

Chromatogram Questions

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

— sd266052:1_UV1_280nm sd266052:1_Fractions sd266052:1_Inject
..... sd266052:1_UV1_280nm@1, BASE

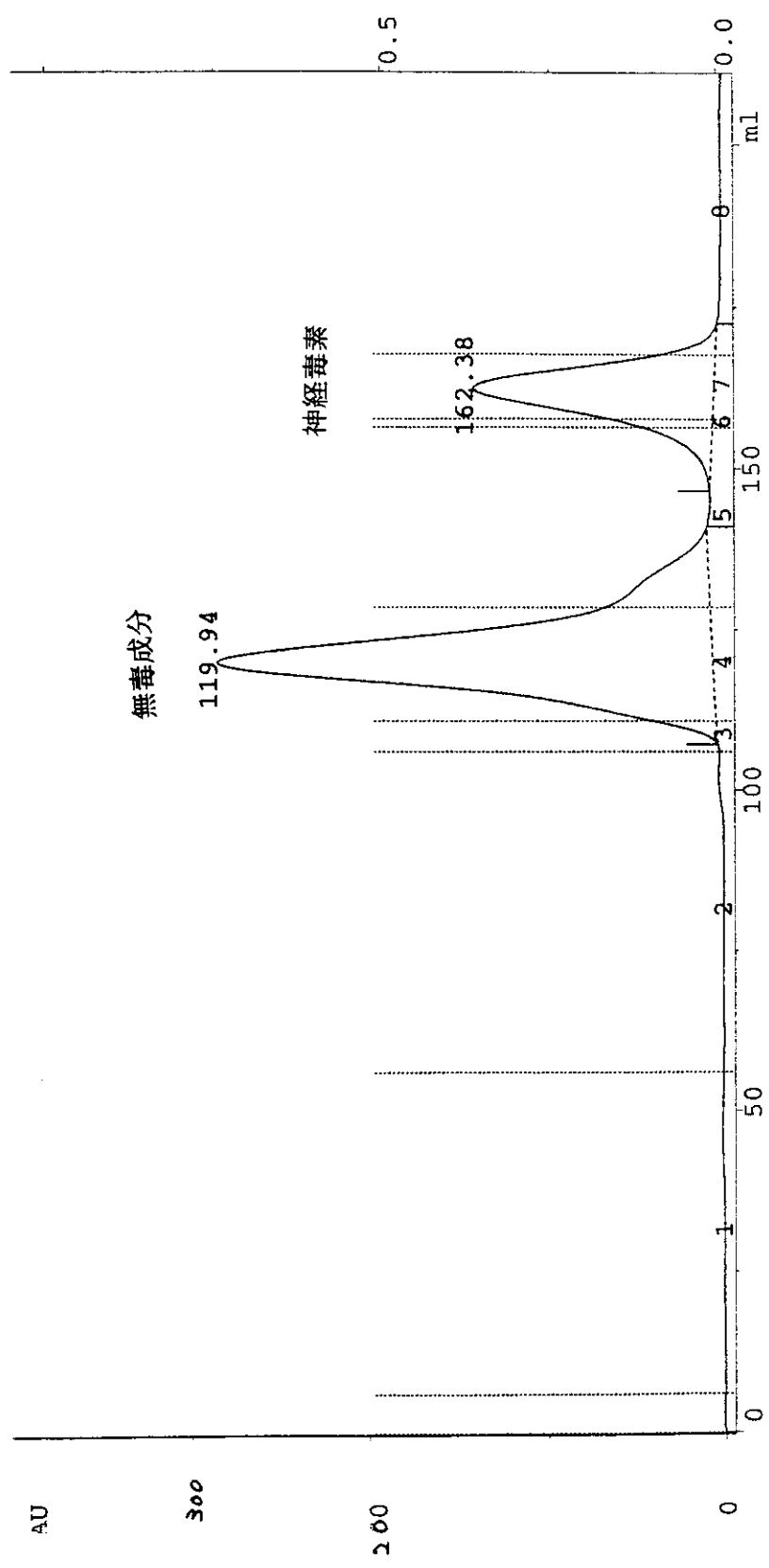


図 1-b Superdex200pg 26/60 カラムを用いた B 型神経毒素及び無毒成分の分離

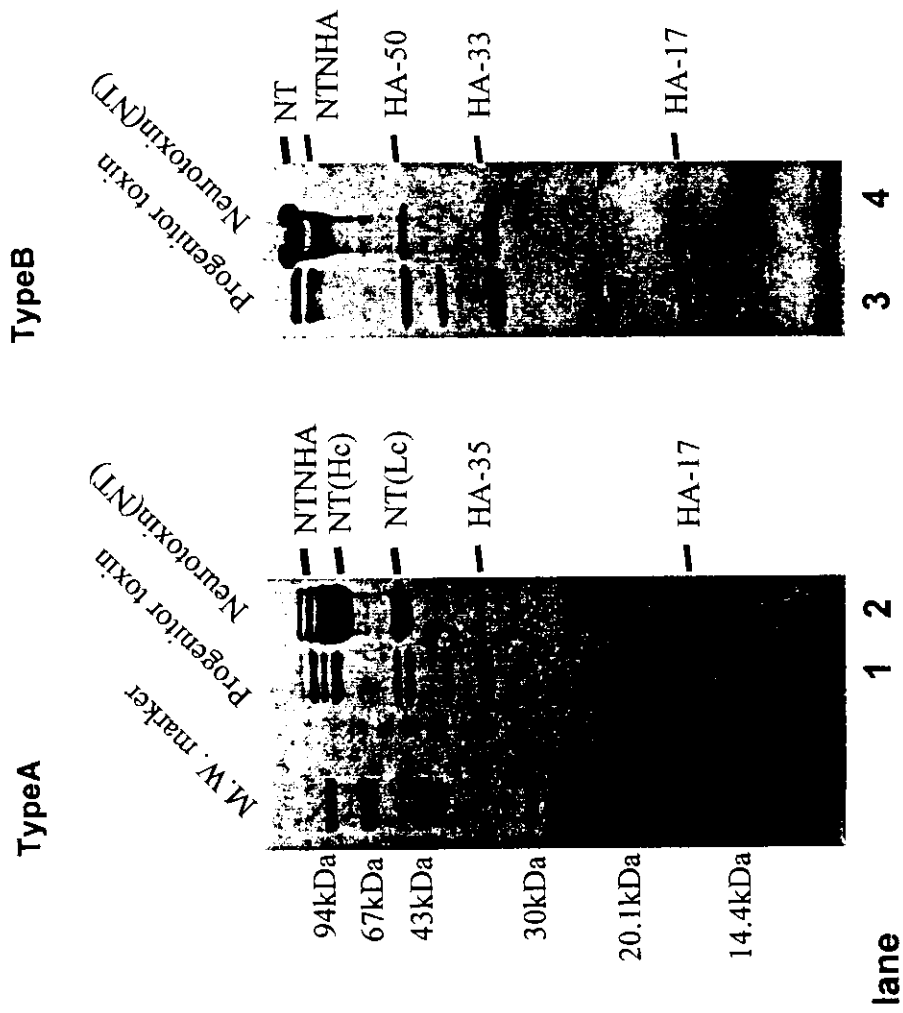


図2 精製されたA,B及びE型神経毒素のSDS-PAGE(13.6%)プロファイル

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

E型ボツリヌス毒素産生性*Clostridium butyricum*の分子疫学 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

E型ボツリヌス毒素産生性*Clostridium butyricum*（ブチリカム菌）[中国食中毒由来6株、微山湖土壌由来5株、イタリア乳児ボツリヌス症由来2株]および非毒素産生性ブチリカム菌8株用を用いて、毒素遺伝子塩基配列の決定、random amplified polymorphic DNA (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等の手法を用いて分子疫学解析を行った。その結果、毒素産生性菌は世界に少なくとも3タイプの遺伝子型が存在すること、非産生性菌の遺伝子型は上記3タイプのいずれにも属さず、多様性に富むことが明らかになった。

E型ボツリヌス中毒が生じた際にはE型ボツリヌス菌のみならず、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌の存在を考慮する必要がある。

A. 研究目的

Clostridium butyricum（ブチリカム菌）はグラム陽性嫌気性桿菌で、環境中あるいはヒトや動物から分離される。ブチリカム菌はこれまで非病原性と考えられていたが、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌が、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カ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。前年度の報告で、本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。本年度は疫学解析を更に発展させた。すなわち、本菌のボツリヌス毒素遺伝子塩基配列を決定し、random amplified polymorphic DNA (RAPD) アッセイ、サザンブロッティングなどの手法を用いて分子疫学解析を行った。さらに、同手法を用いて非毒素産生性ブチリカム菌（通常のブチリカム菌）との比較解析を行った。

B. 研究方法

1. 被験菌株

使用した毒素産生性ブチリカム菌株は次の通りである（表1）。イタリア乳児ボツリヌス症由来2株 (BL 5262, BL 6340) [Aureli et al., 1986]、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 1898, KZ 1899) [Meng et al., 1997, 1999]、中国微山湖周辺土壌由来5株 (KZ 1886, KZ 1887, KZ 1889, KZ 1890, KZ 1891) [Meng et al., 1997, 1999]。非毒素産生性株は8株用いた

(IFO 3315, MIYAIRI 588, MIYAIRI 595, MIYAIRI 630, SI 293-2, RU 063-3, GU-2, ATCC 19398) .

2. DNAの抽出

10 ml プレインハートインフュージョンによる培養液から遠心分離した菌体を25ユニットのムタノリジン (ナカライテスク) と500 μ gのプロテアーゼKを含むTEにて30分インキュベートした後、10 μ gのRNaseと最終濃度1%のSDSを加え、さらに15分インキュベートした。菌体溶解液をフェノール/クロロホルム処理し、精製DNAを得た。

3. RAPDアッセイ

Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (アマシャム ファルマシア) を用いた。供給されたアッセイチューブ (ビーズ) において、25 μ lの反応系に 10 ng の精製DNAと 25 pmolの供給されたプライマーを添加し、50 μ lのミネラルオイルを上層し、95 $^{\circ}$ C5分の加熱後、95 $^{\circ}$ C1分36 $^{\circ}$ C1分72 $^{\circ}$ C2分を1サイクルとして45サイクルのPCR反応を行った。増幅産物は3%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。

4. PFGE

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 \times 0.5 TBE, 1%アガロースにて、CHEF-DR II (パイオ・ラッド) を使用し、14 $^{\circ}$ C, 6 V/cm, スイッチタイム3-20秒 (SmaI) または3-

25秒 (XhoI) の条件で行った。

5. PCRによるE型ボツリヌス毒素遺伝子の検出

用いたPCRプライマーは表2に示した。各プライマーにより増幅されるPCR断片の位置は図1に示した。

6. サザンハイブリダイゼーション

PFGE後、DNAをナイロン膜にアルカリトランスファーした。E型ボツリヌス毒素遺伝子全体を含むPCRプライマー (KAG165 およびKAG166, 表2, 図1) にて、LCL 155株より毒素遺伝子を増幅し、DNAプローブとして用いた。

C. 研究結果

1. 毒素産生性ブチリクム菌の分子遺伝学的解析

中国由来11株のE型ボツリヌス毒素遺伝子の塩基配列は全て同一で、ボツリヌス菌のE型毒素およびイタリア由来ブチリカム菌株のE型毒素と比較したところ、アミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ96.9%、95.0%であった (表3、図2)。被験菌株はRAPD、PFGE、毒素遺伝子をプローブとしたサザンプロットングのいずれを用いた場合も、イタリア乳児ボツリヌス症由来株、中国食中毒由来株、微山湖土壌由来株の3つのクラスターに分別された (図3、表4)。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 1898, 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。

各クラスター内ではRAPD・PFGEパターンにおいてわずかな違いがあり、さらにサブクラスターに分別された (図3、表4)。すなわち、中国灌雲県食中毒由来4菌

株のRAPD・PFGEパターンは同一であったが、濟寧市、沛県食中毒由来菌株は、それら4菌株とはわずかに異なっていた。また、微山湖由来株のクラスターも2種類のサブクラスターに分別された。制限酵素未処理PFGE後のサザン解析の結果、毒素遺伝子は全ての菌株において染色体上に存在することが明らかとなった(図3)。

2. 毒素産生性および非毒素産生性菌株の比較

PCRアッセイによる毒素遺伝子検出および毒素遺伝子プローブによるサザンハイブリダイゼーションの結果、非毒素産生性菌株は毒素遺伝子を部分的にも保有していなかった(図4)。

SI 293-2とGU-2はRAPDアッセイおよびPFGEにおいて同一パターンを示した。しかしながら、この2株を含め、非毒素産生性菌株のRAPDアッセイおよびPFGEパターンは、いずれの毒素産生性菌株のパターンとも異なっていた(図5)。

D. 考察

今回のE型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌15株は分子疫学的手法を用いた結果から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の分布が示唆された。従って、RAPDアッセイ、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。

今回用いた分子疫学的手法においては、非毒素産生性菌と毒素産生性菌とで同じクラスターに分類される菌株はなかった。毒素産生性ブチリクム菌は、非毒素産生性ブチリクム菌がE型ボツリヌス菌から毒素遺伝子を獲得してできたと考えられているが[Collins and East, 1998], 本研究からはその証拠となるデータは得られなかった。むしろ、非毒素産生性菌と毒素産生性菌とでは遺伝学的背景が異なるかのような印象を

受けた。

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濟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[Meng et al., 1999]。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。これまでに本菌が日本の土壌から分離された報告はない。しかしながら、今後E型ボツリヌス中毒が生じた際にはE型ボツリヌス菌のみならず、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の存在を考慮した上で原因究明を行っていくことが肝要と思われる。

参考文献

- Aureli, P. et al. (1986) Two cases of type E botulism caused by neurotoxicogenic *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.
- Collins, M. D. and East, A. K. (1998) Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. J. Appl. Microbiol., 84, 5-17.
- Fenicia, L. et al. (1999) Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* type E., Clin. Infect. Dis., 29, 1381-1387.
- Hatheway CL: Botulism: The present status of the disease. Current Topics

in Microbiology and Immunology vol 195, 55-75, Montecucco C (ed), Springer-Verlag, Berlin, 1995.

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

Meng, X., et al. (1999) Isolation and characterization of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* from soil of China. J. Med. Microbiol., 48, 133-137.

Szabo, E. A. et al. (1993) Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3011-3020.

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.

小熊惠二他. (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.

E. 結論

E型ボツリヌス毒素産生性および非産生性ブチリクム菌を分子疫学的に解析し、毒素産生性菌は世界に少なくとも3タイプの遺伝子型が存在すること、非産生性菌の遺伝子型は上記3タイプのいずれにも属さず、多様性に富むことを明らかにした。

F. 健康危険情報

E型ボツリヌス中毒が生じた際にはE型ボツリヌス菌のみならず、E型ボツリヌス毒素産生性ブチリクム菌の存在を考慮する必要がある。ただし、現時点で日本における症例および環境からの分離事例の報告はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 唐澤忠宏, 中村信一. (2000) ボツリヌス症. 臨床と微生物, 27, 549-552.

2) 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.

3) Wang, X., Karasawa, T., Maegawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., and Nakamura, S. (2000) Comparative analysis of nontoxicogenic and neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* by molecular typing methods. Jpn. Pharmacol. Ther., 28, 999-1004.

2. 学会発表

1) 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. (2000) 分子遺伝学的手法によるE型 *butyricum*の解析. 第73回日本細菌学会総会, 5月29-31日, 札幌 (日本細菌学雑誌 55, 392, 2000)

2) 塚本健太郎, 唐澤忠宏, 中村信一, 小崎俊司. (2000) 食中毒由来 *Clostridium butyricum*の産生する神経毒素の性状. 第73回日本細菌学会総会, 5月29-31日, 札幌 (日本細菌学雑誌 55, 410, 2000)

3) 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*. The 3rd International Meeting on the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia. 8-11 June, Kisarazu, Japan.

- 4) 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
- 5) 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.
- 6) 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.

協力研究者:

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

表1. 毒素産生性ブチリウム菌被験菌株

菌株名	由来 (等)
BL 5262 BL 6340	1984年にイタリアで起きた乳児ボツリヌス症患者糞便から分離、それぞれ別の患者から分離
LCL 063	1973年にJining (済寧市) で起きたボツリヌス食中毒患者の腸内容物から分離
LCL 095	1983年にPeixian (沛県) で起きたボツリヌス食中毒の原因食品から分離
LCL 155	1994年にGuanyun (灌雲県) で起きたボツリヌス食中毒の原因食品から分離
KZ 1899	1994年にGuanyun (灌雲県) で起きたボツリヌス食中毒の原因食品から分離
KZ 1897	上記灌雲県ボツリヌス食中毒患者の家の周囲の土壌から分離
KZ 1898	上記灌雲県ボツリヌス食中毒患者の家の周囲の土壌から分離
KZ 1886	微山湖周辺土壌から分離
KZ 1887	微山湖周辺土壌から分離
KZ 1889	微山湖周辺土壌から分離
KZ 1890	微山湖周辺土壌から分離
KZ 1891	微山湖周辺土壌から分離 (KZ 1886, KZ 1887, KZ 1889の3菌株は同じ地点で採取した土壌由来)

表2. E型ボツリヌス毒素遺伝子検出に用いたPCRプライマー

プライマー	塩基配列 (5' → 3')	位置*	PCR産物の 大きさ (bp)	文献
E1	TATATATTAACCGGCGG	56-74	446	[Szabo et al, 1993]
E2	TAGAGAAATATTGGAAGCTG	483-501		
KTE18Fw	ATAGGAAATGAAGCACAAA	1834-1852	449	this study
KTE15Rv	AACCTGTCTATATTATTCATTG	2261-2282		
KTE8Fw	GGAGATTCTAAACTTTATAT	3001-3020	249	this study
KAG168	GTCATAAAGCAAATAATTTCCCAAAAATCCT	3218-3249		
KAG165	CAAGATTACAATTGGGTTATATGTGATCTTAATCATGA		3905	this study
KAG166	CTAAGTCCTTTGGAATTTATGACTTTAGCCGT			

* 研究発表G-1-2) 参照

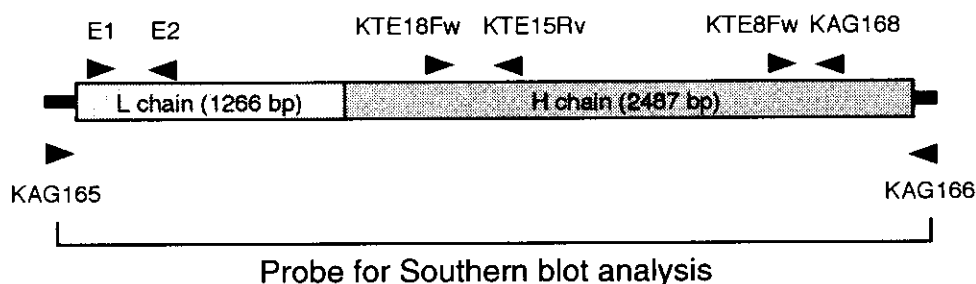


図1. E型ボツリヌス毒素遺伝子とその検出に用いたPCRプライマーの部位

表 3. 神経毒素産生性ブチリクム菌の毒素遺伝子の塩基配列

菌株	DDBJ/EMBL/GenBank accession number
LCL 155	AB037704
KZ 1899	AB037705
KZ 1897	AB037706
KZ 1898	AB037707
LCL 063	AB037708
LCL 095	AB037709
KZ 1886	AB037710
KZ 1887	AB037711
KZ 1889	AB037712
KZ 1890	AB037713
KZ 1891	AB037714
BL 6340	AB039264

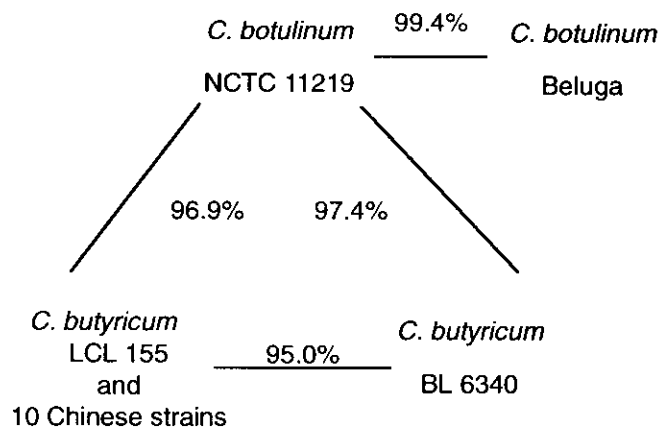


図 2. 神経毒素アミノ酸配列の identity の比較

C. botulinum NCTC 11219 と Beluga は既報（それぞれ DDBJ/EMBL/GenBank accession number X62683、X62089）

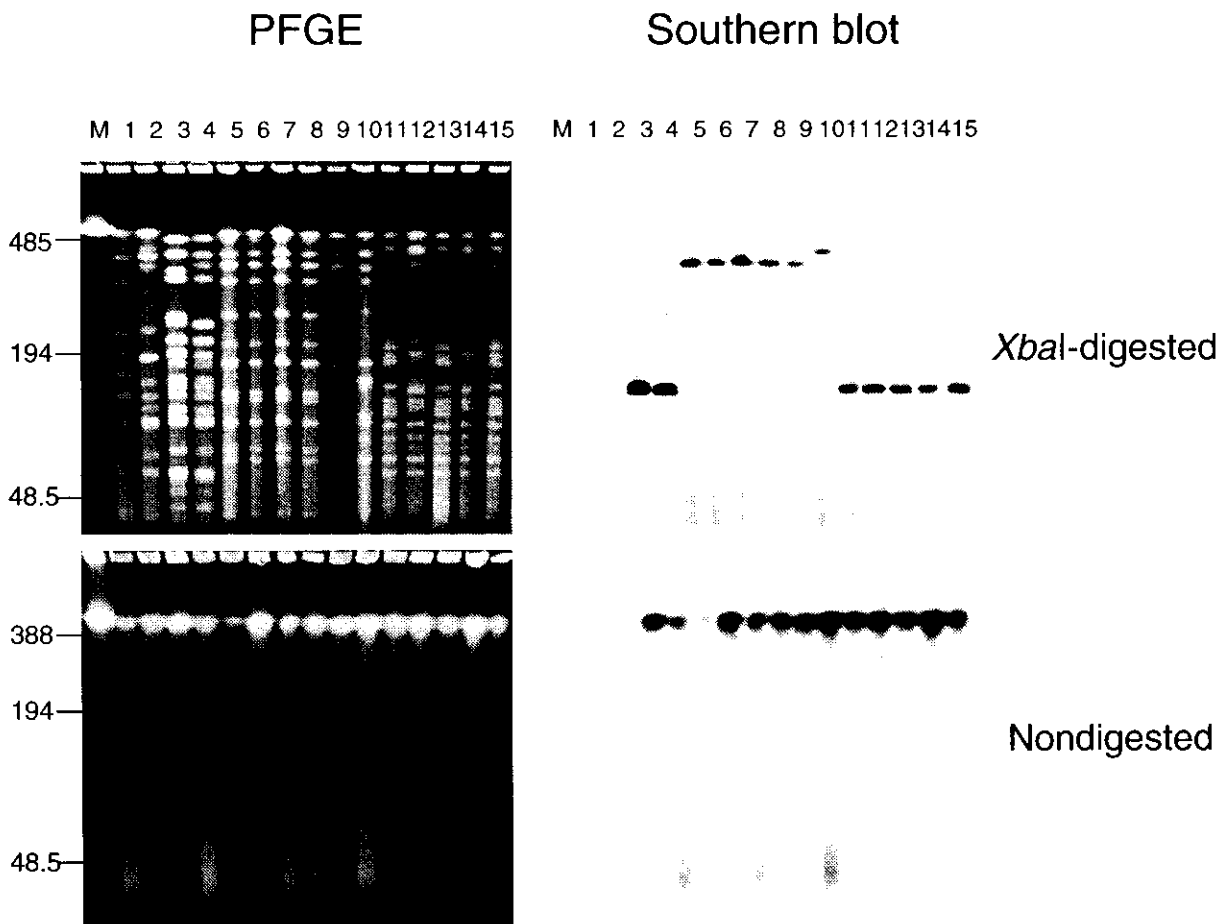
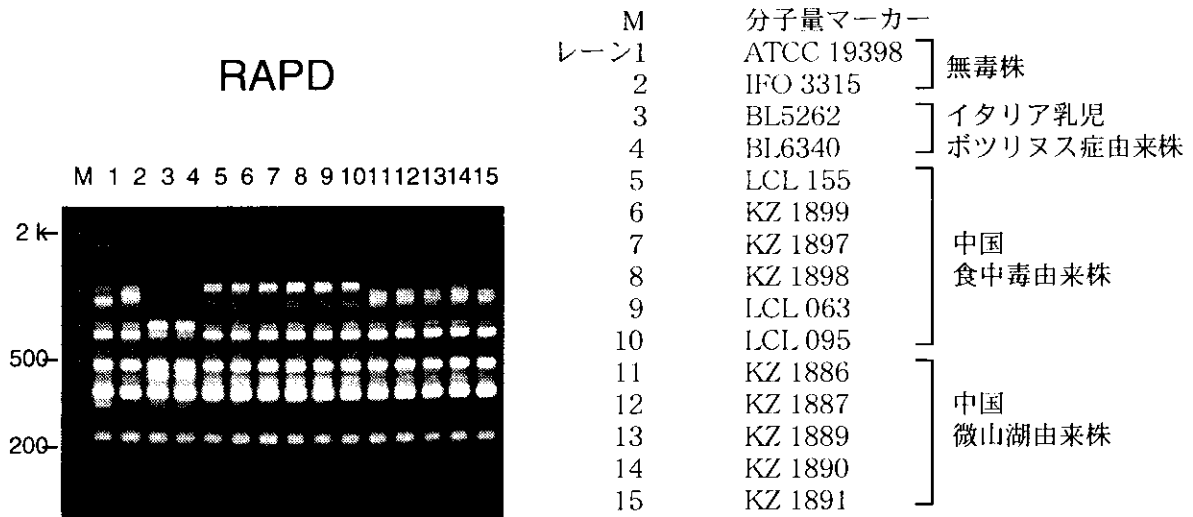


図3 分子疫学的解析

表4. E型ボツリヌス毒素産生性ブチリウム菌の遺伝子型のまとめ

クラスター (菌株数)	サブクラスター (菌株数)
1. 乳児ボツリヌス型 (2) またはイタリア型	BL 5262 (1)
	BL 6340 (1)
2. 食中毒型 (6)	LCL 155 (4)
	LCL 063 (1)
	LCL 095 (1)
3. 微山湖型 (5)	KZ 1886 (3)
	KZ 1887 (2)

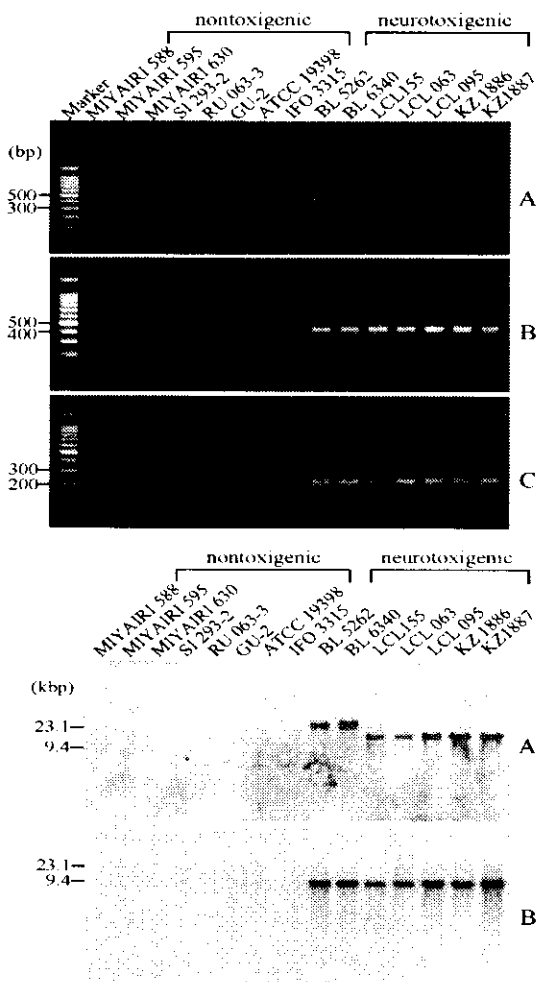


図4. E型ボツリヌス毒素遺伝子の検出. 上, プライマーセット(A) E1-E2, (B) KTE18Fw-KTE15Rv, (C) KTE8Fw-KAG168によるPCRアッセイ. 下, (A) *Bgl*III および (B) *Xba*I消化によるサザンブロット解析.

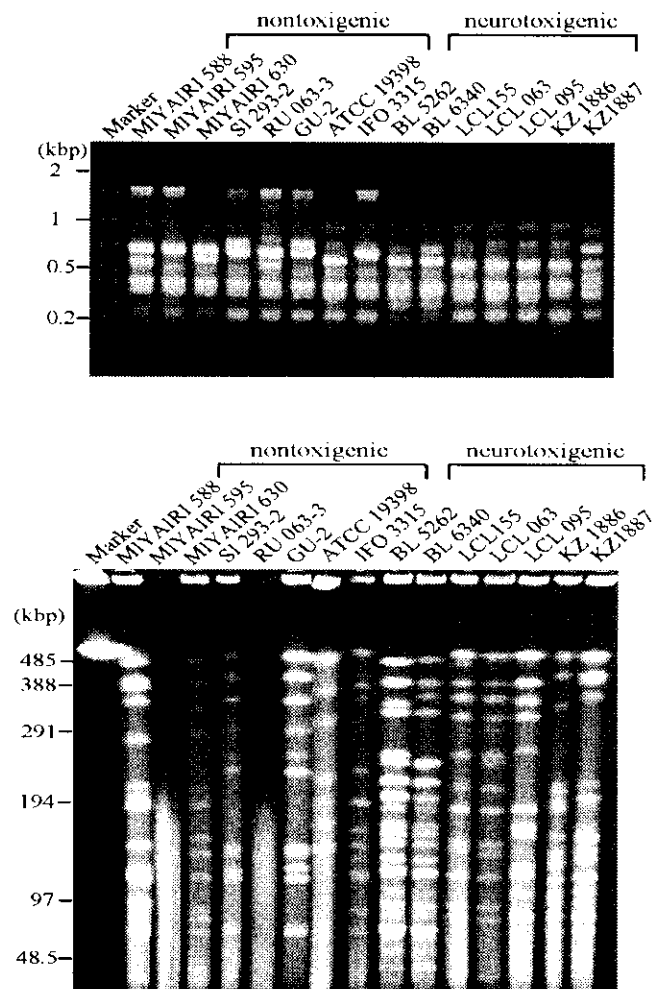


図5. 分子疫学解析. 上, RAPDアッセイ. 下, *Xho*I消化によるゲノムDNAのPFGEパターン.

分担研究報告書

ヒト型抗体の作製に関する研究

－試作沈降多価（A,B,E及びF型）ボツリヌス毒素のヒトの免疫応答

－

分担研究者 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部
協力研究者 小崎俊司、向本雅郁 大阪府立大学農学部
徳丸洋一、鳥居恭司、川口清二郎 千葉県血清研究所

研究要旨

昨年度までに試作製造した多価ボツリヌス毒素（A,B,E及びF型）をボツリヌス毒素の研究従事者に接種した。その結果、現行破傷風毒素接種時に観察される局所の軽度な発赤や腫脹は観察されたが、安全性に疑問を抱くような副反応は認められなかった。また、ボツリヌス毒素に対する中和抗毒素価をマウス法で定量した結果、毒素を3回注射2週間後には発症効果を期待できる抗毒素価の上昇を確認した。さらに、基礎免疫終了した5名の研究者に追加免疫を行い、毒素接種9ヶ月後及び1年後の各型抗毒素価を測定し、抗毒素価の推移を調査した。

A. 研究目的

食餌性ボツリヌス症の治療に用いられているボツリヌス抗毒素製剤はウマ血清由来であるために、使用に際して血清病等の副反応の発現が心配されている。ヒト型モノクローナル抗体が開発されれば、食餌性ボツリヌス症の治療ばかりでなく、乳児ボツリヌス症に対しても抗毒素による治療効果が期待できる。ヒト型モノクローナル抗体の作出方法にはいくつかの方法が報告されているが、今回ボツリヌス毒素に対す

る中和活性を認識するヒトリンパ球とマウスーヒトミエローマ細胞を融合させる方法について検討する。ボツリヌス毒素免疫後のヒトリンパ球を得るために、安全性と有効性について品質管理・保証された毒素が必要となる。我々は、現在ジフテリア、破傷風の予防に用いられている毒素ワクチンと同様な手法でボツリヌスA,B,E及びF型毒素を試作し、実験動物で安全性と有効性を確認した。その毒素でヒトを免疫後、各々の抗毒

素価を測定して抗毒素価の高い接種者からリンパ球を得て、高い抗体を産生する融合株の作製に供する。

一方、食餌性ボツリヌス中毒の治療にはウマ抗毒素製剤が用いられている。国内で製造・販売されている抗毒素は千葉県血清研究所1社で製造されているため、緊急時対応のため、本製剤の海外の製造状況についても調査した。

B. 研究方法

Clostridium botulinum type A-97, type B-Lamanna, type E-35396及び type F-Langelandの各菌株を2% peptone (ミクニ)、1% glucose (和光製薬)、0.5% yeast extract(Difco) 及び0.1%L-cysteine (関東化学) を pH6.3に調整後、110℃20分間高压蒸気滅菌した培地に接種後、3~5日間 35℃で培養した。培養菌液を酸沈殿、硫安塩析及びTOYO-pearlによるゲル濾過を行い、部分精製毒素を得た。各精製毒素にホルマリン(最終濃度0.4%)を加え、37℃で無毒化をおこなった。調整した各トキソイドの安全性は、生物学的製剤として現在用いられている破傷風トキソイドの製剤基準に準拠した。また、有効性の評価としてはトキソイドをモルモットに注射して経時的に血中抗毒素価を測定し、さらに各々の毒素を攻撃して毒素による発症(麻痺の発現等)抑制を試験した。最終剤型は各トキソイドを混合した多価(A,B,E及びF)トキソイドについて安全性と有効性の試験を行った。

実験動物で有効性を確認した沈降

多価ボツリヌストキソイドを用いて、ボツリヌス毒素の研究に携わる研究者に接種した。ELISA及びマウス中和試験法により血中抗毒素価を測定してトキソイドの有効性を確認した。トキソイド接種は総数15名の研究者に行った。基礎免疫としては4-5週間隔で3回皮下注射した後、2-3週目に採血して、A,B,E及びF型抗毒素抗体を定量した。

さらに、5人の研究者については接種後、9ヶ月後および12ヶ月後の各型抗毒素価を測定し、免疫の持続期間についても検討した。

(倫理面への配慮)

本年からのボツリヌストキソイド接種の希望に際しては、別紙1のような書類を用意し、接種する本人の同意及び医師による健康診断の実施確認を文書として記録するようにした。また、トキソイド接種後の免疫応答を調べるために、トキソイド接種前・後の採血、血中抗毒素価の測定について研究協力を依頼する書類を整えた。なお、抗毒素価測定における実験動物の取り扱いについては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行った。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 結果

基礎免疫としてトキソイドを3回注射した4名について、2週後、9ヶ月後及び12ヶ月後に採血して、各型抗毒素価を測定した。また、1名は、

基礎免疫終了後、約5~7年間隔で2回追加免疫を行い、27週後、9ヶ月後及び12ヶ月後に採血して抗毒素価を測定した(表1)、また、4名の各型抗毒素の平均価を表2に示した。トキソイド接種後、各型の成績を比較すると、A型抗毒素値は他の型に比べ高い応答を示し、B型抗毒素価は低い結果となった。4名の個人別の免疫応答の比較では、特に大きな差は認められなかった。いずれの型、個体でも免疫後2週目の抗毒素価が高い場合は、9又は12ヶ月後の抗毒素価は高い傾向にあった。

トキソイドを5回接種した後、約3ヶ月間隔で経時的に測定した各型抗毒素価はいずれも高いレベルで推移し、12ヶ月後でも抗毒素価の減少は僅かであった。

各測定時期の抗毒素価の減少率の比較では、トキソイド接種後2週から9ヶ月で各型抗毒素とも90%前後が減少した(表3)。接種9ヶ月後から12ヶ月での減少率には抗毒素の型により0, 35及び50%とバラツキが認められた。また、接種2週から9ヶ月後の減少率では、個人差も認められず、約90%の抗毒素の減少が認められた(表4)。

海外でのボツリヌス抗毒素の製造状況を表5に示した。これら抗毒素の品質については今回調査出来なかったため、緊急輸入して使用することを考慮して、国内生物学的製剤基準に準拠した試験法での検討が必要である。

D. 考察

トキソイド3回接種後、12ヶ月では測定した4名の平均値は0.1単位前

後となった。破傷風トキソイドの接種では、基礎免疫2回接種後1年後に追加接種を推奨している。本トキソイドの接種目的は、実験室内の事故を防ぐためであり、十分な抗毒素価を維持するには基礎免疫3回接種後1ヶ年程度に追加接種が必要であろう。過去の接種を併せて5回接種した研究者でも、トキソイド接種後の副反応は観察されていない。また、免疫回数を増すごとに高い抗毒素価を長期間持続する結果が得られている。ボツリヌスの感染、高濃度の毒素を取り扱い実験室内事故の危険性が高い従事者には血中抗毒素の定期的な測定、トキソイド接種を推奨する。

基礎免疫(3回接種)後の応答ではA型抗毒素価が高い傾向に反し、トキソイドを5回接種した研究者の抗毒素価では、E型抗毒素価が高い成績が得られた。この理由として、過去に接種したトキソイドのロットと今回のロットが異なるために各型トキソイドの混合比、免疫原性に違いが生じた可能性がある。

E. 結論

試作した多価ボツリヌストキソイドをヒトに接種した結果、軽度な局所の発赤、腫脹は観察されたが、重大な副反応は認められなかった。また、トキソイド接種後、速やかに抗毒素の誘導が確認され、発症防止効果を十分期待できるレベルと考える。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

1) 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イ
ドの試作製造」 第4回日本ワクチ
ン学会、横浜、(2000.11.)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当無し

表1. トキソイド注射後の各型中和抗毒素価の推移 (マウス法)

氏名	*1	A	B	E	F
Ito	3-2W	1.60	0.60	0.40	1.60
	3-9M	0.10	0.05	0.05	0.05
	3-12M	0.07	<0.05	<0.07	0.05
Kawa	3-2w	1.10	0.80	0.40	0.80
	3-9M	0.10	<0.03	0.05	<0.04
	3-12M	0.07	<0.05	<0.07	<0.03
Dega	3-2w	8.90	0.80	3.20	0.80
	3-9M	0.70	0.10	0.40	0.07
	3-12M	0.56	0.14	0.20	0.07
Tori	3-2w	2.30	0.60	1.60	1.10
	3-9M	0.13	0.05	0.20	0.07
	3-12M	0.05	0.07	0.10	<0.03
Toku	5-27w	4.00	2.00	16.00	5.60
	5-9M	5.70	1.00	16.00	2.80
	5-12M	5.60	>1.05	<10.7	2.00

*1 : 注射回数-採血時期 (W : 週後, M : 月後)

表2. トキソイド注射後の各型平均中和抗毒素価

*1	A	B	E	F
3-2W	3.48	0.70	1.40	1.08
3-9M	0.26	0.07	0.18	0.06
3-12M	0.19	0.11	0.15	0.06

*1 : 注射回数-採血時期 (W : 週後, M : 月後)

表3. トキソイド接種後の各型平均抗毒素価の減少率

	A	B	E	F
3回注射2週後から9ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	92.0	90.0	87.5	95.3
3回注射9ヶ月後から3ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	35.0	(0)	50.0	0.0
5回注射2週後から9ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	0.0	50.0	0.0	50.0
5回注射9ヶ月後から3ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	2.0	(0)	(0)	(0)

表4. 個人別の全型抗毒素価の減少率

	Ito	Kawa	Dega	Tori	平均
3回注射2週後から9ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	92.4	89.2	89.6	91.8	90.8
3回注射9ヶ月後から3ヶ月経過後の抗毒素価の減少率	15.0	30.0	7.0	23.0	18.8

表5. 国内外で市販されているボツリヌス抗毒素製剤 (WHO資料を編集)

TYPE	MANUFACTURER NAME	COUNTRY	ADDRESS	TEL
Botulinium Antiserum, Type: A, B, E, AB, ABE	MA - RESEARCH INSTITUTE OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES	Bulgaria	Sofia 1050	43 471
Botulism Antitoxin Trivalent (Equine) Types A, B and E liquid	CONNAUGHT LABORATORIES	Canada	Box 1755 station "A" Ontario M2R 3T4	(416)667 2701
Preparation containing heterologous immunoglobulins to neutralize toxins secreted by Cl. botulinum (horse sera)	PASTEUR-MERIEUX SERUM & VACCINS	France	58 avenue Leclerc Lyon 69007	(33)4727 37707
Botulism Antitoxin. Polyvalent Immunoglobulin from equine immune serum, enzymatically treated liquid	BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT	Germany	Postfach 1140 Marburg Lahn 1 3550	(06421) 390
Botulinum serum. Equine, freeze-dried	NUOVO I.S.M	Italy	Milano 20124	26697736
Botulism Antitoxin, Monovalent (type E)	CHIBA SERUM INSTITUTE	Japan	Ichikawa	0473

Botulism Antitoxin, Quadrivalent (types A, B, E, and F) Freeze-dried				Chiba 272	723571
<i>Clostridium botulinum</i> type ABE antitoxin equine <i>Clostridium botulinum</i> type E antitoxin equine <i>Clostridium botulinum</i> type B antitoxin equine <i>Clostridium botulinum</i> type A antitoxin equine	BIOMED	Poland	Warsaw		
Antibotulinus serum type A Antibotulinus serum type B Antibotulinus serum type E	FEDERAL STATE UNITARY ENTREPRISE ALLERGEN	Russian Federation	Stavropol 355019		250548
<i>Clostridium botulinum</i> Antitoxin (Equine) Types A, B, E	IMMUNOPREPARAT RESEACH PRODUCTION ASSOCIATION	Russian Federation	Ufa Bashkortostan 450024		0107347 2213169
Botulism Antitoxin	DEPARTMENT OF HEALTH	United Kingdom			
Tetra-toxoid (mixture of botulism toxoid A, B, E and Tetanus Toxoid) Tri-toxoid (mixture of Cl. Botulinum toxoid types A, B, E) purified adsorbed	IMMUNOPREPARAT RESEACH PRODUCTION ASSOCIATION	Russian Federation	Ufa Bashkortostan 450024		0107347 2213169

平成 2000 年 4 月 5 日

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

ボツリヌス症の診断及び研究に際して、ボツリヌス菌及び毒素の検査・研究を行う研究者が、万一実験室内の事故による発症を予防するために、ボツリヌス A,B,E 及び F 型毒素に対するトキソイドを試作製造しました。本トキソイドは厚生省の製造認可承認を得ておりませんが、現在市販使用されている破傷風トキソイドの製造方法に準拠し、安全性試験は生物学的製剤基準の試験項目に準拠し試験を実施、動物試験での有効性と安全性を確認しております。

接種を希望者する研究者は、別紙の使用上の注意・方法を熟読後、必要事項を記入の上、必ずコピーを保存しオリジナルをお送り下さい。

国立感染症研究所 高橋元秀
大阪府立大学農学部 小崎俊司

送付先： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部 細菌製剤第 3 室
〒206-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel：042-561-0771 (ext. 544)
Fax：042-561-7173
(お問い合わせはファックスにてお願いいたします。)

ポツリヌス毒素関連研究者の希望者に対する
ポツリヌス多価トキソイド（A,B,E 及び F 型）接種の同意書

_____年____月____日

国立感染症研究所

高橋 元秀 殿

住所：_____

氏名：_____ 印（男・女）

生年月日：_____年____月____日 （ 歳）

私は_____の研究のためポツリヌス多価トキソイドの接種を希望いたします。ポツリヌス多価トキソイドの接種については接種担当の医師からよく説明を受け、その効果、安全性、副反応の種類等につき理解いたしました。このトキソイドは厚生省における製造認可承認を得ていないトキソイドであり、我が国では国家検定はされておらず、定期接種にも任意接種にも属さないトキソイドであることも理解できました。

私は自分自身の研究の安全のために、自己の責任で接種を希望するものであり、接種により万一副反応が発生しても、何ら救済はないことも良く承知致しております。また、私は万一副反応が発生しても、貴殿らに対して一切の保証を要求は致しません。

説明の立会人（研究の指導者）の同意（自筆） _____

医師記入欄

問診及び診察の結果、今日の予防接種は （ 可能 ・ 見合わせる ）

接種担当医師（自筆）：_____

接種年月日： _____年____月____日

接種実施場所： _____

接種部位： _____

トキソイド番号： _____

トキソイドを受領いたしました。

_____年____月____日

受領者（自筆）： _____