

表 4 重鎖可変部領域 (V_H) と軽鎖可変部領域 (V_L) を長さの異なるリンカー (L1, L2, または L3) で順序をかえてつないだ一本鎖抗体フラグメント ScFv-G6 (K-Ln-H および H-Ln-K) の破傷風トキソイドとの結合活性 (ELISA)

Samples	OD ₄₉₂
HB2151	- 0.032
K-L1-H / HB2151	0.574
K-L2-H / HB2151	0.055
K-L3-H / HB2151	0.393
H-L1-K / HB2151	1.846
H-L2-K / HB2151	0.987
H-L3-K / HB2151	0.500

表 5 精製過程による抗破傷風ScFv活性

	タンパク量(μ g)	ELISA OD	比活性
細胞質画分	2.5	1.462	5.9×10^{-1}
30-55% 硫酸沈澱	2.5	1.536	6.1×10^{-1}
ゲルろ過	0.3	1.117	3.7
イオン交換	0.3	1.850	6.2

ScFvG6感染HB2151株を終濃度1mMのIPTGを含む2×YTで3.5時間培養し、破傷風一本鎖抗体の発現を誘導した。培養後、菌体を集めLysis bufferに懸濁し、超音波破碎後の上清(細胞質画分)を硫酸沈澱、Sephadex G-75を用いたゲルろ過、Toyopal SPを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、精製し、各画分に含まれる抗破傷風トキシノイド活性を表2に示したELISA法により測定した。各画分タンパク量1 μ gあたりのELISA OD値を比活性として示した。

分担研究報告書

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

主任研究者 小熊 恵二 岡山大学・医学部・細菌学講座・教授

協力研究者 (岡山大学医学部) 有満 秀幸 ナズラマホモチ
横田 憲治 藤永 由佳子 井上 薫 阪口 義彦
(石川県南部家畜保健衛生所) 早川 裕二 林 みち子

研究要旨

1) ボツリヌスC型16S毒素より無毒成分 (non-toxic non-HAとHA) を精製し、これに対するモノクローナル抗体を作製した。計11個確立されたが、7個がHA1、3個がHA3b、1個がHA2に反応した。16S毒素の小腸上皮細胞への結合性の阻害や、経口毒性の中和実験を試みたところ、HA1に反応する抗体が良く中和した。C型においては腸上皮細胞への結合にはHA3bが重要と思われていたが、HA1も重要であることが示唆された。

2) アイガモの眼に、C型16SトキソイドとLTをリポソームに封入したものを接種したものと、16Sトキソイドと水酸化アルミニウムを混ぜ、頸部の皮下に接種したものを比較したところ (両グループとも3週間隔で2回接種)、前者ではアイガモが接種後自分で眼を洗浄したため、ワクチン効果が認められなかった。後者のグループは充分な血中抗体価の上昇が認められた。

A. 研究目的

世界の各地で家畜 (特に牛) や水鳥が毎年大量死しているので、これらワクチンの開発を試みた。これまでマウスの実験で、C型16Sトキソイドを大腸菌の易熱性毒素 (LT) の無毒変異体をアジュバントとして経鼻接種すると、腸管、血中の両方で抗毒素抗体が上昇し、良いワクチン効果があることを認めた。今回は、16S毒素が腸管より吸収される機構を、赤血球凝集素 (HA) に対するモノクローナル抗体を作製することにより解析すると共に、日本で問題になっているアイガモのボツリヌス中毒を予防するため、アイガモを用いてワクチン接種実験を行った。

以下、モノクローナル抗体の実験とアイガモでの実験を分けて記載する。

1) C型HAに対するモノクローナル抗体の作製とその性状

B. 研究方法

1. 抗原の精製

ボツリヌスC型菌(C-ST)の培養上清から定

法に従い16S毒素を精製し、アルカリ条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーを行ない、神経毒素とnon-toxic componentを分離した。得られたnon-toxic componentを0.4%ホルマリンを含んだ10mMリン酸緩衝液 (pH8.0)に室温で一週間透析した後、抗原として用いた。

2. モノクローナルの作製

抗原 (non-toxic component)をBALB/cマウス腹腔内に2回、静脈内に1回投与免疫した。免疫マウス脾臓細胞とミエロマ細胞P3U1をポリエチレングリコールを用いて融合させ、HAT選択の後、陽性クローンをELISA法により選別した。限界希釈法により単クローンを分離した後、ELISA法により陽性クローンを選択した。この陽性クローンをそれぞれBALB/cマウス腹腔内に接種後、得られた腹水からDE52によるカラムクロマトグラフィー、硫酸塩析により抗体を精製した。

3. ELISA

non-toxic componentを5 μ g/mlに調製し、抗原として用いた。二次抗体は抗マウスIg抗体を用い、発色にはOPDを使用した。

4. 赤血球への結合阻害試験

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のnon-toxic componentを96穴のプレートに50 μl ずつ添加し、4°Cで一晩置き、non-toxic componentをプレートに結合させた。PBSでプレートを洗浄後、1%BSA-PBS溶液を150 μl ずつ加えて、室温で2時間ブロッキングを行い、PBSで希釈したmAbを100 μl ずつ加えて、室温で1時間反応させた。その後1%BSA-PBS溶液で1%に希釈した赤血球を100 μl ずつ加えて、室温で30分反応させ、PBSで5回洗浄後、接着した赤血球を50 μl の水で溶血させ、405nmにおける吸光度を測定した。

5. モノクローナルのサブクラスの決定

ZYMED社のMouse MonoABID/SP KITを用いた。

6. Western blotting

各抗体が認識するサブコンポーネント及びエピトープについてはWestern blottingにて解析を行った。抗原を電気泳動後、PVDF膜に転写し、各mAbあるいはnon-toxic componentに対するウサギポリクローナル抗体と反応させた。二次抗体として抗マウスIg抗体または抗ウサギIg抗体を用いた。

7. リコンビナントHAサブコンポーネントの作製と精製

HA1及びHA3bはGST-融合蛋白質として大腸菌で発現させ、Glutathione sepharose 4Bにより精製した。HAサブコンポーネントとGSTの分離にはRestriction Protease Factor Xa Cleavage and Removal Kit(Boehringer)を用いた。GST-HA1とGST-HA3bを酵素：蛋白質=1：50の重量比率でBiotin-labeled restriction protease factor Xaと混合し、それぞれ10時間と5時間室温で反応させた後、Streptavidin gelを用いてFactor Xaを除き、GST部分はGlutathione sepharose 4Bを用いて除去した。

8. エピトープの決定

精製した各リコンビナントHA3bをAsparaginylendopeptidaseとArginylendopeptidaseの2種類のプロテアーゼを用いて切断し、Western blottingにより解析を行った。PVDF膜の一部はN-末端アミ

ノ酸配列の解析に使用した。

9. 腸切片への結合阻害

24時間絶食したモルモットから腸管上部を2cmほど切り出し、PFAで固定した。パラフィン包埋後、5 μm の切片を作成し、脱パラフィン後1Mのグリシンで一時間処理した。この切片に、16S毒素と各抗体を37°Cで一時間反応させたものに加え、一時間反応させた。次いで0.3% H_2O_2 加メタノールで30分処理し、3%のヤギ血清で一時間ブロッキング後、一次抗体として抗C型non-toxic component ウサギポリクローナル抗体を4°Cで一晩反応させた。翌日、ビオチン化二次抗体で処理した後、アビジン・ビオチン・ペルオキダーゼ複合体と30分反応させた。DAB- H_2O_2 反応液で処理し、最後に、ヘマトキシリンで核染色し、脱水、透徹、封入した。

10. 中和実験

C型16S毒素液 1×10^4 マウスipMLD/mlを経口投与(0.3ml)したものが、最小経口致死量であったので、 4×10^4 マウスipMLD/mlの毒素と等量の希釈した各抗体を37°C、一時間反応させた後、その0.3mlを5匹のマウスに経口投与した。

C. 研究結果

1. 各抗体の性質

今回の実験で11種類のモノクローナル抗体が得られた。ELISAによる解析の結果から、11種類のモノクローナル抗体のうち489、54、394、23、29、28、15はHA1に対する抗体、12、6、62はHA3bに対する抗体、14はHA2に対する抗体であることが明らかになった(表1、2)。HA1に対するモノクローナル抗体のうちHA1-54、HA1-29、HA1-23、HA1-15はWestern blottingではいずれの蛋白バンドとも反応しなかったが、non-toxic componentとリコンビナントHA1を用いたELISAでは反応性を示した(表1)。non-toxic componentを抗原として各抗体を段階希釈してELISAを行った結果、各抗体の抗原との反応性はそれぞれ異なっていた(図1)。各抗体のサブクラスは、CHA1-54、CHA1-15、

CHA1-23, CHA1-28, CHA2-14, CHA3b-12, CHA3b-62がIgG1, CHA1-29, CHA1-394, CHA3b-6がIgG2b, CHA1-489がIgG2aであり、L鎖は全てK型であった(表2)。

2. 赤血球への結合の阻害

ELISAで吸光度が0.4を示す各抗体の蛋白濃度をそれぞれ300倍にした値を1Unitとして、各抗体によるRBC bindingの阻害実験を行った。どの抗体もUnit数に依存してRBC bindingを阻害した(図2)。HA1に対する抗体のIC50は1.4-0.09unitであり、各抗体による阻害活性は15倍程度までしか異ならなかった。これに対してHA3bに対する抗体のIC50は75と0.08であり、2種類の抗体による阻害活性は約1000倍異なることが判明した。

3. エピトープの解析

HA3bに対する各モノクローナル抗体が認識するエピトープを解析した結果、HA3b-12, HA3b-6, HA3b-62はそれぞれ図3, 4に示した部分と反応することが推察された。

4. 小腸切片への結合の阻害

モノクローナル抗体によるC-ST16S毒素の小腸切片への結合の阻害を検討した(表2)。HA1に反応する抗体7種類中4種類は顕著な阻害活性を示した。これに対しHA3に反応する抗体3種類の阻害活性は、弱い(1種類)かほとんど読められなかった(2種類)。HA2に対する抗体も阻害しなかった。これら小腸切片に対する抗体の阻害パターンは赤血球に対するものとは多少異なっていた。

5. 中和実験

マウスの最小経口致死量の4倍の毒素と各抗体を反応させ、経口投与したところ、毒素の小腸切片への結合阻害の度合いに応じて中和の効果が読められた(表2)。最小致死量の8倍以上を用いた場合は、致死時間の延長は認められたが、最終的には全てのマウスは死亡した。また数種類の抗体を混合しても、中和抗体価の顕明な上昇は読められなかった。

C. 考察

今回得られた11種類のモノクローナルはいずれもELISAでは反応性を示した。Western

blottingで反応性を示さない抗体は4種類得られ、それらはいずれもHA1を認識していた。これら4種類のモノクローナル抗体はHA1の高次構造を認識していると推察された。

HA3bに対するモノクローナル抗体のエピトープ解析の結果から、CHA3b-12, CHA3b-62, CHA3b-6はHA3bの175残基目よりC端側の異なる領域を認識していることが明らかになった。小腸切片への結合の阻害実験と中和実験の結果からは、HA1が関与していることが示唆された。経口最小致死量8以上の毒素を用いると中和出来ない理由としては、腸内で16S毒素が12S毒素と無毒成分に解離するため、抗HA抗体では中和しきれない、ということが考えられた。

2) アイガモ用ワクチンの開発

B. 研究方法

1) 16Sトキソイドの作製

C-Stockholmより作製した16S毒素を10mMリン酸バッファー(pH8.0)中で0.6%ホルマリンに30℃、1週間作用させ不活化した。

2) トキソイド封入リポソームの作製

DPPC 1 μ mol, DPPS 1 μ mol, コレステロール2 μ mol, DTP-DPPE0.05 μ molの濃度で形成した脂質フィルムに、16SトキソイドとLTを封入した。

3) 皮下免疫用トキソイドの作製

250 μ g/mlの16Sトキソイドに水酸化アルミニウムを5mg/mlになるように加えた。

4) 免疫方法

点眼、皮下接種とも3週間間隔で2回免疫した。点眼接種は1眼30 μ lで2眼に行った。リポソームへの封入率の異なりから、60 μ l中のトキソイド量は1回目は約80 μ g、2回目は約35 μ gと計算された。皮下接種にはトキソイド50 μ g/0.2mlを行った。その他「トキソイドトリポソーム」など、幾つかのコントロール群も作成した。

5) 血中抗体価の測定

免疫したアイガモより末梢血を採取し、血中抗体価をELISAとマウスを用いた中和試験により測定した。まず、ELISA用の2次抗体を

作製した。アイガモよりIgGを、33%硫酸沈殿、sephacryl S-300、DEAE-Toyopearl 650Mで精製し、ウサギに免疫して得た。ELISAは96穴のプレートを用いた。各wellに1 μ gの16S毒素をコートし、これに希釈したアイガモ血清、抗アイガモIgGウサギ抗体、酵素標識抗ウサギブタ抗体、基質の順で反応させ、OD490nmで測定した。

6) 中和抗体価の測定

希釈したアイガモ血清と10マウスMLD/mlのC型16S毒素を同量ずつ混ぜ、37°C、1hr反応させた後、その0.5mlをマウスの腹腔内に接種した。

7) 免疫ガモへのチャレンジ実験

アイガモに16S毒素液0.5mlを静脈注射した時の最小致死量は1 \times 10³マウスMLD/mlであったので、皮下接種したアイガモをその10倍(1 \times 10⁴MLD)、100倍(1 \times 10⁵MLD)量の毒素でチャレンジした。

(倫理面への配慮)

動物実験は規則にのっとり行った。

C. 研究結果

1. 免疫方法

点眼接種されたアイガモは、直ちに眼を自分で洗浄したため、この方法は不適であることが判明した。

2. 血中抗体価

皮下接種したアイガモは、ELISAでは2000倍希釈でも陽性(OD=1以上)であった(図5)。また中和抗体は10~100倍であった。

3. チャレンジ実験

皮下接種した各3匹のアイガモにアイガモの最小致死量の10、100倍量の16S毒素でチャレンジしたところ、100倍量でも発症しなかった。

D. 考 察

ニワトリを用いて腸管免疫を亢進させる時には点眼接種が行われている。今回それに従い点眼接種を行ったが、アイガモの場合は接種後、直ちに洗眼してしまったため、本方法は使用できないことが明らかになった。経口

投与により局所免疫を亢進させる方法を考案する必要があると思われた。皮下接種されたグループは、血中抗体価はある程度上昇しており、最小致死量の100倍量の毒素のチャレンジに対しても抵抗性を示したので、ワクチンとしては十分に機能していると結論された。

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) Wang, X., T. Maegawa, T. Karasawa, S. Kozaki, K. Tsukamoto, Y. Gyobu, K. Yamakawa, K. Oguma, Y. Sakaguchi, S. Nakamura. 2000. Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4992-4997.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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)

- 6) 小熊惠二 (2000) : 乳児ボツリヌス症治療 82 : 772-776
- 7) 小熊惠二 (2000) : 乳児ボツリヌス症小児科 41 (6) 963-971
- 8) 小熊惠二 (2000) : ボツリヌス菌 medicina 37 (10) , 1712-1715.
- 9) 小熊惠二 (2000) : ボツリヌス 小児感染免疫 12 (4) , 427-430.
- 10) 小熊惠二, 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.

2. 学会発表

下記1) ~5) CLOSTPATH2000 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.

下記6) ~9) 第73回日本細菌学会総会, 札幌, 日本細菌誌55, (2000)

- 6) 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 ボツリヌス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
- 7) 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 ボツリヌス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
- 8) 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 ボ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
- 9) 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型ボツリヌス毒素変換のファージゲノム解析
- 10) 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 ボツリヌス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)
- 11) 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, 創傷を介した新興・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）

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 モノクローナル抗体の性質

mAbs to non-toxic component	subclass of mAbs	Western blotting	ELISA
CHA1-489	IgG2a κ	HA1	HA1
CHA1-394	IgG2b κ	HA1	HA1
CHA1-28	IgG1 κ	HA1	HA1
CHA1-54	IgG1 κ	No band	HA1
CHA1-23	IgG1 κ	No band	HA1
CHA1-29	IgG2b κ	No band	HA1
CHA1-15	IgG1 κ	No band	HA1
CHA3b-6	IgG2b κ	HA3b	HA3b
CHA3b-12	IgG1 κ	HA3b	HA3b
CHA3b-62	IgG1 κ	HA3b	HA3b
CHA2-14	IgG1 κ	HA2	HA2

表2 赤血球への結合阻害実験と中和実験

Ab	Inhibition of the binding						Neutralization test	
	Erythrocyte			Small intestine			Mice	
	16S toxin	NT-component	GST-HA1	GST-HA3b	16S toxin	16S toxin (2MLD)		
CHA1-489	+	++	++	-	++	ssss		
CHA1-394	+	++	++	-	++	sssdd		
CHA1-28	+	++	++	-	-	sdddd		
CHA1-54	-	+	+	-	+	sssdd		
CHA1-23	++	++	++	-	++	sssdd		
CHA1-29	++	++	++	-	++	sssdd		
CHA1-15	++	++	++	-	+	ssddd		
CHA3b-6	-	-	-	++	-	dddddd		
CHA3b-12	-	+	-	++	-	dddddd		
CHA3b-62	ND	ND	-	++	+	ssddd		
CHA2-14	-	-	-	-	-	dddddd		
anti-NT-component	++	++	ND	ND	++	sssss		
anti-neuro toxin	-	-	ND	ND	ND	dddddd		

図1 モノクローナル抗体と各抗原との反応性

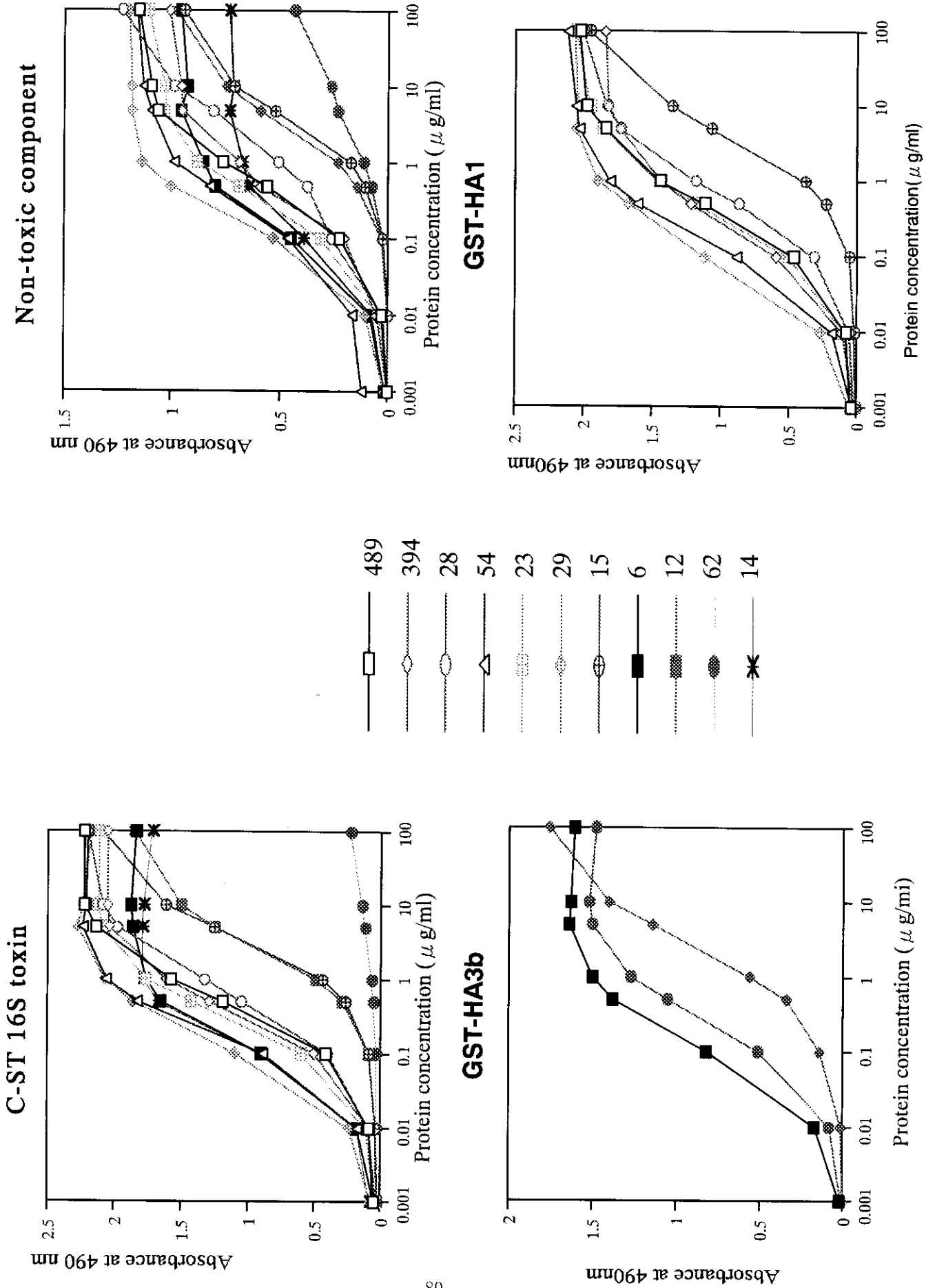


図2 モノクローナル抗体による赤血球への結合の阻害

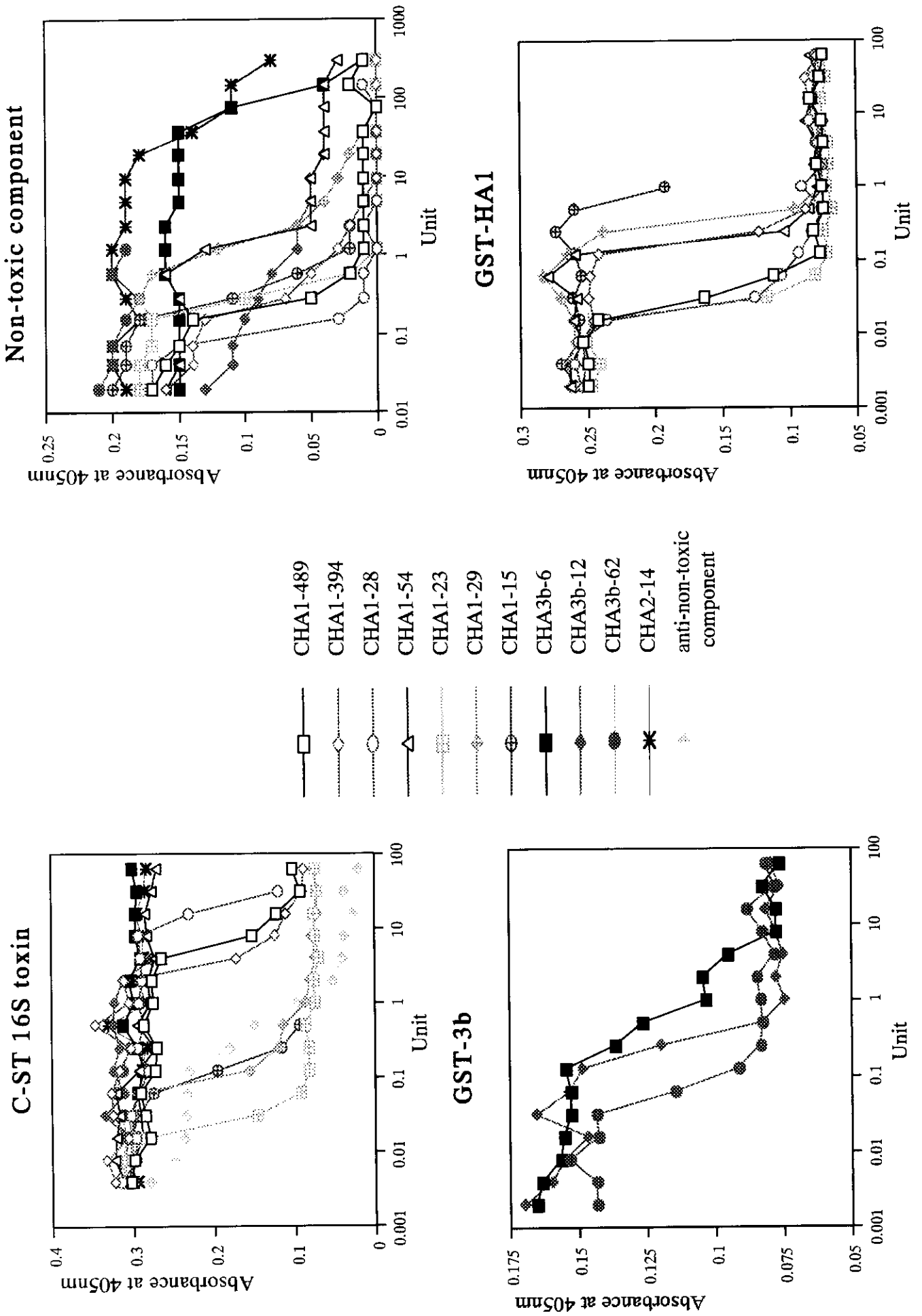
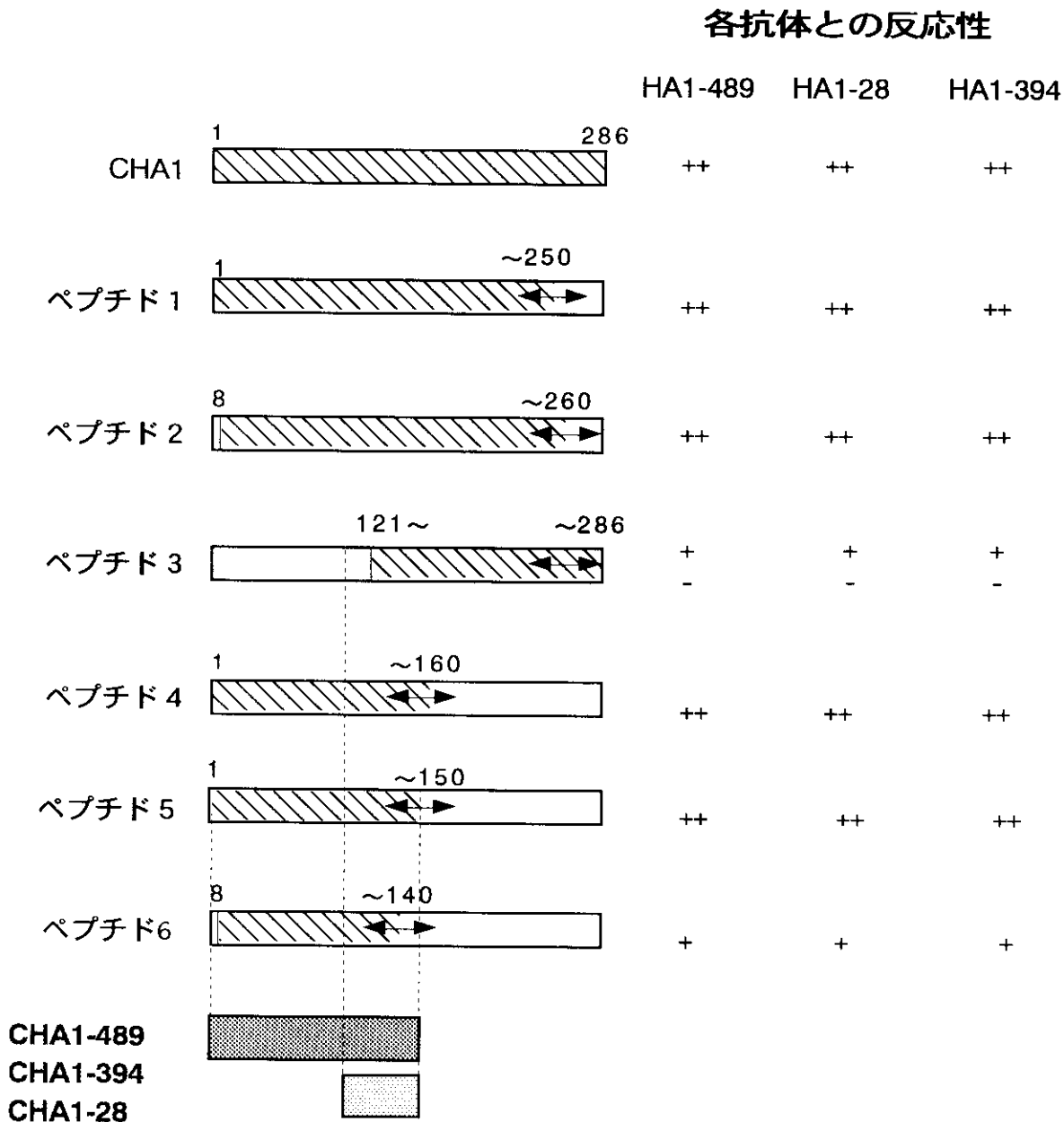


図3 HA1に対するmAbsとペプチドとの反応性及び推察されるエピトープ領域





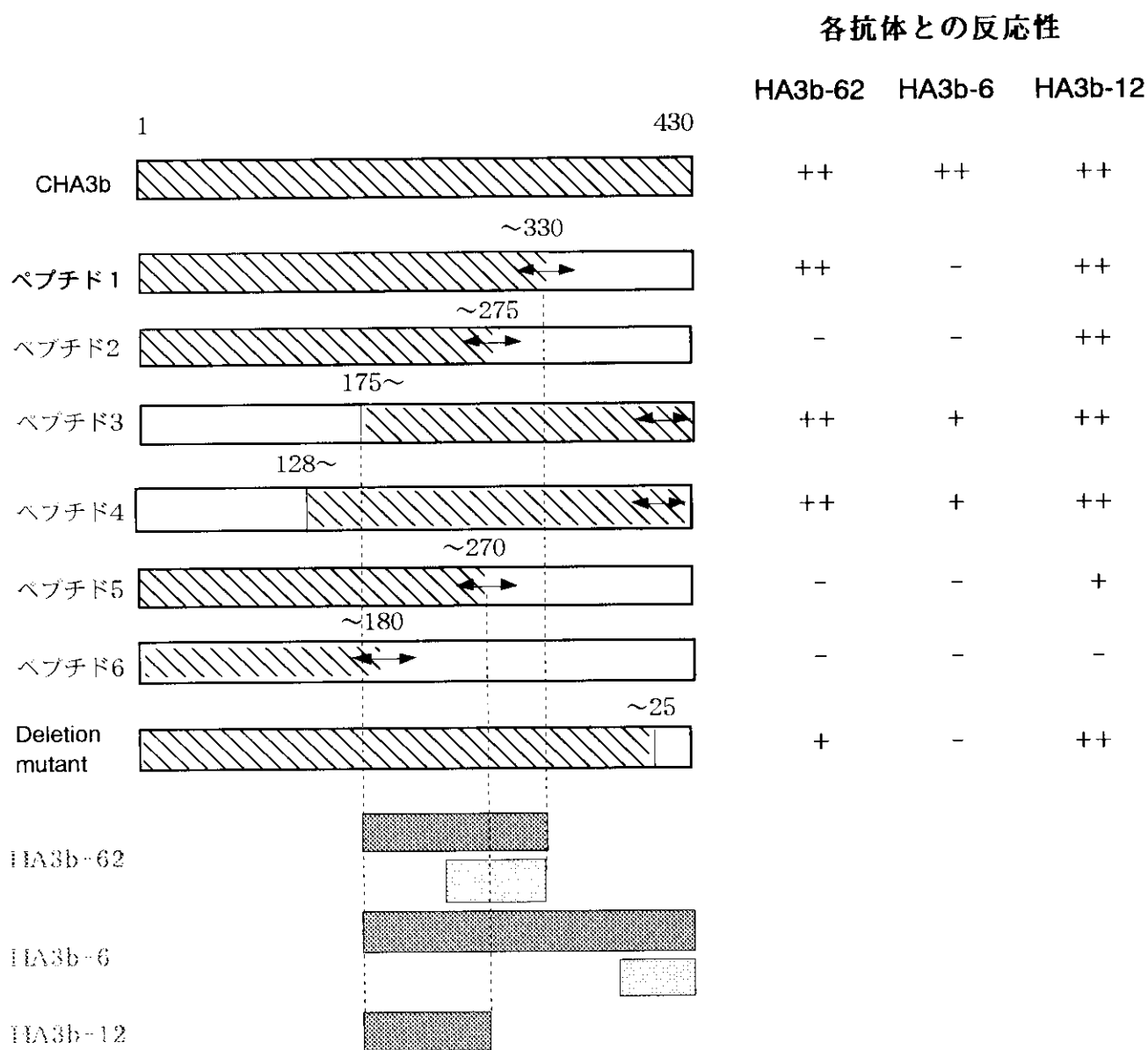
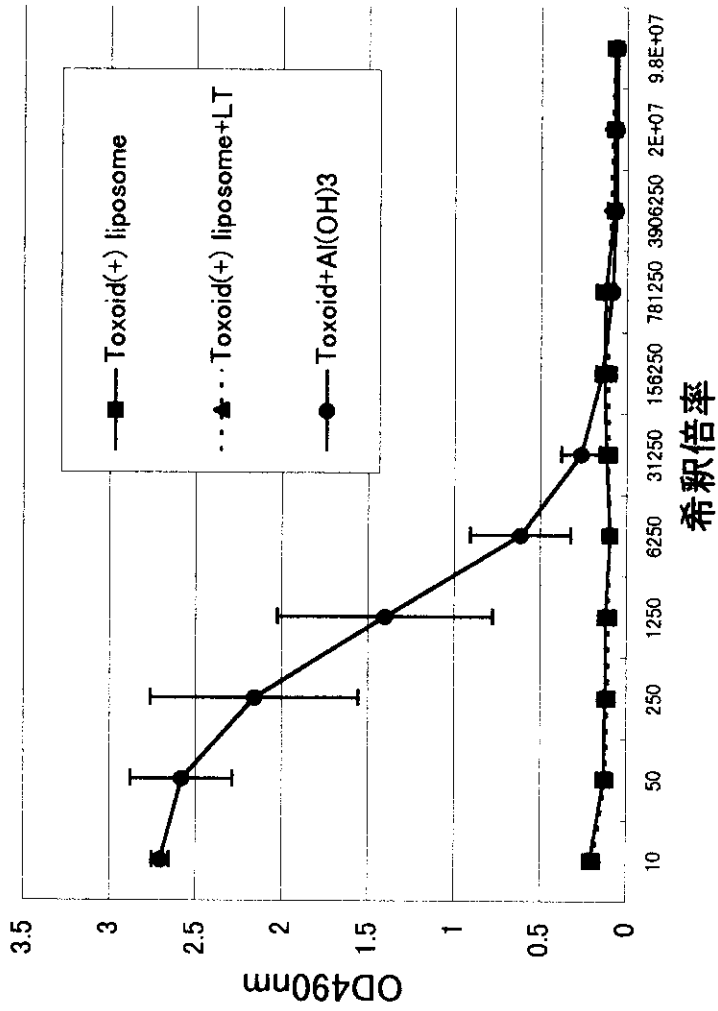
リコンビナントHA1をプロテアーゼ処理して得られたペプチド(1-6)の模式図を左に示し、各抗体との反応性を右に示した。(反応性あり、+, ++; 反応性なし、-)。ペプチドとの反応性はWestern blottingにより解析した。ペプチドの正確な切断箇所が不明な部分は←→で示した。各抗体と反応するペプチドから推定されたエピトープ領域は  で、更に反応性が弱かったペプチドから推定された領域は  で示した。

図4 HA3bに対するmAbsとペプチド及び deletion mutantとの反応性及び推察されるエピトープ領域



リコンビナントHA3bをプロテアーゼ処理して得られたペプチド(ペプチド1-6)及びC末端領域が欠損したdeletion mutantの模式図を左に示し、各抗体との反応性を右に示した(反応性あり、+, ++; 反応性なし、-)。ペプチドと各抗体との反応性はWestern blotting、deletion mutantとの反応性はELISAにより解析した。ペプチドのC末端の正確な位置は不明であるため ←→ で示した。各抗体と反応するペプチドから推定されるエピトープ領域を で、さらに反応しなかったペプチドから限定される領域を で示した。

図5 C-St 16Stキノンイド免疫カモ血清中抗体価



ボツリヌス症の早期診断法の確立

梶 龍兒¹

ボツリヌス症（中毒）の治療に際して最も重要なことは早期に診断を確定することである。本研究では、あらたに行った電気生理学的研究をもとに本症の早期臨床診断法についてまとめた。早期診断には臨床的に本症を疑うことから始まり電気診断法で確定にいたる。その意味で電気生理学的な検査を行える救急センター・三次救急病院を地域的に整備しておく必要がある。

A. 研究目的

ボツリヌス症（中毒）の治療に際して最も重要なことは早期に診断を確定することである。本研究では、あらたに行った電気生理学的研究をもとに本症の早期臨床診断法についてまとめた。

B. 研究方法

ボツリヌス毒素治療をうけた片側顔面痙攣患者 3 名において顔面神経刺激を行ない、電気生理学的所見を得た。

（倫理面での配慮）

筋電図検査についてインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. 臨床的診断法

ボツリヌス症は主に 2 つに大別される。ボツリヌス毒素に直接被曝するためにおこる古典的食中毒や治療用ボツリヌス毒素による医原性中毒と、実際に食物や創傷などにより体内に入る芽胞により感染がおこり産出される毒素により発症する場

合である。いずれの場合でも、症状はボツリヌス毒素が末梢の神経筋接合部においてアセチルコリンの産出を抑制することにより発現するが、成人例と乳児例では臨床症状に差異がある。

a. 成人型

重症の成人例では臨床症状はかなり定型である。即ち、毒素摂取後 2-36 時間後に大半の患者は頭頸部領域の筋の麻痺症状を呈してくる。具体的には、目のかすみ、二重視眼瞼下垂、外眼筋麻痺、構音障害、蒸下障害などである。次にこれらの麻痺は上肢から下肢へと下降し、最重症例では呼吸筋の麻痺にいたる。これらの症状は両側に見られるが、非対称の場合もある。症状の進行が疑われる場合は呼吸筋の麻痺に対して十分なモニターを行う必要がある。知覚障害は通常伴わないが、軽度の異常知覚を訴える例も見られる。自律神経障害も明らかで、上記の目のかすみは内眼筋の障害による。その他、口の乾き、立ちくらみ（起立性低血圧）、尿閉などが見られる。消化器症状としては便秘が最も多いが、初期

¹ 徳島大学難聴診療部

には嘔気や嘔吐下痢も見られる。表1に本性と臨床的に類似し、従って鑑別を要する病態をまとめる。

b. 乳児型

乳児型は腸管内感染によりおこり大半が6ヶ月未満の年齢でおこる。便秘が初発となることが多く、泣き声が弱くなる。哺乳力の低下、頭頸部や四肢の脱力をきたす。通常1-3日の間進行し、首のすわりが悪くなる。筋緊張の低下、自発運動の減少などで気づかれる。また自律神経障害として、副交感神経系の遮断による頻脈、低血圧、排尿障害、口渴などが見られる。乳児以外にも海外では薬物常用者などの間で注射針を介した感染性ボツリヌス症が見られることがあり、その場合の臨床症状は成人型典型例に準ずる。

c. 電気生理学的早期診断法

上記のような臨床的特徴から本症が疑われた場合、最も早期診断に有用な方法は電気生理学的な検査である。その特徴的所見を以下にまとめる。

1. 末梢神経伝導検査において、運動神経の電気刺激により得られる筋の活動電位 (Compound muscle action potential; CMAP) の低振幅が見られるが、知覚神経伝導検査は全く正常である。この所見は本症の85%以上で見られる。
2. 運動神経伝導検査で20~50Hzの高頻度刺激を10秒間与えた時に、正常では見られない振幅の漸増現象 (waxing) が見られる (Post-tetanic facilitation; テタヌス刺激后促進; 図1)。本法は痛みを伴うため意収縮 (10秒) の前後で単発刺激による筋電位の振幅を比較しても良い。この振幅の増大は30~100%に達する。Lambert-Eaton症候群においてもこの現象が見られるがボツ

リヌス症においては、振幅増大の持続が長い (1分以上) 場合が多い。このwaxing現象は少なくとも62%の患者で見られる。

3. 針筋電図所見では、持続が短く、低振幅で多相性の一見筋原性に見える運動単位が見られるが、筋原性電位とは異なり、単位数の低下が明らかである。また、Fibrillation電位や陽性鋭波などの自発放電も見られる。
4. 単一筋線維筋電図ではjitterとblock率の増大が見られるが、筋収縮後に特徴的にそれらは減少する。

D. E. 考察と結論

早期診断には臨床的に本症を疑うことから始まり電気診断法で確定にいたる。その意味で電気生理学的な検査を行える救急センター・三次救急病院を地域的に整備しておく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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(6):1276-1279.
3. Kaji R. Facts and fancies on writer's cramp. *Muscle Nerve* 2000;23(9):1313-1315.

(表1) ポツリヌス症の鑑別診断

診断	特徴・鑑別法
ポツリヌス症	頭頸部から下降していく麻痺症状
ギランバレ症候群	下肢から上行していく麻痺症状が多い。明らかな知覚障害があることが多い(軸索運動神経型を除く)、髄液タン白の上昇、Miller-Fisher型では抗GQ1b抗体が陽性
重症筋無力症	抗アセチルコリンレセプター抗体、テンシロンテスト
Lambert-Eaton 症候群	抗カルシウムチャネル抗体
Lyme 病 (Borrelia 症)	発熱、皮疹、野生動物との接触、髄液細胞の増多、中枢神経症状
ジフテリア	扁桃の浸出液
ポリオ	非対称性の麻痺、髄液タン白の上昇と細胞の増多

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamata, Y., Tahara, R., Kozaki, S.	Difference in hydrophobicity between botulinum type B activated and non-activated neurotoxin under low pH conditions	Toxicon	38	1247-1251	2000
Kohda, T., Kamata, Y., Kozaki, S.	Endocytosis of <i>Clostridium botulinum</i> type B neurotoxin into rat brain synaptosomes.	Journal of Veterinary Medical Science	62	1133-1138	2000
Wang, X., Karasawa, T., Maegawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., Nakamura, S.	Comparative analysis of nontoxigenic and neurotoxigenic <i>Clostridium butyricum</i> by molecular typing methods.	Japanese Pharmacology & Therapeutics	28	999-1004	2000
Wang, X., Maegawa, T., Karasawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., Gyobu, Y., Yamakawa, K., Oguma, K., Sakaguchi, Y., Nakamura, S.	Genetic analysis of type E Botulinum toxin-producing <i>Clostridium butyricum</i> strains.	Applied and Environmental Microbiology	66	4992-4997	2000
Murase, N., Kaji, R., Sakamoto T., Shimazu, h., Matumoto, S., Kohar, N., Shibasaki, H., Kimura, J.	Nicotine-sensitive write's cramp	Movement Disorders	15	1276-1279	2000
Mezaki, T., Matsumoto, S., Hamada,	Decreased serum ceruloplasmin and copper levels in cervical dystonia	Annals of Neurology	49	138-139	2001

C., Nukoyama, I., Sakamoto, T., Mizutani, K., Takamatsu, N., Shibasaki, H., and Kaji, R.					
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 <i>Clostridium botulinum</i> type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes.	FEBS Lett.	467	179-183	2000
T. Murphy , A. Lawson, C. Nalewajko, H. Murkin, L. Ross, K. Oguma. T. McIntyre.	Algal toxins-Initiators of avian botulism? Environ. Toxicol.	Environ. Toxicol.	15	558-567	2000
Sagane, Y., T. Watanabe, H. Kouguchi, H. Sunagawa, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Oguma, and T. Ohyama.	Characterization of nicking of the nontoxic- nonhemagglutinin components of <i>Clostridium butulinum</i> types C and D progenitor toxin.	J. Protein Chem	19	573-579.	2000
Inoue, K., Y. Fujinaga, K. Honke, H. Arimitsu, N. Mahmut, Y. Sakaguchi, T. Ohyama, T. Watanabe, K. Inoue, and K. Oguma.	<i>Clostridium botulinum</i> type A HA positive progenitor toxin (HA ⁺ -PTX) binds to oligosaccharides containing Galβ1-4GlcNAc through one subcomponent of HA (HA1).	Microbiol. (in press)			2001