応せず、高次構造を認識していることが示唆された。中和能を有する3クローンの内、To-2H3が毒素を抗原としたELISAで最も強い結合性（avidity）を示し、かつ、最も中和能が高かった。しかし、これを他の2クローンと混合しても中和能の増加は認められなかった。
- 5) 破傷風毒素に対して安定した高中和性ヒト型抗毒素を産生するハイブリドーマを得ているので、これより抗体の重鎖（V_H）、軽鎖（V_K）の可変部領域遺伝子をクローニングし、これをリンカー（L）で直結して、大腸菌で発現させた。高力価の抗体を得るため、詳細に検討したところ、1) 遺伝子の直結はV_K-L-V_HよりもV_H-L-V_Kが良い、2) Lは短い方が良い、3) 抗体は大腸菌より分泌されにくく、細胞質分画に多く存在する、ことが判明した。大腸菌細胞質よりこの抗体を精製したところ、高い中和活性を保持している抗体が得られた。
- 6) C型16Sトキソイドがトリ用のワクチンとして有効であるかを確かめるため、アイガモを用いて免疫実験を行った。16Sトキソイドと大腸菌易熱性毒素（LT）の変異体をリポソームに封入した後、眼に接種したものと、16Sトキソイドを水酸化アルミニウムと混ぜた後、頸部の皮下に接

種したものを試みた。残念ながら、前者の群では、接種後、アイガモは自分で眼を洗浄したため十分な効果が認められなかったが、後者の群では、血中にアイガモの最小致死量の100倍量の毒素でチャレンジしても発症しなかった。

7) 16S毒素を構成している無毒成分の機能を解析するため、無毒成分に対するモノクローナル抗体を作製したところ、HA1、HA2、HA3bに対するものがそれぞれ7、1、3個得られた。これら抗体の、16S毒素の赤血球や小腸粘膜上皮への結合性の阻止や経口毒性の中和能などを解析したところ、HA1に対する多くの抗体が結合を阻止し、低力価の毒素の致死活性を中和した。

8) ボツリヌス中毒患者を診断する時には、針電極を用いた筋電図所見と、表面電極を用いた筋電図でpost-tetanic facilitationを認めることが重要であることを確認した。

9) 岡山県下で発生した突然死2例の便や腸内容物を検査したが、ボツリヌス毒素は検出されなかった。

(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 大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 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
梶 龍児 徳島大学医学部附属病院 難聴診療部 教授

A. 研究目的

本年度の本研究班の具体的な目的は以下のような点である。

- 1) ボツリヌス中毒の迅速診断法の開発
 - i) 毒素検出用 ⇒ RPLA法、抗体カラム法
 - ii) 患者の診断用 ⇒ 電気生理学的方法
- 2) E型毒素産生性ブチリカム菌の遺伝子性状を明らかにする (分子疫学)。
- 3) A、B、E、F型多価トキソイドの効果を明らかにする。
- 4) ボツリヌス症および破傷風の治療用ヒト型モノクローナル抗体の開発。
- 5) トリや家畜用ワクチンの開発。
- 6) 乳児突然死とボツリヌス症との関係の検討。

B. 研究方法

- 1) 毒素検出用方法の開発
 - a) RPLA法

各型特異抗体をラテックスに結合させたものを用い、糞便、食品中の毒素の検出リミットを検討した。

b) 抗体カラム法

各型特異抗体をSeize™ protein A Immunoprecipitation kit (フナコシ社製) に結合させ、カラムを作成した。このカラムに毒素を含む検体を流した後、溶出し、SDS-PAGEで毒素を検出した。

2) E型毒素産生ブチリカム菌の分子疫学

イタリアと中国の中毒起因菌2株と6株、中国の微山湖周辺の土壌由来菌5株、毒素非産生菌8株を用いて行った。各菌よりDNAを抽出・精製した後、このDNAを用い、RAPD、PAGE、PCR、サーザンハイブリダイゼーションなどで解析した。

3) 血中抗体価の変動 (減少) について

多価トキソイドで3回免疫した4人と、これまで計5回免疫した1人より、最終免疫後、2週、9ヶ月、12ヶ月目に採血し、血清中の中和抗毒素価の変動を解析し、その減少率を求めた。

4) 治療用ヒト型モノクローナル抗体の開発

a) ボツリヌス

A型毒素と反応する3クローン、A、B両毒素と反応する2クローンを用い、その認識部位 (エピトープ) をELISAとウエスタンブロット法により決定した。また、中和抗体価をマウスを用いて測定した。

b) 破傷風

高力価の抗体を産生するMAb-G6クローンより、抗体可変部領域の遺伝子をクローン化し、大腸菌で合成することを試みた。 V_H 、 V_K 、リンカーの結合順位や、リン

カーの繰り返し配列が1、2、3回のを形成し、どの組み合わせが最も良く抗体を産生するか検討した。また、本抗体は大腸菌より分泌されにくいことが判明したので、菌体を超音波で破碎した後、細胞質分画より、硫酸塩析とカラムクロマトグラフィーを用いて抗体を大量に精製した。

5) トリ用ワクチンの開発

C型16S毒素を精製し、ホルマリン（1%）処理により不活化した。これにLTを加えリポソームに封入したもの、および水酸化アルミニウムを加えたものを作製し、前者はアイガモの眼に、後者は頸部の皮下に3週間隔で計2回接種した。最終免疫後4週目に部分採血し、毒素との反応性をELISAと毒素中和反応で測定した。アイガモの最小致死量（0.5ml静注）は 1×10^3 マウスMLD/mlであったが、免疫したアイガモをこのMLDの10倍、100倍量でチャレンジ（静注）した。

6) C型無毒成分に対するモノクローナル抗体の作製

C型無毒成分、あるいはGST融合蛋白として合成したGST-HA1、GST-HA3でBACB/cマウスを免疫し、P3U1細胞と融合させ、ハイブリドーマを確立した。ハイブリドーマより抗体を精製し、16S毒素、無毒成分、GST融合各HAサブコンポーネントなどへの反応性や、これら蛋白の赤血球や小腸上皮細胞への結合の阻害、16S毒素の経口毒性の中和活性を検討した。

7) 患者の電気生理学的診断法の開発

ボツリヌスA型毒素により治療を受けた片側顔面痙攣患者3名で、針電極を用いて活動電位を、表面電極を用いて、高頻度刺激をした後の筋電位を測定した。

C. 研究結果

1) ボツリヌス中毒の診断法としてA、B、F型毒素の存在を検査する逆受身ラテックス凝集反応（RPLA）法を開発したので、その有効性について検討した。A、B、F型いずれの場合も、食品中や糞便中に10MLD（10マウス最小致死量）程の毒素が存在すると検出可能であったので、本方法は実際に応用可能であることが判明した。さらに少ない量の毒素をより短い時

間で検出するため、各型抗体-proteinA-担体のカラムを作製し、このカラムに検体を反応させた後、溶出し毒素の存在をSDS-PAGEで検出するという方法も開発中である。

2) イタリアと中国で発生した食中毒の原因菌であるボツリヌスE型毒素を産生するブチリカム菌（E-ブチリカム菌と記載）、および中国の土壌から得られたE-ブチリカム菌、さらに通常の無毒の菌株の遺伝子の相同性を調べるため、毒素遺伝子配列の決定、random amplified polymorphic (RAPD) アッセイ、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）およびサザンブロッティングを行った。E-ブチリカム菌は3群に分けられること、これらは全て無毒のブチリカム菌とは異なることが判明した。また、広範囲な地域において、E-ブチリカム菌の単クローンの分布が示唆された。

3) A、B、E、F型多価トキソイドワクチンの安全性と有効性を確認したので、血中抗体価の持続性について検討するため、3回免疫した4人のヒトの2週、9ヶ月、12ヶ月後の抗体価を測定した。接種後2週目と9ヶ月目を比較すると、いずれのヒトも9ヶ月目では約90%減少していた。9ヶ月後と12ヶ月後を比較すると、Aは35%、Eは50%の減少を示したが、BとFは減少しなかった。いずれにしても3回の免疫で抗体は良く上昇するが、1年もすると相当減少することが判明した。

4) 上記の多価トキソイドで免疫したヒト由来リンパ球をRF-S1株と融合して得た、A型毒素と反応し毒素を中和する3クローン（Mo-4D8、Ih-3H5、To-2H3）と、中和しない1クローン（To-12B10）、A、B両毒素と反応するが中和しない2クローン（Mu-2G3、To-2F6）の詳細を解析した。中和活性を有さない3クローンは全て毒素の重鎖を認識していたが、中和能を有する3クローンはimmunoblottingにおいて重鎖、軽鎖いずれに対しても反応せず、高次構造を認識していることが示唆された。中和能を有する3クローンの内、To-2H3が毒素を抗原としたELISAで最も強い結合性（avidity）を示し、かつ、最も中和能が高かった。しかし、これを他の2クローンと混合しても中和能の増加は認められなかった。

5) 破傷風毒素に対して安定した高中和性ヒト型抗毒素を産生するハイブリドーマを得ているので、これより抗体の重鎖 (V_H)、軽鎖 (V_K) の可変部領域遺伝子をクローニングし、これをリンカー (L) で直結して、大腸菌で発現させた。高力価の抗体を得るため、詳細に検討したところ、1) 遺伝子の直結は V_K -L- V_H よりも V_H -L- V_K が良い、2) Lは短い方が良い、3) 抗体は大腸菌より分泌されにくく、細胞質分画に多く存在する、ことが判明した。大腸菌細胞質よりこの抗体を精製したところ、高い中和活性を保持している抗体が得られた。

6) C型16Sトキソイドがトリ用のワクチンとして有効であるかを確かめるため、アイガモを用いて免疫実験を行った。16Sトキソイドと大腸菌易熱性毒素 (LT) の変異体をリポソームに封入した後、眼に接種したものと、16Sトキソイドを水酸化アルミニウムと混ぜた後、頸部の皮下に接種したものを試みた。残念ながら、前者の群では、接種後、アイガモは自分で眼を洗淨したため十分な効果が認められなかったが、後者の群では、血中にアイガモの最小致死量の100倍量の毒素でチャレンジしても発症しなかった。

7) 16S毒素を構成している無毒成分の機能を解析するため、無毒成分に対するモノクローナル抗体を作製したところ、HA1、HA2、HA3bに対するものがそれぞれ7、1、3個得られた。これら抗体の、16S毒素の赤血球や小腸粘膜上皮への結合性の阻止や経口毒性の中和能などを解析したところ、HA1に対する多くの抗体が結合を阻止し、低力価の毒素の致死活性を中和した。

8) ボツリヌス中毒患者を診断する時には、針電極を用いた筋電図所見と、表面電極を用いた筋電図でpost-tetanic facilitationを認めることが重要であることを確認した。

9) 岡山県下で発生した突然死2例の便や腸内容物を検査したが、ボツリヌス毒素は検出されなかった。

(倫理面での配慮)

本研究班で最も重要なことは、多価トキソイドをボランティア (実際はボツリヌス研究者) に接種し、その後、末梢血を採取し、実験に用いることの承諾の点である。これらに関しては高橋の報告書に記載したように、十分に説明し、同意書を得た後行った。また、接種前後の健康にも注意を払った。さらに、得られた結果に関し、サンプルの由来等に関しては一切公表しないことを約束している。動物実験に関しては、各研究施設でそれぞれの許可を得、その許可に従って行っている。

D. 考 察

- 1) 糞便や食品中の毒素を検出するRPLA法を確立させ、現在、抗体カラム法の有効性を検討中であるが、実際にはこの両者を組み合わせて用いると、より確実な診断が出来ると思われる。
- 2) E型毒素産生ブチリカム菌は、遺伝子的には少なくとも3群に分かれた。世界的にみると、異なる単一の菌による地域的汚染分布が示唆された。我が国でも詳細に汚染度を調べることが重要と思われた。
- 3) 多価トキソイドは有効であったが、3回の免疫では1年もすると著明な血中抗体価の減少が認められた。研究者の実験室内感染を予防するためには、数年おきにワクチン接種する必要があると推察された。
- 4) ヒト型治療用抗毒素モノクローナル抗体の開発は、破傷風の場合は、安定して高力価の中和抗体を産生するクローンが得られ、また今回、大腸菌を用いてその可変部領域のみを大量に作製することに成功したので、展望は明るい。ボツリヌスの場合はA型毒素に対する中和抗体を産生するクローンが得られたが、その中和値はあまり高くなく、実際に使用するためには、抗原カラム等を用いて濃縮・精製することが必要と思われた。
- 5) 家畜やトリ用の、局所免疫と血中抗体価の両方を亢進させる新しいワクチン開発を試みたが、アイガモの場合は水鳥であり、眼に接種すると自分で洗淨してしまうため失敗に終わった、今後、経口投与も考えられるが、従来の皮下接種で十分な抗体価の上昇が認めら

れた。新しいワクチンの接種方法は、食肉の品質保持のため、皮下接種を嫌う家畜などの場合に应用する方が良いように思われた。

6) 電気生理学的診断方法は、患者の診断にも十分に应用できることが確実に became したので、臨床医への啓蒙が重要に思われる。

E. 結論

1. 実際の中毒の際に、A、B、E型毒素検出用として応用可能なRPLA方を開発した。
2. これまでのE型毒素産生ブチリカム菌は、遺伝子的に無毒のブチリカム菌とは異なる3群に分類された。
3. ボツリヌス多価トキソイドをヒトに3回免疫した時には、2週目には著明な血中抗体価の上昇が認められるが、1年もすると90%程減弱した。
4. A型毒素の高次構造を認識することにより毒性を中和すると思われる、ヒト型モノクローナル抗体のクローンを確立した。
5. 破傷風毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体を、大腸菌を用いてリコンビナント蛋白として合成する方法を確立させた。
6. アイガモは、C型16Sトキソイド/水酸化アルミニウムの2回の皮下接種で、十分な免疫効果が得られた。
7. C型16S毒素のHAに反応するモノクローナル抗体の性状から、毒素の赤血球や腸上皮細胞の結合に際しては、HA1が重要であるが、赤血球と上皮細胞では全く同一でないことが示唆された。
8. ボツリヌス中毒の患者の診断には筋電図所見が有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujinaga, Y., K. Inoue, T. Nomura, J. Sasaki, J. C. Marvaud, M. R. Popoff, S. Kozaki, and K. Oguma. 2000. 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.

- 2) Sagane, Y., T. Watanabe, H. Kouguchi, H. Sunagawa, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Oguma, and T. Ohyama. 2000. Characterization of nicking of the nontoxic-nonhemagglutinin components of *Clostridium botulinum* types C and D progenitor toxin. J. Protein Chem 19: 573-579.
- 3) T. Murphy, A. Lawson, C. Nalewajko, H. Murkin, L. Ross, K. Oguma, T. McIntyre. 2000. Algal toxins-Initiators of avian botulism? Environ. Toxicol. 15: 558-567.
- 4) Inoue, K., Y. Fujinaga, K. Honke, H. Arimitsu, N. Mahmut, Y. Sakaguchi, T. Ohyama, T. Watanabe, K. Inoue, and K. Oguma. 2001. *Clostridium botulinum* type A HA positive progenitor toxin (HA⁺-PTX) binds to oligosaccharides containing Gal β 1-4GlcNAc through one subcomponent of HA (HA1). Microbiol. (in press)
- 5) Wang, X., Maegawa, T., Karasawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., Yotaku Gyobu, Y., Yamakawa, K., Oguma, K., Sakaguchi, Y., and Nakamura, S. (2000) Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4992-2997.
- 6) Wang, X., Karasawa, T., Maegawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., and Nakamura, S. (2000) Comparative analysis of nontoxigenic and neurotoxigenic *Clostridium butyricum* by molecular typing methods. Jpn. Pharmacol. Ther., 28, 999-1004.
- 7) Kohda, T., Y. Kamata and S. Kozaki (2000) Endocytosis of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin into rat brain synaptosomes. J. Vet. Med. Sci. 62, 1133-1138.

- 8) Mezaki T, Matsumoto S, Hamada C, Mukoyama I, Sakamoto T, Mizutani K, Takamatsu N, Shibasaki H, Kaji R. Decreased serum ceruloplasmin and copper levels in cervical dystonia. *Ann Neurol* 2001;49:138-139.
- 9) Murase N, Kaji R, Sakamoto T, Shimazu H, Matsumoto S, Kohar N, Shibasaki H, Kimura J. Nicotine-sensitive writer's cramp. *Mov Disord* 2000 15 : 1276-1279.
- 10) Kaji R. Facts and fancies on writer's cramp. *Muscle Nerve* 2000 23:1313-1315.
- 11) 小熊恵二 (2000) : 乳児ボツリヌス症治療 82 : 772-776
- 12) 小熊恵二 (2000) : 乳児ボツリヌス症小児科 41 (6) 963-971
- 13) 小熊恵二 (2000) : ボツリヌス菌 *medicina* 37 (10) , 1712-1715.
- 14) 小熊恵二 (2000) : ボツリヌス 小児感染免疫 12 (4) , 427-430.
- 15) 小熊恵二, 杉本 央 (2001) : 神経情報伝達を障害する破傷風毒素とボツリヌス毒素蛋白質 核酸 酵素 46 (4) , 484-490.
- 16) 唐澤忠宏, 中村信一. (2000) ボツリヌス症. *臨床と微生物*, 27, 549-552.
- 17) 松田守弘, 渡辺優子:破傷風とその治療・予防のためのヒト型モノクローナル抗体 *BIO Clinica* 16(1): 39-43, 2001
2. 学会発表
下記1) ~6) CLOSTPATH 2000 The Third International Meeting on the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia. Kazusa Akademia Center Chiba, Japan. (2000. 6. 8-11)
- 1) K. Oguma, Y. Fujinaga, K. Inoue, H. Arimitsu, Y. Sakaguchi, K. Yokota, N. Mahmut, T. Watanabe, T. Ohama, K. Takeshi. Binding of *Clostridium botulinum* progenitor toxins to intestinal microvilli and erythrocytes.
- 2) Y. Sakaguchi, T. Hayashi, Y. Fujinaga, M. Ohnishi, K. Imoue, T. Murata, N. Mahmut, K. Nakayama, H. Arimitsu, K. Oguma. Genome structure of a botulinum toxin type C-converting phage, c-st.
- 3) T. Watanabe, Y. Sagane, H. Kouguchi, H. Sunagawa, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Oguma, T. Ohyama. Molecular composition of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strains 6813 and 6814.
- 4) H. Arimitsu, N. Mahmut, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Yokota, Y. Sakaguchi, T. Tsuji, K. Oguma. Prevention of absorption of the progenitor toxins from the small intestine by local immunity against the nontoxic component associated with *Clostridium botulinum* neurotoxins.
- 5) K. Inoue, Y. Fujinaga, H. Arimitsu, Y. Sakaguchi, N. Mahmut, T. Watanabe, T. Ohyama, K. Inoue, K. Oguma. Characterization of hemagglutinin activity of *C. botulinum* type A HA positive progenitor toxin.
- 6) Karasawa, T., Wang, X., Maegawa, T., Kozaki, S., Gyobu, Y., Yamakawa, H., Kato, H. and Nakamura, S. (2000) Molecular epidemiology of type E botulinum toxin (BoNT/E)-producing *Clostridium butyricum*.
- 7) Wang, X., Karasawa, T., Maegawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., Nakai, Y., and Nakamura, S. (2000) Comparison of nontoxigenic and neurotoxigenic *Clostridium butyricum* by molecular typing methods. The 5th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 18-20 Oct., Kyongju, Korea.
- 8) Karasawa, T., Maegawa, T., Wang, X., and Nakamura, S. (2000) Genetic diversity of neurotoxigenic *Clostridium butyricum*. 37 th Annual Meeting of the International Botulinum Research Coordinating Committee (IBRCC), 17-20

Oct., Asilomar, CA.

- 9) Matuda, M., Watanabe, Y., Katahira, J., Horiguchi, Y., Kamei, M. Expression in *E. coli* of anti-tetanus human single-chain antibody fragment with toxin-neutralizing activity. 13th World Congress on Animal Plant and Microbial Toxins September 18-22, 2000, Paris, France (下記10) ~16) 第73回日本細菌学会総会, 札幌, 日本細菌誌55, (2000)
- 10) 井上 薫, 藤永由佳子, 有満秀幸, ナズラマホモチ, 阪口義彦, 長町榮子, 小熊惠二 ポツリヌスB型神経毒素-無毒成分複合体 (progenitor toxin) に含まれる赤血球凝集素 (HA) の性質
- 11) 孝口裕一, 渡部俊弘, 相根義昌, 砂川絃之, 井上 薫, 藤永由佳子, 小熊惠二, 大山徹 ポツリヌスC型菌6814株によって産生されるProgenitor毒素の血球凝集素の精製とその性質
- 12) 相根義昌, 渡部俊弘, 孝口裕一, 砂川絃之, 井上 薫, 藤永由佳子, 小熊惠二, 大山徹 ポツリヌス神経毒素の2本鎖構造: C, DおよびF型神経毒素分子内の切断部位の同定
- 13) 阪口義彦, 林哲也, 藤永由佳子, 大西真, 村田敬寛, 中山恵介, 井上 薫, ナズラマホモチ, 有満秀幸, 小熊惠二 C型ポツリヌス毒素変換のファージゲノム解析
- 14) 王 興民, 前側恒男, 唐澤忠宏, 小崎俊司, 塚本健太郎, 刑部陽宅, 山川清孝, 加藤はる, 中村信一 分子遺伝学的手法によるE型 *butyricum* の解析.
- 15) 塚本健太郎, 唐澤忠宏, 中村信一, 小崎俊司. 食中毒由来*Clostridium butyricum*の産生する神経毒素の性状.
- 16) 渡邊優子, 片平じゅん, 堀口安彦, 松田守弘 高中和性抗破傷風ヒト型一本鎖組換え抗体フラグメントの発現系の構築
- 17) ナズラマホモチ, 井上薫, 藤永由佳子, 有満秀幸, 阪口義彦, 横田憲治, 小熊惠二 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成とその性状 第47回毒素シンポジウム 倉敷 (岡山) (2000)

- 18) 高橋元秀, 岩城正昭, 福田 靖, 小宮貴子, 徳丸洋一, 川口清二郎, 鳥居恭司「ボツリヌス多価トキシドの試作製造」 第4回 日本ワクチン学会, 横浜(2000.11.)
- 19) 王 興民, 前側恒男, 唐澤忠宏, 加藤はる, 中村信一 (2000) 神経毒素非産生性および産生性ブチリカム菌(*Clostridium butyricum*)の分子遺伝学的比較解析. 第37回日本細菌学会中部支部総会, 9月21-22日, 岐阜
- 20) 小熊惠二 「ボツリヌス中毒の新しい診断・治療・予防法の開発」 食品、創傷を介した振興・再興感染症の現況と対策 (厚生科学研究・研究成果発表会 (公開シンポジウム)) (2000. 12. 6)

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

「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（既報）。今回はマウスの飼育設備を有しない施設においても、簡易・迅速に且つ検出感度と特異性に優れた免疫学的手法を用いたボツリヌス毒素の検出法について検討した。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。RPLA試験における精製毒素に対する検出感度はA型75pg, B型625pg, E型625pg/0.25μlであった。RPLA試験はまた、クックドミート培地への接種試験および中毒の原因となった食品中のボツリヌス毒素の検出試験において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RPLAシステムにより、中毒発生時におけるボツリヌス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、マウス試験が実施できない施設においても簡易、迅速にボツリヌス毒素の検出が行える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) 培養試験

上記菌株、辛子蓮根にA型菌（遺伝子型A B型菌）を接種後培養、辛子蓮根のみの増菌、など種々の方法で検討した。

(3) ボツリヌス中毒原因食品

わが国においてボツリヌス中毒の原因となった辛子蓮根1件、調味干製品1件、魚肉発酵食品6件を各々用いた。各試料を2倍乳剤とし、2倍又は10倍階段希釈してRPLAに供し、そのエンドポイントを目視および実体顕微鏡下で判定した。

(4) 糞便中の毒素の検出

ボツリヌス菌の30℃、5日間培養上清を正常ヒト糞便に接種し、RPLAで毒素の添加・回収を試みた。次いで、ボツリヌス中毒事例において採取された患者糞便中のボツリヌス毒素の

定量的検出を試み、同時に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) 精製毒素におけるRPLA試験

A、B、E型の各25 μ l中ボツリヌス精製毒素の凝集素価は、各々、A型75pg、B型およびE型においては625pgであった。したがって、各毒素のマウス最小致死活性量がA型で10pg、B型およびE型で100pgであることから、本RPLAの検出感度はA型で7.5MLD、B型およびE型では6.25MLDに相当することが認められた。これらの毒素を用いたRPLA試験において、交叉反応は認められず、また、その判定に要する時間は最短で8時間であった (Table 1)。

(2) 培養上清を用いた試験

A型、B型、E型毒素産生株の培養上清のマウス毒性試験とRPLA試験とを比較・検討した結果をTable 2に示す。A型毒素については、20,000MLD/mlのマウス致死量に対するRPLA凝集素価は2,000倍/25 μ l、B型毒素では同様に2,000MLD/mlと400倍/25 μ l、E型毒素では同様に800MLD/ml (トリプシン処理後は40,000MLD/ml)と4,000倍/25 μ l (トリプシン処理後も同値)であった。

次に、辛子蓮根と辛子蓮根由来A型菌(#1, 2)及びB型菌(#3)を用いてクックドミート培地で培養し、培養上清原液を用いてRPLAにおける型別と特異性について検討した。また、A型菌と辛子蓮根の混合(#4)、辛子蓮根のみ(#5)の培養試験も同時に行った。これをTable 3に示す。その結果、#4の原液を除き、いずれの試料においても型特異性が確認された。非特異反応が認められたのは#4の原液で、これを10倍希釈することにより型特異性が認

められた。A型菌及びB型菌を接種した培養遠心上清は、いずれも100倍希釈で陽性を示した。非特異反応の出現を考慮すると、試料の10倍希釈液でスクリーニング試験の実施が可能と思われる。

(3) 中毒の原因食品における検討

中毒発生時にその原因となった食品中のボツリヌス毒素について、マウス試験、RPLA試験で特異性と検出感度を検討した。その結果をTable 4に示す。A型中毒の原因となった辛子蓮根においては、マウス致死活性は20MLD/gで、RPLAにおける凝集素価は8倍/25 μ lであった。E型中毒の原因となった調味干製品 (サケトバ) においては、マウス致死活性は400MLD/gで、RPLA凝集素価は80倍/25 μ lであった。魚肉発酵食品における中毒の原因はすべてE型毒素であり、マウス致死活性は2,000~20,000MLD/gの範囲で、RPLAの凝集素価については200~4,000倍/25 μ lの範囲であった。

(4) 糞便中の毒素の検討

正常ヒト糞便にA型、B型、E型毒素を添加し、その検出をマウス致死活性とRPLA試験で検討した。その結果をTable 5に示す。マウス致死活性20,000MLD/mlを示すA型毒素におけるRPLA凝集素価は1,000倍/25 μ lであり、同様にB型においては2,000MLD/mlのマウス致死活性と200倍/25 μ lのRPLA凝集素価、E型においては40,000MLD/mlのマウス致死活性と1,600倍/25 μ lのRPLA凝集素価の関係が認められた。一方、何れの毒素も添加しなかった正常ヒト糞便には、マウス致死活性とRPLA凝集素価は認められなかった。次いで、E型中毒事例において採取された2件の患者糞便のマウス致死活性は80および160MLD/gであり、各々のRPLA凝集素価は8および20倍/25 μ lであった。

D. 考察

今回考案されたRPLAによるA型、B型およびE型毒素を対象としたボツリヌス毒素

定量検出システムにおいて、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 μ l)、B型及びE型では各々25ng/ml(625pg/25 μ l)であった。A型毒素の Maus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 Maus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試験における凝集素価はA型で2,000倍、B型で400倍、E型で4,000倍であった。これを Maus致死活性と比較すると、A型で10倍、B型で5倍、E型で10倍低い結果を得た。これらの結果から、本RPLA試験の検出感度は Maus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A型、B型およびE型毒素をを対 象として、RPLA試験による毒素の定量的検出を試みた。精製毒素、培養上清、中毒事例において採取された原因食品ならびに患者糞便を対象とした場合、RPLA試験の結果は特異性において Maus毒性試験の結果と完全に一致し、その検出感度は Maus致死活性の約1/10に相当した。その結果、本RPLA試験は中毒発生時におけるスクリーニング試験として有効であることが確認された。今後、本RPLAシステムを、 Maus毒性試験を実施できない施設において、その普及を図りたいと考える。

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法およびRPLA法による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

H. 健康危険情報

該当なし

I. 謝辞

本研究にあたり、ボツリヌス毒素と抗毒素血清の分与を頂いた大阪府立大学農学部小崎俊二教授、辛子蓮根の添加・培養試験にご協力を頂いた熊本市環境総合研究所松岡由美子博士、RPLA試薬の調製にご協力を頂いたデンカ生研 榊山純一博士に深謝します。

Table 1. Sensitivities and specificities
of latex coupled with rabbit IgG

Toxin type	RPLA titer (100 ng/ml)		
	Anti-A	Anti-B	Anti-E
A	X32 (3 ng/ml)	(-)	(-)
B	(-)	X4 (25 ng/ml)	(-)
E	(-)	(-)	X4 (25 ng/ml)

Table 2. Results of RPLA test by using culture supernatants obtained from strains and musterd lotus roots

組合せ	試料#	毒素型	RPLA test			
			anti-A	anti-B	anti-E	cont.
辛子レンコン + ボツリヌス菌	1	A	+	-	-	-
	2	A	+	-	-	-
	3	A	+	-	-	-
	4	A	+	+	+	+
	5	A	+	-	-	-
	6	A	+	-	-	-
	7	A	+	-	-	-
	8	A	+	-	-	-
	9	A	+	-	-	-
	10	B	-	+	-	-
	11	B	-	+	-	-
ボツリヌス菌 のみ	12	A	+	-	-	-
	13	B	-	+	-	-
	14	B	-	+	-	-
	15	C	-	-	-	-
	16	C	-	-	-	-
辛子レンコン のみ	17-1 (非加熱)		-	-	-	-
	17-2 (60°C)		-	-	-	-
	17-3 (80°C)		-	-	-	-
	18-1 (非加熱)		-	-	-	-
	18-2 (60°C)		-	-	-	-
	18-3 (80°C)		-	-	-	-
	19-1 (非加熱)		-	-	-	-
	19-2 (60°C)		-	-	-	-
	19-3 (80°C)		-	-	-	-
	20-1 (非加熱)		-	-	-	-
	20-2 (60°C)		-	-	-	-
	20-3 (80°C)		-	-	-	-
	21-1 (非加熱)		-	-	-	-
	21-2 (60°C)		-	-	-	-
	21-3 (80°C)		-	-	-	-

Table 3. Results of RPLA test by using diluted culture supernatants obtained from strains

組合せ	試料#	毒素型	RPLA test			
			anti-A	anti-B	anti-E	cont.
ボツリヌス菌 のみ	1 (x0)	A	+	-	-	-
	1 (x10)	A	+	-	-	-
	1 (x100)	A	+	-	-	-
	2 (x0)	A	+	-	-	-
	2 (x10)	A	+	-	-	-
	2 (x100)	A	+	-	-	-
	3 (x0)	B	-	-	-	-
	3 (x10)	B	-	-	-	-
	3 (x100)	B	-	-	-	-
ボツリヌス菌 + 辛子レンコン	4(x0)	A	+	+	+	+
	4 (x10)	A	+	-	-	-
	4 (x100)	A	+	-	-	-
辛子レンコン のみ	5 (x0)		-	-	-	-
	5 (x10)		-	-	-	-
	5 (x100)		-	-	-	-

Table 4. RPLA titer of toxin solutions extracted from samples obtained from food borne botulism outbreaks

Sample	Toxin type	RPLA titer	Mouse lethality (MLD/g)
Musterd lotus root	A	X2	20
Seasoned dry salmon	E	X80	400*
Fermented fish meat			
Herring	E	X200	2,000*
Herring	E	X4,000	20,000*
Yamabe trout	E	X400	10,000*
Japanese dace	E	X4,000	20,000*
Flatfish	E	X2,000	10,000*
Salmon	E	X2,000	10,000*

*Type E toxins were treated with trypsin

Table 5. Relationship between RPLA titer and mouse lethality inoculated into stools of culture supernatants, and patient stools obtained from botulism

Toxin type	Toxin inoculated (MLD/g)	RPLA titer (with/without stool)
A	20,000	X1,000/X1,000
B	2,000	X200/X400
E	800	X16,000/X4,000
E*	40,000	X16,000/X4,000
Control**	(-)	Negative
Patient 1	80	X8
Patient 2	160	X20

*After treatment with trypsin

**Non-cultivated supernatant inoculated and non-sensitized latex were used as negative control

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

「ボツリヌス毒素検出システムに関する研究－追加研究」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い、また、マウスの飼育設備を有しない施設においても、簡易・迅速に且つ検出感度と特異性に優れたRPLA試験を開発した。

今回は、臨床材料や中毒の原因となる食品中のボツリヌス毒素の検出感度をより上げるため、既報のRPLAの他に Seize™X Protein A Immunoprecipitation Kit を用いて検討した。また、今後、本ボツリヌス毒素検定システムの普及を図るため、A, B, E, F 型抗毒素を比較的大量に作製し、ボツリヌス中毒発生時に本研究の班長を通じて無償で配布する準備を開始した。

A. 研究目的

ボツリヌス中毒発生時における毒素の検出法については、RPLAによる方法を既報で報告した。しかし、RPLA法は判定までに1日を要することから、より迅速に且つ検出感度に優れたシステムの開発は必要であると考えた。

今回、我々は、より抗原の補足に優れ、且つ特異性に優れた方法として Seize™X Protein A Immunoprecipitation Kitに着目し、実験の準備を行った。また、国産のボツリヌス検出キットが販売されていない現状を考慮し、今後ボツリヌス中毒発生時において、本研究班々長を通じて抗毒素を無償で配布するための準備も併せて行った。

B. 研究方法

(1) 毒素：以下の毒素を用いた。

Botulinum Progenitor Toxin type A, B, E, F を用いた。これらの毒素は、和光純薬の製品である。

(2) 神経毒素の精製

各 5mg の毒素をアルカリ条件下でゲル濾過し、無毒成分と神経毒素を分離した。今回はAおよびB型毒素についてのみ、その分離パターンとSDS-PAGEプロフィールを示す。

(3) 毒素および抗毒素の調製

精製された神経毒素をトキシソイド化し、家兎に注射して抗毒素血清を作製した。この血清を Seize™X Protein A Immunoprecipitation Kit (フナコシ(株)) によりその担体にバインディングさせ、これに種々の濃度に調製した毒素をアプライし、添付のマニュアルにしたがってカラ

ムを洗浄した後、毒素を溶出した。溶出した毒素は、SDS-PAGEにより検出した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、試験に用いた家兎は全身採血を行った後、焼却するまでの間、屍体を -20°C で保管した。

C. 研究結果

(1) 神経毒素の精製

各神経毒素をアルカリ条件下で Superdex 200pg 26/60 (ファルマシア) でゲル濾過した分離パターンを図1-a (type A), 1-bに示す。両毒素とも、5mgのプロジェニタートキシンから約0.5mgの神経毒素が分離された。これをSDS-PAGEにより電気泳動を行い、その純度が90%以上であることが認められた (図2)。

(2) 家兎免疫血清

精製毒素1mgをセロファンチューブに入れて、1%ホルマリン溶液に室温で1週間透析した。毒素のマウス致死活性が消失していることを確認後、トキシイド溶液をフロイドのインコンプリートアジュバントんと混合してエマルジョンとし、1羽の家兎に0.1mgずつ2週間隔で皮下注射した。抗体価が上昇したことを認後後、心臓採血により全身採血を行い、血清を分離した。

(3) 毒素の検出

本Protein Aスピнкаラムにより、ボツリヌス毒素の抗体がカラムに結合し、そこに毒素試料をマウントすることにより、試料中の毒素が抗体に結合する。これを少量の溶出液で溶出すると、試料中の毒素は濃縮されて集められる。

D. 考察

ボツリヌス毒素は、無毒成分分画に各型に共通する抗原が存在するため、特異的な抗体を得るには神経毒素分画を精製する必要がある。本実験により、ヒトの中毒の主な原因となるA, B, E, F型毒素の神経毒素成分を比較的少量に精製することができた。その毒素をトキシイド化することにより、比較的少量の免疫血清を得ることが可能となった。

既報のRPLAによるボツリヌス毒素の検出システムは簡易で、検出感度と特異性に優れていることが認められた。しかし、その判定には時間を要すること、試料中の毒素量が少ない場合には濃縮操作が必要である、などの指摘を受けた。本実験ではProtein Aが内包されているスピнкаラムを用いることにより、容易に且つ短時間内に試料中の毒素濃縮することができ、しかもその反応が抗原抗体反応に基づいていることから、その特異性に問題はないものと考ええる。

今後本スピнкаラムを用い、毒素のみの場合、毒素を糞便や血清などの臨床材料および食品に添加した場合、過去において中毒を起こした患者の臨床材料および原因食品などを用いて、実用試験を実施したいと考える。

E. 結論

ボツリヌスA, B, E, F型プロジェニター毒素をアルカリ条件下、ゲル濾過により純度の高い神経毒素分画を得た。本神経毒素を用いて家兎免疫血清を比較的少量に得た。免疫血清から抗体を分離し、この抗体をProtein Aスピнкаラムに応用することにより、試料中の毒素を簡易・迅速に濃縮することが可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

Chromatogram Questions

No 1: Sample volume and type:
cotulinum typeA toxin 4.8ml
No 2: Column:
Superdex200pg 26/60
No 3: Eluent:
0.1M NaCl-20mMTB (pH8.0)
No 4: Remarks
2000.12.10

— sd266051:1_UV1_280nm sd266051:1_Fractions sd266051:1_Inject
..... sd266051:1_UV1_280nm@01, BASE

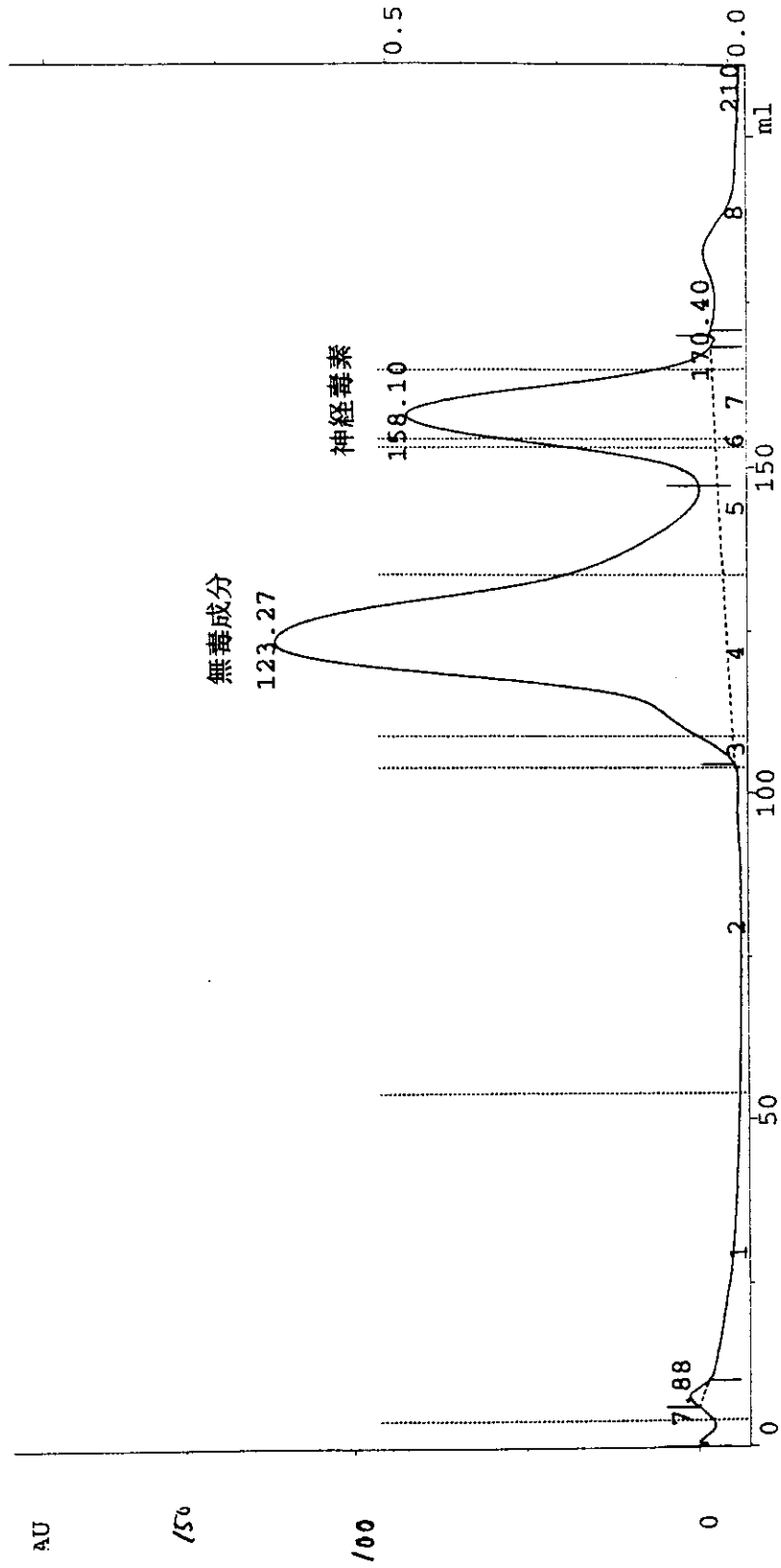


図 1-a Superdex200pg 26/60 カラムを用いた A 型神経毒素及び無毒成分の分離