

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Genetic Characterization of *Clostridium botulinum* Associated with Type B Infant Botulism in Japan[∇]

Kaoru Umeda,^{1,2} Yoshiyuki Seto,² Tomoko Kohda,² Masafumi Mukamoto,² and Shunji Kozaki^{2*}

Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan,¹ and Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-0048, Japan²

Received 14 January 2009/Returned for modification 2 March 2009/Accepted 24 June 2009

The 15 proteolytic *Clostridium botulinum* type B strains, including 3 isolates associated with infant botulism in Japan, were genetically characterized by phylogenetic analysis of *boNT/B* gene sequences, genotyping, and determination of the *boNT/B* gene location by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for molecular epidemiological analysis of infant botulism in Japan. Strain Osaka05, isolated from a case in 2005, showed a unique *boNT/B* gene sequence and was considered to be a new BoNT/B subtype by phylogenetic analysis. Strain Osaka06, isolated from a case in 2006, was classified as the B2 subtype, the same as strain 111, isolated from a case in 1995. The five isolates associated with infant botulism in the United States were classified into the B1 subtype. Isolates from food samples in Japan were divided into the B1 and the B2 subtypes, although no relation with infant botulism was shown by PFGE genotyping. The results of PFGE and Southern blot hybridization with undigested DNA suggested that the *boNT/B* gene is located on large plasmids (approximately 150 kbp, 260 kbp, 275 kbp, or 280 kbp) in five strains belonging to three BoNT/B subtypes from various sources. The botulinum neurotoxin (BoNT) of Osaka05 was suggested to have an antigenicity different from the antigenicities of BoNT/B1 and BoNT/B2 by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay with the recombinant BoNT/B–C-terminal domain. We established a multiplex PCR assay for BoNT/B subtyping which will be useful for epidemiological studies of type B strains and the infectious diseases that they cause.

Infant botulism is neuromuscular paralysis caused by the botulinum neurotoxin (BoNT) produced in the intestines after the germination and outgrowth of ingested spores of *Clostridium botulinum*, which is an anaerobic spore-forming bacterium (7, 9). On the basis of the antigenic specificity of BoNT, *C. botulinum* strains are divided into seven serotypes (serotypes A to G), and the species has been separated into four groups (groups I to IV) by cultural characteristics (24). BoNT is encoded by an approximately 3.8-kb gene, which is preceded by several non-toxic component genes (17, 30). BoNT is released from the bacteria as a single polypeptide chain of 150 kDa and is cleaved by endogenous or exogenous proteases into a 50-kDa light chain and a 100-kDa heavy chain. The heavy chain contains two functional domains, the N-terminal domain (H_N) and the C-terminal domain (H_C). H_C can be further divided into two distinct subdomains: the N-terminal domain (H_{CN}) and the C-terminal domain (H_{CC}) (5, 38).

Recently, the subtype classification was confirmed by the diversity of the amino acid sequences within each serotype (13, 37). BoNT serotype A (BoNT/A) has been divided into four subtypes (subtypes A1, A2, A3, and A4) (2, 10). BoNT/B has been divided into three subtypes from type B group I (subtypes B1, B2, and B3), one subtype from group I bivalent strains that express another BoNT type, in addition to BoNT/B (bivalent), and one subtype from type B group II (nonpro-

teolytic) (13). BoNT/E has been divided into four subtypes from *C. botulinum* type E (subtypes E1, E2, E3, and E6) and two subtypes from BoNT/E-producing *C. butyricum* (subtypes E4 and E5) (6).

Since infant botulism was first recognized in the United States in 1976 (27, 31), it is now the most common disease caused by *C. botulinum*. This disease affects children up to 6 months old, but with rare exceptions it affects individuals of other ages. The symptoms are characterized by constipation, generalized weakness, and various neurological disorders (9). Cases represent a spectrum of disease, ranging from subclinical infection to the most fulminant form of the disease, which is unexpected sudden death (3). Almost all cases of infant botulism have been caused by proteolytic *C. botulinum* type A and B strains. Since the first occurrence of infant botulism in Japan caused by *C. botulinum* type A in 1986 (29), there have been 24 cases; 16 were caused by type A strains, 3 were caused by type B strains, 1 was caused by a type C strain, and 1 was caused by a *C. butyricum* strain producing BoNT/E. The types of toxin in the other three cases were not described (16). We previously indicated that the original BoNT/B2 produced by strain 111, which was isolated from the first case of type B infant botulism in Japan in 1995, showed antigenic and biological properties different from those of the authentic BoNT/B (B1) produced by strain Okra (15, 20, 22). Two additional cases of type B infant botulism with typical symptoms occurred in Osaka Prefecture in 2005 and 2006. We eventually isolated two proteolytic *C. botulinum* type B strains, designated Osaka05 and Osaka06, respectively.

In the study described here, to better understand the background of type B infant botulism, we determined the genetic characteristics of proteolytic *C. botulinum* type B isolates by

* Corresponding author. Present address: Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-0048, Japan. Phone: 81-72-463-5690. Fax: 81-72-463-5691. E-mail: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp.

[∇] Published ahead of print on 1 July 2009.

TABLE 1. *C. botulinum* type B strains and sequences used in this study^a

Strain identifier	BoNT/B subtype ^b	GenBank accession no.	Origin (country, yr)	Reference or source
Bacterial strain				
111	B2	AB302854 , AB084152	Infant botulism (Japan, 1995)	15
Osaka05	Osaka05	AB302852	Infant botulism (Japan, 2005)	In this study
Osaka06	B2	AB302853	Infant botulism (Japan, 2006)	In this study
89E00061-2	B1	AB302861	Infant botulism (United States, 1989)	In this study
89E00067-4	B1	AB302862	Infant botulism (United States, 1989)	In this study
89E00123-1	B1	AB302963	Infant botulism (United States, 1989)	In this study
90E00001-3	B1	AB302864	Infant botulism (United States, 1990)	In this study
3129-2-77	B1	AB302865	Infant botulism (United States, 1990)	In this study
Okra	B1	AB232927	Food borne (unknown)	23
326	B1	AB302858	Pork meat (Japan)	In this study
407	B1	AB302856	Pork meat (Japan)	In this study
Ginger	B2	AB302857	Ginger (Japan)	In this study
7H215S	B2	AB302860	Honey (Japan)	In this study
9B	B1	AB302859	Stocked strain (United States)	In this study
67B	B1	AB302855	Stocked strain (United States)	In this study
GenBank				
CDC1758	B1	EF033127	Unknown	13
Danish	B1	M81186	Unknown	41
Hall6517(B)	B1	EF028399	Unknown	13
CDC1656	B1	EF028396	Unknown	13
Prevot25 NCASE	B2	EF033129	Unknown	13
213B	B2	EF028395	Unknown	13
Smith L-590	B2	EF028398	Unknown	13
Prevot59	B2	EF033128	Unknown	13
CDC1828	B2	EF051571	Unknown	13
CDC6291	B2	EF028401	Unknown	13
Korean soil 1	B2	DQ417353	Korean soil	GenBank
Korean soil 2	B2	DQ417354	Korean soil	GenBank
CDC795	B3	EF028400	Unknown	13
CDC593	Bivalent, A(B) ^c	AF300466	Dog feces (United States, 1976)	19
CDC1436	Bivalent, AB ^d	AF295926	Stool sample (United States, 1977)	19
657Ba	Bivalent, Ba ^d	EF033130	Unknown	13, 36
CDC588	Bivalent, Ab ^d	AF300465	Food borne (United States, 1976)	19
CDC3281	Bivalent, Bf ^d	Y13630	Infant botulism (United States, 1980)	33
ATCC 17844	Nonproteolytic	EF028394	Unknown	13
Eklund17B (B257)	Nonproteolytic	EF051570	Unknown	13
10068	Nonproteolytic	EF028402	Unknown	13
Eklund17B	Nonproteolytic	X71343	Unknown	14

^a The subtypes and GenBank accession numbers for strains determined in this study are indicated in boldface.

^b Subtyped by Hill et al. (13); the other strains were subtyped in this study.

^c BoNT/A producing and unexpressed *boNT/B* gene possessing.

^d Dual toxin-producing strains; the major toxin type is indicated in uppercase letters and the minor type is indicated in lowercase letters.

comparison of the nucleotide sequences of *boNT/B* and nontoxic component genes, the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotypes, the *boNT/B* gene location by PFGE and Southern blot hybridization, and the antigenicity of the new BoNT/B subtype. We developed multiplex PCR assays for the detection and identification of the BoNT/B subtypes.

MATERIALS AND METHODS

Type B infant botulism in Japan. (i) Case 1. The first case of type B infant botulism occurred in a female infant aged 6 months in Ishikawa Prefecture in 1995, and type B strain 111 was isolated from this case (18, 42). Strain 111 was provided by S. Nakamura (Kanazawa University School of Medicine, Ishikawa, Japan).

(ii) Case 2. In Osaka City in October 2005, a previously healthy breast-fed female infant aged 3 months with a 2-day history of fever, pituita, and poor feeding was hospitalized for 45 days and then discharged, and she recovered fully. BoNT/B and type B strain Osaka05 were detected in stool samples on the third hospital day (28).

(iii) Case 3. In Osaka Prefecture in May 2006, a previously healthy mainly breast-fed female infant aged 5 months with a 1-week history of constipation, poor feeding, and weakness was hospitalized for 32 days and then discharged,

and she recovered fully. BoNT/B and type B strain Osaka06 were detected in the stool on the fifth hospital day (1). Strain Osaka06 was provided by T. Asao (Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan).

C. botulinum was not detected in food, drink, or house dust samples obtained from the patients' homes for cases 2 and 3. In all cases, the patients had no history of honey consumption.

Bacterial strains and DNA extraction. Fifteen proteolytic *C. botulinum* type B strains, including 3 strains associated with infant botulism in Japan, were used in this study (Table 1). The biochemical characteristics, including the proteolytic activities, of all strains were tested by use of an API 20A kit (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). No strains with any unexpressed *boNT* genes were detected by PCR assay (40). Individual strains were cultured in 10 ml cooked meat medium (Difco, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) supplemented with 0.3% glucose and 0.2% soluble starch (Difco, Becton Dickinson and Co.) under anaerobic conditions at 30°C for 18 h. Bacterial DNA was extracted from 1 ml culture with a DNeasy tissue kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions. Finally, DNA was eluted with 100 µl elution buffer and stored at 4°C until use.

Nucleotide sequencing of *boNT/B* and nontoxic component genes. The *boNT/B* gene and nontoxic component genes (*ha70*, *ha17*, *ha33*, *p21*, and *nmh*) were amplified by using the overlapping primer pairs listed in Table 2, which were designed on the basis of the nucleotide sequences available from GenBank. PCR was performed with a 50-µl reaction mixture containing 10 ng extracted DNA,

TABLE 2. Primers used for amplification of *boNT/B* and nontoxic component genes

Gene(s) included in amplified fragment	Primer pair sequences (5'-3') ^a	Location (positions) ^{a,b}
<i>ha70</i> , <i>ha17</i> , and first half of <i>ha33</i>	CAAAATATGATTTCCTTGT/AGCAGCATACCAGTTTT	2725-2743/5578-5562
Latter half of <i>ha33</i> , <i>botR</i> , and first half of <i>ntnh</i>	CGCGTAGATTAGTAATTG/AAGTGCATTATTAATCTATCT	5406-5423/8166-8145
Latter half of <i>ntnh</i>	AGGAAATAATGCCATTG/CTTTATAATATCTCCCGT	8022-8038/10826-10808
<i>boNT/B</i> light chain	TTTATGGGCATTAATAAG/CATCTGAAAAACTATTTTTAT	10671-10687/12116-12096
<i>boNT/B</i> heavy chain	AGAGGTCAGAATAAAGCTA/CAAAATTTAGCTACATCCT	11948-11966/14682-14664

^a Sequences and positions are for forward primer/reverse primer.

^b Location of primer sequence of *boNT/B* and nontoxic component genes in the sequence reported under DDBJ accession no. AB232927.

0.5 μ M of each primer, 2.5 U LA *Taq* (TaKaRa Shuzo, Kyoto, Japan), 5 μ l LA *Taq* buffer, 2.5 mM MgCl₂, and 400 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP). Each PCR cycle consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 65°C for 3 min and was repeated 25 times. Final extension was carried out at 65°C for 5 min. The amplicons were directly sequenced by primer walking, and the sequence in each direction was confirmed with an ABI Prism BigDye cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

Nucleotide sequencing of the C-terminal region of BoNT/B. The nucleotide sequences of the C-terminal region (400 bp) of BoNT/B were determined by direct sequencing with the following primers: forward primer 5'-GAAAGTCA AATTCTCAATC-3' (positions in the coding region, bases 3445 to 3463) and reverse primer 5'-CAAAATTTAGCTACATCCT-3' (positions in the coding region, bases 3961 to 3943). PCR was performed with a 50- μ l reaction mixture containing 1 ng extracted DNA, 0.5 μ M of each primer, 2.5 U LA *Taq* (TaKaRa Shuzo), 5 μ l LA *Taq* buffer, 2.5 mM MgCl₂, and 200 μ M of each dNTP. Each PCR cycle consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 65°C for 2 min and was repeated 25 times. Final extension was carried out at 65°C for 5 min.

Phylogenetic analysis. The nucleotide sequences were aligned by use of the Clustal X program (version 1.83) with the parameters provided in Clustal W, version 1.6. A phylogenetic tree with 1,000 bootstrap replications was constructed by the neighbor-joining method, and genetic distances were calculated by the Kimura two-parameter method (8). The resulting tree was drawn with NJplot software.

PFGE analysis. PFGE plugs were prepared as described by Hielm et al. (12). DNA was left undigested or was digested with 20 U of SmaI (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) in 200 μ l of optimal buffer at 25°C for 18 h. The plugs were electrophoresed in a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) through a 1% pulse-field-certified agarose gel (Bio-Rad Laboratories) in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer at 14°C and 6 V/cm. The switching times were ramped from 0.5 to 40 s, and the bands were visualized by ethidium bromide staining. Dendrogram analysis of the band patterns was performed with Fingerprinting II software (Bio-Rad Laboratories). Similarity analysis was performed by using the Dice coefficient, and clustering was examined by the unweighted pair group method with arithmetic averages. Approximate fragment sizes (kbp) were measured by use of a molecular size marker.

Southern blot hybridization. After PFGE, the DNA fragments in the gel were transferred onto Hybond N⁺ nylon membranes (GE Healthcare) with a capillary transfer system and 20 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) for 18 h. The DNA was fixed to the membrane by UV irradiation. The *boNT/B* and 16S rRNA gene probes were prepared by using the primers reported by Szabo et al. (39) and Marshall et al. (25), and DNA extracted from strain Okra was labeled by use of a PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The membranes were incubated at 37°C for 2 h with hybridization solution (DIG-Easy Hyb; Roche Diagnostics), and hybridizations were performed at 42°C for 18 h with fresh DIG-Easy Hyb containing 20 ng/ml of each probe. The membranes were then washed three times for 15 min each time at room temperature with 1 \times SSC containing 0.1% sodium dodecyl sulfate and twice for 15 min each time with 0.1 \times SSC containing 0.1% sodium dodecyl sulfate at 60°C for the *boNT/B*-specific probe and at 65°C for the 16S rRNA-specific probe. Hybridization signals were detected with a DIG luminescent detection kit (Roche Diagnostics).

PCR assays for BoNT/B subtyping. PCR was performed with four primer mixtures, as follows: primer B-forward (5'-GATTTTTGGGGAAATCTTT-3'; positions in the coding region, bases 3256 to 3275), primer B1-reverse (5'-CCA

ATTACATCCCAATTTTAAA-3'; positions, bases 3840 to 3819), primer B2-reverse (5'-GTATAGTTTTGTAATAATTCATTAGAATCATA-3'; positions, bases 3625 to 3595), and primer Osaka05-reverse (5'-TCTTCCTTTTCTTAA AATTTTTAAG-3'; positions, bases 3572 to 3547). These primers were designed on the basis of the *boNT* sequences published by GenBank and determined in this study. PCR was performed with a 25- μ l reaction mixture containing 0.3 to 1 ng template DNA, 0.25 μ M of each primer, 1.25 U Ex *Taq* (TaKaRa Shuzo), 2.5 μ l Ex *Taq* buffer (TaKaRa Shuzo), and 200 μ M of each dNTP. Each PCR cycle consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min and was repeated 25 to 35 times. Final extension was carried out at 72°C for 5 min. The amplicons were visualized in 3% Nu-Sieve agarose gels (Camblex Bio Science, Rockland, ME) stained with ethidium bromide.

Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with rH_C. Recombinant BoNT/B H_C (rH_C) from strain Osaka05 (rH_C/Osaka05), rH_C/Okra, and rH_C/111 were expressed as described in our previous report (15), except that the primers used for the amplification of the DNA fragment encoding BoNT/Osaka05 H_C were as follows: forward primer 5'-CACGGATCCAAAAATAT AATAGCGAAATTTTAAA-3' and reverse primer 5'-ATTAAGCTTTTATTC AATCCATCCTTCATCTTT-3'. The rH_C that was expressed was purified with nickel-nitrilotriacetic acid agarose (Qiagen) and by CM-Sephadex C-25 (GE Healthcare) chromatography. Polyclonal antibody against each rH_C was prepared with rabbits. The first subcutaneous injection was performed with purified 50 μ g rH_C in Freund's complete adjuvant. After 2 weeks, the animals received three booster injections of the same amount of rH_C in Freund's incomplete adjuvant at 2-week intervals. The animals were bled 2 weeks after the last booster injection. The immunoglobulin G fraction was purified by ammonium sulfate precipitation and was subsequently purified on an rH_C-coupled HiTrap N-hydroxysuccinimide-activated high-performance column (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Biotinylated antibodies were prepared with EZ-Link sulfosuccinimidyl-6-[biotinamido]hexanoate (Pierce, Rockford, IL).

For the sandwich ELISA, 96-well microtiter plates (Iwaki, Japan) were coated with 0.1 ml polyclonal antibody against rH_C (3 μ g/ml) at 37°C for 2 h. After the plates were blocked at 4°C for 18 h with 1.0% Blockace blocking reagent (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Japan), rH_C was applied at dilutions ranging from 10 ng/ml to 5,000 ng/ml in duplicate and the plates were incubated at 37°C for 1 h. The plates were washed and incubated with 1 μ g/ml biotinylated antibody against rH_C at 37°C for 1 h, followed by washing and incubation with 0.2 μ g/ml streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Pierce) at 37°C for 1 h. The plates were developed with 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid) (Roche) at 37°C for 1 h. The color was monitored by measuring the absorbance at 415 nm on a Labsystem Multiscan mass spectrometer (Labsystems, Finland).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences determined in this work were submitted to the DDBJ database and may be found under accession numbers AB302852 to AB302865 (Table 1).

RESULTS

Comparison of *boNT/B* and nontoxic component gene sequences among strains Osaka05, Okra (subtype B1), and 111 (subtype B2). The nucleotide sequences of the *boNT/B* gene (3,876 bp) from two isolates associated with infant botulism in Japan (strains Osaka05 and Osaka06) and nontoxic component genes (*ha70*, 1,881 bp; *ha17*, 441 bp; *ha33*, 879 bp; *botR*, 537 bp; *ntnh*, 3,594 bp) from strains Osaka05 and 111 were deter-

TABLE 3. Identities among strains Osaka05, Okra (subtype B1), and 111 (subtype B2) in the *boNT/B* and nontoxic components^a

Strains compared	% Nucleotide/% amino acid identity					
	HA70 (1,881/626) ^a	HA17 (441/146)	HA33 (885[879]/294[292] ^b)	BotR (537/178)	NTNH (3,594/1,197)	BoNT/B (3,876/1,291)
Osaka05 and Okra (B1)	99.6/99.0	99.3/97.9	95.2/90.1	98.5/97.2	97.9/96.7	97.9/96.2
Osaka05 and 111 (B2)	99.1/98.4	98.6/100.0	92.3/83.6	99.4/98.9	99.6/99.3	99.0/98.5
Okra and 111	98.9/98.1	98.0/97.9	93.1/84.9	98.3/96.6	97.8/96.4	97.6/95.7

^a Data in parentheses are number of nucleotide base pairs/number of amino acid residues.

^b Data in brackets are for strains Osaka05 and 111.

mined. The *boNT/B* gene nucleotide sequences of strains Osaka05 and Osaka06 shared 98.8% identity. These sequences were further compared with 24 full-length *boNT/B* gene sequences available in the GenBank database (Table 1). The *boNT/B* gene sequence of strain Osaka06 was identical to that of strain CDC6291, which was classified as subtype B2. Strain Osaka05 was shown to possess a unique sequence in comparison with the sequences of the other *boNT/B* genes.

The nucleotide and amino acid identities of *boNT/B* and nontoxic components among strains Osaka05, Okra (subtype B1), and 111 (subtype B2) are summarized in Table 3. At the nucleotide and amino acid levels in *boNT/B*, Osaka05 had identities of 97.9% and 96.2%, respectively, with Okra and 99.0% and 98.5%, respectively, with 111, while Okra and 111 possessed identities of 97.6% and 95.7% at the nucleotide and amino acid levels in *boNT/B*, respectively. The organization of nontoxic component genes (composed of *ha70*, *ha17*, *ha33*, *botR*, and *ntnh*) and the *boNT/B* gene was shown to be common among the three strains. For all nontoxic components except *ha33*, Osaka05 showed 97.9% to 99.6% nucleotide sequence identities and 96.7% to 99.0% amino acid sequence identities with Okra and 98.6% to 99.6% nucleotide sequence identities and 98.4% to 100.0% amino acid sequence identities with 111, while Okra had 97.8% to 98.9% nucleotide sequence identities and 96.4% to 98.1% amino acid sequence identities with 111. For *ha33*, the three strains shared 92.3% to 95.2% nucleotide sequence identi-

ties and 83.6% to 90.1% amino acid sequence identities, which were remarkably lower than the levels of identity for the other nontoxic component genes.

The amino acid substitutions in BoNT/B among strains Okra, 111, and Osaka05 involved 61 residues (2 residues in the light chain, which was 441 amino acids [aa], and 59 residues in the heavy chain [which was 850 aa]), and the substitutions spread throughout the domains or the subdomains within the heavy chain were as follows: 22 in H_N (420 aa), 37 in H_C (430 aa), 12 in H_{CN} (167 aa), and 25 in H_{CC} (263 aa). These substitutions were mostly concentrated in the heavy chain, especially in the H_{CC} subdomain. Osaka05 showed identities of 99.5% (light chain), 94.5% (heavy chain), 95.2% (H_N), 92.8% (H_{CN}), and 94.7% (H_{CC}) with Okra at the amino acid level and identities of 100.0% (light chain), 97.6% (heavy chain), 98.6% (H_N), 100.0% (H_{CN}), and 94.3% (H_{CC}) with 111 at the amino acid level. Okra had identities of 99.5% (light chain), 93.6% (heavy chain), 95.5% (H_N), 92.8% (H_{CN}), and 91.3% (H_{CC}) with 111 at the amino acid level (Fig. 1).

Phylogenetic analysis of full-length *boNT/B* gene. The phylogenetic tree was constructed on the basis of alignment of the full length of the nucleotide sequences of the *boNT/B* genes from strains Osaka05 and Osaka06 with 24 *boNT/B* sequences, including the sequences of the five BoNT/B subtypes, published in GenBank (Fig. 2A). Overall, among the 26 strains producing BoNT/B, 25 (the exception was Osaka05) were classified into five clusters, which was the same classification as the BoNT/B sub-

Light chain (positions 1-441)

Strain/Position	404	441
B1 (Okra)	D	K
B2 (111)	N	R
Osaka05	N	R

H_N domain (positions 442-861)

Strain/Position	476	485	486	487	489	496	530	599	609	614	690	694	737	768	777	829	831	836	842	846	852	854
B1 (Okra)	N	D	F	P	N	D	I	N	N	I	N	S	R	I	G	N	Y	M	I	D	M	N
B2 (111)	D	R	S	S	D	N	—	D	S	—	D	I	K	V	E	D	H	I	M	N	I	—
Osaka05	D	R	S	S	D	N	F	D	—	L	D	R	K	—	E	D	H	I	M	N	I	K

H_{CN} subdomain (positions 862-1028)

Strain/Position	871	884	905	922	956	976	990	997	1011	1012	1026	
B1 (Okra)	K	K	A	K	V	M	I	N	E	L	N	T
B2 (111)	R	N	T	E	M	I	T	S	D	S	D	I
Osaka05	R	N	T	E	M	I	T	S	D	S	D	I

H_{CC} subdomain (positions 1029-1291)

Strain/Position	1032	1072	1074	1117	1132	1138	1174	1176	1182	1183	1185	1188	1189	1191	1197	1199	1202	1206	1250	1251	1252	1255	1274	1275	1290
B1 (Okra)	R	E	R	P	K	D	L	Q	T	Y	Y	K	E	E	P	S	D	N	F	E	E	D	L	K	T
B2 (111)	G	K	I	S	N	N	S	R	A	—	D	E	—	K	N	Y	N	K	L	K	D	N	P	N	I
Osaka05	G	K	I	—	N	N	—	—	A	L	N	—	K	—	—	—	—	—	K	D	Y	P	N	I	

FIG. 1. Summary of BoNT/B amino acid substitutions between strains Osaka05, Okra (subtype B1), and 111 (subtype B2) in each domain (light chain and H_N) or subdomain (H_{CN} and H_{CC} in H_C). Hyphens indicate residues identical to those in strain Okra.

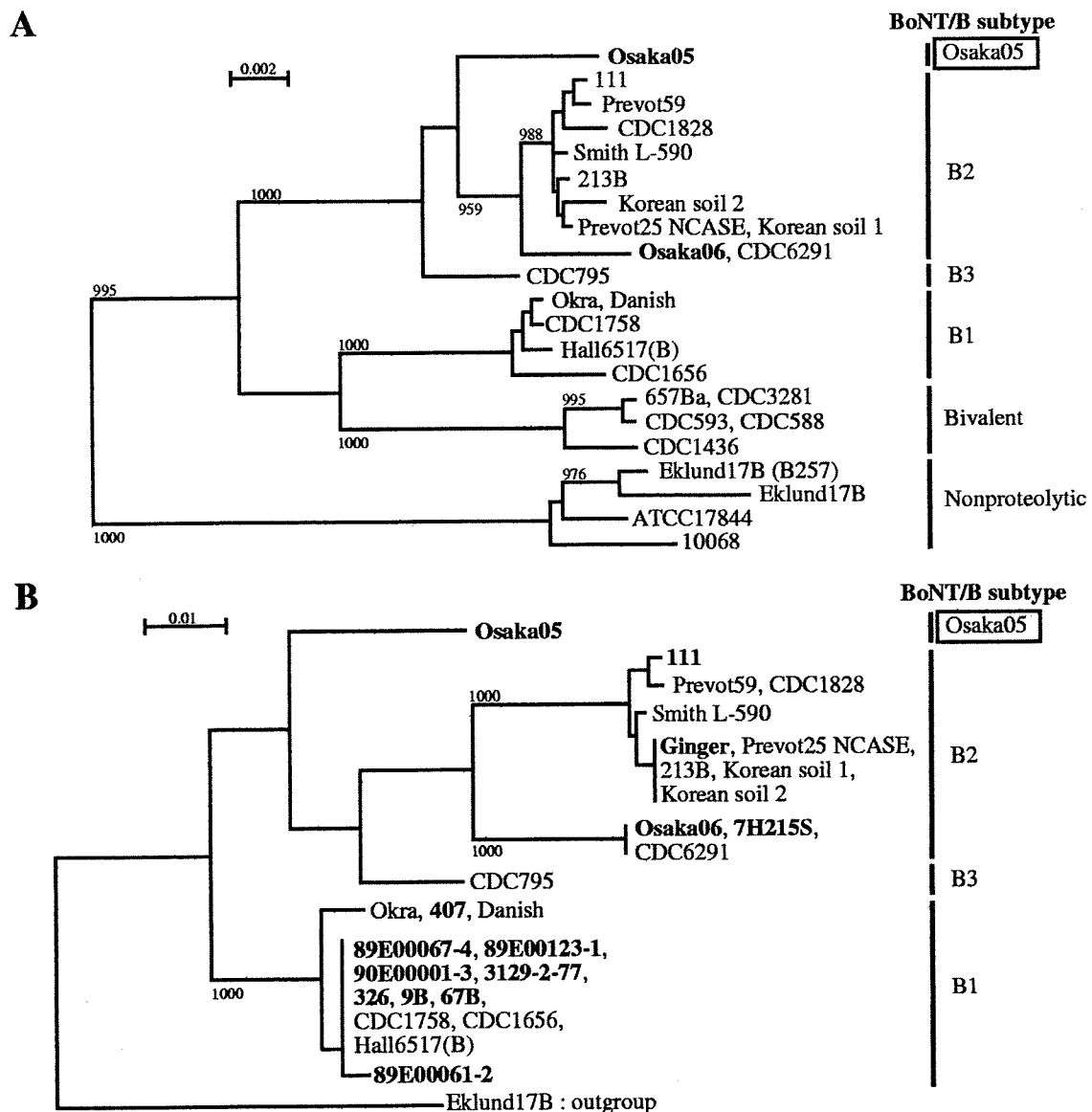


FIG. 2. Phylogenetic trees based on *boNT/B* gene sequences. The full-length *boNT/B* gene nucleotide sequences (3,876 bp) (A) and the nucleotide sequences at the C-terminal region (400 bp) of *BoNT/B* (B) were constructed by use of the reference sequences listed in Table 1. The sequences determined in this study are indicated in boldface. The outgroup was the neurotoxin sequence of *C. tetani* CN3911 (GenBank accession no. X06214) and was removed from the final figure (A), and nonproteolytic *C. botulinum* Eklund17B type B was the outgroup for the *BoNT/B* sequences (B). The five *BoNT/B* subtypes (subtypes B1, B2, B3, bivalent, and nonproteolytic) were described by Hill et al. (13). The *BoNT/B* subtype newly identified in this study is boxed. Numbers on each branch indicate bootstrap values (>950) for the cluster supported by that branch.

types. Strain Osaka06 was classified into the subtype B2 cluster and showed 99.3% to 100% identity with the subtype B2 strains. The new isolate, strain Osaka05, was different from the strains in the other five clusters and shared 98.8% to 99.1% nucleotide sequence identity with the subtype B2 strains, 98.9% identity with the subtype B3 strains, identities of 97.7% to 98.0% with the subtype B1 strains, identities of 97.4% with the bivalent strains, and identities of 95.7% to 96.2% with the nonproteolytic strains.

Phylogenetic analysis of the C-terminal region of *BoNT/B*. The phylogenetic tree was also constructed on the basis of the alignment of the nucleotide sequences at the C-terminal region (400 bp) of *BoNT/B*, which partially encoded the H_{CC} subdo-

main (Fig. 2B). Overall, except for Osaka05, 28 proteolytic type B strains (the 15 bacterial strains and the 13 reference strains; Table 1) were classified into three subtypes (subtypes B1, B2, and B3), which was the same as the classification for the full-length *boNT/B* genes (Fig. 2A). Subtype B1 included five isolates associated with U.S. infant botulism, two isolates from pork meat, two stocked strains, and five reference strains. Subtype B2 included two isolates associated with Japanese infant botulism, isolates from ginger and honey, and eight reference strains. Strains CDC795 (B3 subtype) and Osaka05 were also different from the strains in the other clusters and were not classified in the same cluster.

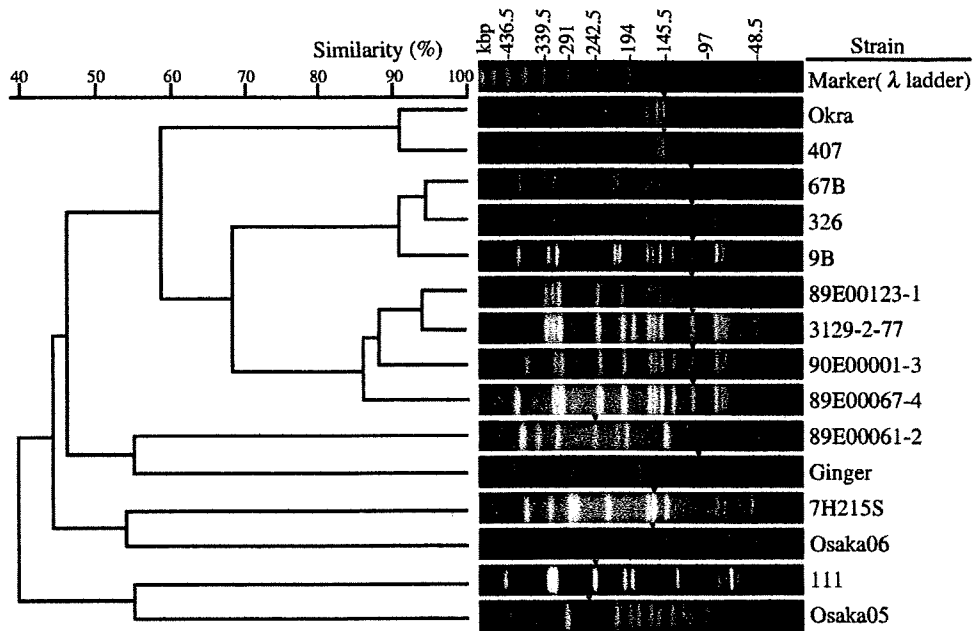


FIG. 3. PFGE genotyping. The dendrogram and PFGE patterns of SmaI-digested DNA from 15 *C. botulinum* type B strains are shown. Arrowheads indicate the DNA fragment containing the *boNT/B* gene detected by Southern blot hybridization.

PFGE and Southern blot hybridization. The PFGE patterns of SmaI-digested DNA from 15 *C. botulinum* type B strains and a dendrogram based on the similarities between normalized PFGE patterns are presented in Fig. 3. All strains were distinguishable, and their similarities ranged from 25.8% to 94.1%. The BoNT/B subtypes were clearly different on PFGE analysis. Strain Osaka05 exhibited a pattern entirely different from the patterns of the other 14 strains, having similarities of 28.6% to 45.7% with subtype B1 strains and similarities of 25.8% to 54.6% with subtype B2 strains. The similarities between subtype B1 and subtype B2 strains ranged from 29.4% to 60.0%. Homologous subtypes of subtype B1 strains showed similarities of 41.2% to 94.1%. Nine of the 10 subtype B1 strains (the exception was strain 89E00061-2) were separated into three clusters (Okra and 407; 326, 9B, and 67B; and 89E00067-4, 89E00123-1, 90E00001-3, and 3129-2-77) with more than 80% similarity. The four subtype B2 strains (strains 111, Osaka06, Ginger, and 7H215S) showed more diversity and had 35.7% to 53.9% similarities.

Fragments containing *boNT/B* genes were detected by Southern blot hybridization and are indicated by arrowheads in the gel in Fig. 3. An approximately 100-kbp fragment was detected in strain Ginger; a 110-kbp fragment was detected in strains 89E0067-4, 89E123-1, 90E00001-3, 3129-2-77, 326, 9B, and 67B; a 150-kbp fragment was detected in strains Okra and 407; a 170-kbp fragment was detected in strain 7H215S; a 175-kbp fragment was detected in strain Osaka06; a 260-kbp fragment was detected in strain 89E00061-2; a 275-kbp fragment was detected in strain 111; and a 280-kbp fragment was detected in strain Osaka05.

DNA fragments smaller than the chromosomal DNA (>970 kbp) were detected from strains 111, Osaka05, 89E00061-2, Okra, and 407 by PFGE of undigested DNA (Fig. 4A). The location of the *boNT/B* gene was confirmed by subsequent

Southern blot hybridization with a *boNT/B* probe. The *boNT/B* genes of strains Okra and 407 were on the approximately 150-kbp fragment, the *boNT/B* gene of strain 89E00061-2 was located on the 260-kbp fragment, the *boNT/B* gene of strain 111 was located on the 275-kbp fragment, and the *boNT/B* gene of strain Osaka05 was located on the 280-kbp fragment (Fig. 4B), while the 16S rRNA genes were located on the chromosomal DNA (Fig. 4C). For the remaining 10 strains, the chromosomal DNA fragment was detected only by PFGE of

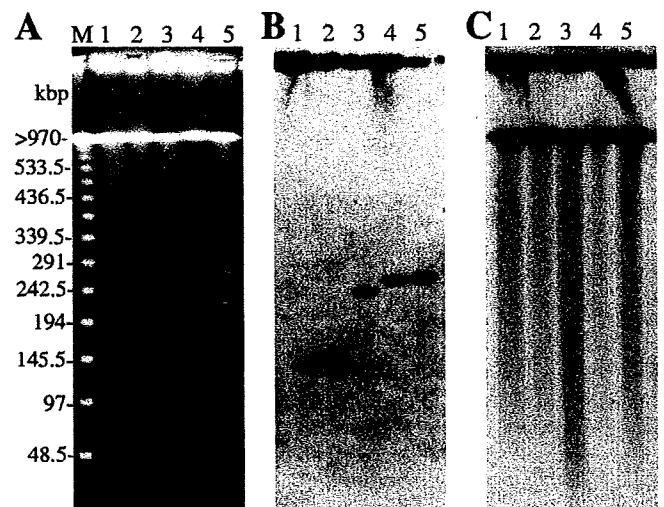


FIG. 4. PFGE of undigested DNA and Southern blot hybridization. The PFGE patterns of undigested DNA (A) and Southern blot hybridization detection of the *boNT/B* genes (B) and the 16S rRNA genes (C) of strains Okra (lane 1), 407 (lane 2), 89E00061-2 (lane 3), 111 (lane 4), and Osaka05 (lane 5) are shown. Lanes M, bacteriophage λ ladder.

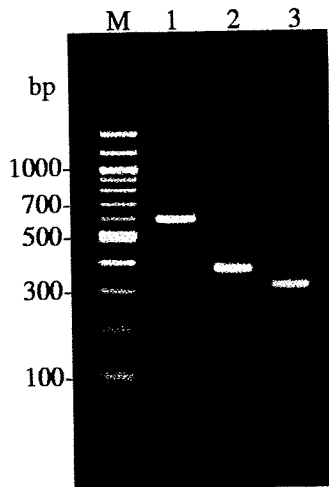


FIG. 5. Multiplex PCR assay for BoNT/B subtyping. The results of the multiplex PCR assay with strains Okra (lane 1), 111 (lane 2), and Osaka05 (lane 3) were visualized. Lanes M, 100-bp ladder.

undigested DNA, and both the *boNT/B* and the 16S rRNA genes were located on the chromosomal DNA.

PCR assays for identification of BoNT/B subtypes. A multiplex PCR assay for the detection of the *boNT/B1*, *boNT/B2*, and *boNT/Osaka05* genes was developed. The results of the PCR assay with strains Okra (subtype B1), 111 (subtype B2), and Osaka05 are shown in Fig. 5.

The *boNT/B1* amplicon (585 bp) from strain Okra was detected in lane 1, the *boNT/B2* amplicon (370 bp) from strain 111 was detected in lane 2, and the *boNT/Osaka05* amplicon (317 bp) from strain Osaka05 was detected in lane 3. When the other bacterial strains listed in Table 1 were assayed, the *boNT/B1* amplicon was detected in nine strains (strains 89E00061-2, 89E00067-4, 89E00123-1, 90E00001-3, 3129-2-77, 326, 407, 9B, and 67B), and the *boNT/B2* amplicon was detected in three strains (strains Osaka06, Ginger, and 7H215S). The detection limit of the multiplex PCR assay was from 9.5×10 to 2.5×10^2 cells/ml of culture dilution (data not shown). No amplicons were detected from the 11 control strains, as follows: 2 type A strains (strains 62A and Kyoto-F), 1 type C strain (strain CB-19), 1 type D strain (strain 1873), 1 type E strain (strain Iwanai), 1 type F strain (strain Langeland), 1

BoNT/E-producing *C. butylicum* strain (strain 5262), 1 *C. sporogenes* strain (strain ATCC 19404), 1 *C. bifementas* strain (strain ATCC 638), 1 *C. perfringens* strain (strain ATCC 13124), and 1 *C. difficile* strain (strain ATCC 43593) (data not shown).

Comparison of antigenicities of BoNT/B H_C among strains Osaka05, Okra, and 111. In order to characterize BoNT/Osaka05 antigenically, the levels of binding of rH_C/Osaka05, rH_C/Okra, and rH_C/111 to their specific antibodies were measured by a sandwich ELISA (Fig. 6). When the levels of binding of rH_C to the antibody against rH_C/Osaka05 were assayed, rH_C/111 and rH_C/Okra showed low binding affinities, and the binding affinity of rH_C/Okra was lower than that of rH_C/111 (Fig. 6A). rH_C/Osaka05 and rH_C/111 did not react to the antibody against rH_C/Okra (Fig. 6B). rH_C/Osaka05 and rH_C/Okra exhibited a low binding affinity to the antibody against rH_C/111, and the binding affinity of rH_C/Okra was lower than that of rH_C/Osaka05 (Fig. 6C).

DISCUSSION

Two cases of infant botulism occurred in Osaka, Japan, in 2005 and 2006, and type B strains (strains Osaka05 and Osaka06) were successfully isolated from both cases. The full-length *boNT/B* gene sequences of the two isolates were determined and compared with the sequences of the *boNT/B* genes in the GenBank database. Strain Osaka05 possessed a unique *boNT/B* gene. The BoNT subtypes within a serotype were defined as differing by at least 2.6% at the amino acid level (37). Currently, it is usual to determine BoNT subtypes by phylogenetic analysis of full-length *boNT* gene sequences (6, 13). Phylogenetic analysis of the *boNT/B* genes indicated that strain Osaka05 should be classified into a group other than the five BoNT/B subtypes (13), and strain Osaka05 was shown to be a new BoNT/B subtype. On the other hand, the *boNT/B* gene sequence of strain Osaka06 was identical to that of strain CDC6291 and was classified in the B2 subtype (Fig. 2A).

The amino acid substitutions in the BoNT/B subtypes were concentrated in the heavy chain, especially in H_{CC}, the same as in Fig. 1. The sequences in the C-terminal region of BoNT/B, which encoded H_{CC}, were available for BoNT/B subtyping by phylogenetic analysis, as was the sequence of the full-length of *boNT/B* genes (Fig. 2B). We also established a multiplex PCR

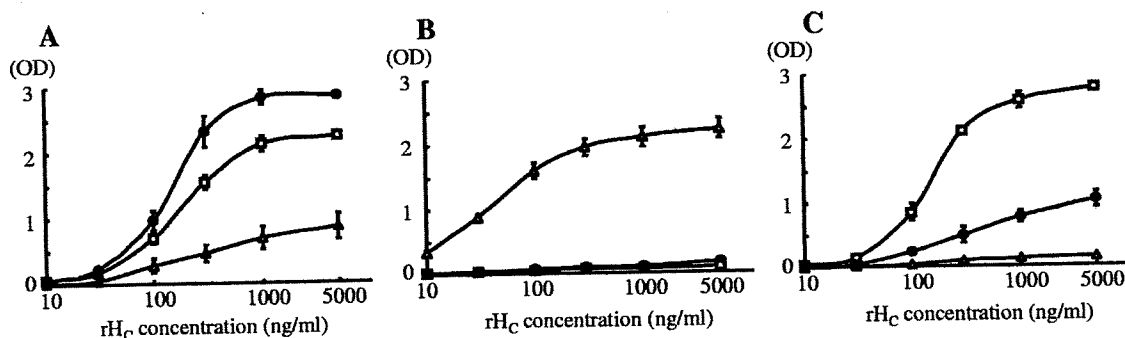


FIG. 6. Sandwich ELISA for determination of the binding affinity of rH_C to specific antibodies. The results are expressed as the means of the optical density (OD) at 415 nm after subtraction of the optical density for the background control in three experiments. Error bars indicate standard errors. Antibodies against rH_C/Osaka05 (A), rH_C/Okra (B), and rH_C/111 (C) were used as capture antibodies; and rH_C/Osaka05 (closed circles), rH_C/Okra (open triangles), and rH_C/111 (open squares) were applied as antigens at various concentrations.

assay to detect BoNT/B subtypes B1, B2, and Osaka05 (Fig. 5). The PCR results were well correlated with the subtypes identified by phylogenetic analysis of *boNT/B* genes.

Genotyping by PFGE with SmaI-digested DNA revealed genetic diversity among subtypes B1, B2, and Osaka05 (Fig. 3). The diversity within subtype B2 strains was greater than that within B1 strains. The seven isolates from Japan (associated with infant botulism and food samples) were clearly distinct from each other, in contrast to the isolates associated with infant botulism in the United States, which showed high degrees of similarity.

The location of the *boNT* gene and its associated nontoxic component gene cluster varied among serotypes and strains; the *boNT/A*, *boNT/B*, *boNT/E*, and *boNT/F* genes were considered to be located on the chromosome, while the *boNT/C* and *boNT/D* genes were carried on bacteriophages, and the *boNT/G* gene was located on plasmids (4, 30, 41, 43). Recently, sequencing of the complete genome of strain Okra revealed that its *boNT/B* gene was present within the 149-kbp plasmid (36). The *boNT* genes of strain Loch Maree (subtype A3) and strain 657Ba (type B and subtype A4) were also found to be located on the approximately 270-kbp plasmid (25, 36). In this study, we found that the *boNT/B* genes were located on extra-chromosomal DNA, assumed to be plasmids, in five strains belonging to distinct BoNT/B subtypes (Fig. 4). The plasmids were approximately 150 kbp, 260 kbp, 275 kbp, and 280 kbp. These findings indicate that the *boNT/B* gene location is not correlated with the BoNT/B subtype. Detailed characterization of the *boNT/B* gene-encoding plasmids is required to understand the mechanisms of *boNT/B* expression and evaluation of the *boNT/B* gene within *C. botulinum*.

The nontoxic component genes encode the proteins that protect the neurotoxin from the acids and proteases in the stomach and assist with transportation of the neurotoxin from the intestine to the bloodstream (30). This study and previous reports (23, 30, 36) indicated that the hemagglutinin genes (*ha70*, *ha33*, and *ha17*), the regulator gene (*botR*), and the nontoxic-nonhemagglutinin gene (*ntnh*) exist upstream of the *boNT/B* gene. The amino acid identities of HA33 were significantly lower than those of the other nontoxic components and BoNT/B (Table 3). It was suggested that HA33 acts as an adhesin, allowing the complex of the neurotoxin and nontoxic components to bind to intestinal epithelial cells and erythrocytes (11, 26); however, the influence of amino acid substitutions in HA33 on symptoms of infant botulism is unknown.

The variation in the BoNT amino acid sequence within serotypes is capable of causing significant differences in the immunological and biological properties of the neurotoxin. We previously indicated immunological differences between BoNT/B1 and BoNT/B2 (15, 22). Briefly, most monoclonal antibodies against the H_C of BoNT/Okra did not react with BoNT/111, while monoclonal antibodies against the light chain and the H_N of BoNT/Okra could react with BoNT/111 by immunoblotting and ELISA. In this study, the antigenicity of BoNT/Osaka05 was suggested to be different from the antigenicities of BoNT/Okra and BoNT/111 by sandwich ELISA with rH_C and their specific antibodies (Fig. 6). Strain Osaka05 was confirmed to be a new BoNT/B subtype by its antigenic specificity, in addition to by subtype classification by phylogenetic analysis of the *boNT/B* gene. The antigenic difference between

BoNT/Osaka05 and BoNT/Okra was greater than that between BoNT/Osaka05 and BoNT/111, depending upon the difference in BoNT amino acid similarities. We also previously demonstrated that two different subtypes in BoNT/A (subtypes A1 and A2), which differ by 10% at the amino acid level, had different antigenicities by ELISA with monoclonal antibodies against BoNT/A (21). Similar findings were presented by Smith et al. (37). This information will be important for the development of an immunological BoNT assay, therapy for botulism, and recombinant vaccines for BoNT (34, 35).

In H_{CC}, the level of amino acid replacement between BoNT/Osaka05 and BoNT/Okra was 15 residues, that between BoNT/Osaka05 and BoNT/111 was 14 residues, and that between BoNT/Okra and BoNT/111 was 23 residues. Our previous studies revealed that the toxicity of BoNT/111 was lower than that of BoNT/Okra because of the replacement of 2 residues in H_{CC} which contribute to binding to the receptors (ganglioside GT1b and the synaptotagmin2-GT1b complex) (15, 20, 22). The other 8 residues essential for receptor binding in H_{CC} were also confirmed: 4 residues for binding to ganglioside GT1b and 4 residues for binding to the synaptotagmin2-GT1b complex (20, 32, 38). In BoNT/Osaka05 and BoNT/Okra, those 10 residues were identical. The antigenicity and genetic characteristics of BoNT/Osaka05 were related to those of BoNT/111 rather than to those of BoNT/Okra, but the residues contributing to receptor binding in BoNT/Osaka05 were identical to those in BoNT/Okra. Further investigation into the biological character of BoNT/Osaka05 would give new insight into the receptor binding system of BoNT/B.

In this study, we developed new methods for the subtyping of BoNT/B: phylogenetic analysis of partial *boNT/B* gene sequences and a multiplex PCR assay. The former was also suitable for the identification of a new BoNT/B subtype, and the latter represents the first report of a PCR-based method for the identification of BoNT/B subtypes. The correlation between the BoNT/B subtype and the source of isolation was reported by Hill et al. (13); B1 strains likely originated in the United States and are associated with food-borne disease due to improperly processed vegetables, while B2 strains exist mostly in Europe and are associated with animal cases or meat. The distribution of BoNT/B subtypes in Japan was found to be distinct from the distributions in both the United States and Europe; isolates associated with infant botulism were classified into subtype B2 and the newly identified Osaka05 subtype, and food samples were divided into subtypes B1 and B2. Therefore, further molecular genotyping of type B *C. botulinum* isolates by our BoNT/B subtyping methods will contribute to understanding of the epidemiology of *C. botulinum* and the infectious diseases that it causes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Asao and S. Nakamura for the gifts of the *C. botulinum* strains.

This work was partially supported by a grant for research on food safety from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

REFERENCES

1. Abe, S., M. Nishino, O. Miyake, N. Hashimoto, T. Nakagawa, E. Satake, T. Asao, Y. Kumada, T. Kawai, and M. Takahashi. 2006. An infant botulism case in which detected were *Clostridium botulinum* type B and its toxin, May 2006—Osaka. *Infect. Agents Surveill. Rep.* 27:275–276. (In Japanese.)

2. Arndt, J. W., M. J. Jacobson, E. E. Abola, C. M. Forsyth, W. H. Tepp, J. D. Marks, E. A. Johnson, and R. C. Stevens. 2006. A structural perspective of the sequence variability within botulinum neurotoxin subtypes A1-A4. *J. Mol. Biol.* **362**:733-742.
3. Arnon, S. S., K. Damus, and J. Chin. 1981. Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidemiol. Rev.* **3**:45-66.
4. Binz, T., H. Kurazono, M. Wille, J. Frevert, K. Wernars, and H. Niemann. 1990. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **265**:9153-9158.
5. Cal, S., B. R. Singh, and S. Sharma. 2007. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit. Rev. Microbiol.* **33**:109-125.
6. Chen, Y., H. Korkeala, J. Aarankunnas, and M. Lindstrom. 2007. Sequencing the botulinum neurotoxin gene and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals *orf3* and a novel type E neurotoxin subtype. *J. Bacteriol.* **189**:8643-8650.
7. Cox, N., and R. Hinkle. 2002. Infant botulism. *Am. Fam. Physician* **65**:1388-1392.
8. Efron, B., E. Halloran, and S. Holmes. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:13429-13434.
9. Fox, C. K., C. A. Keet, and J. B. Strober. 2005. Recent advances in infant botulism. *Pediatr. Neurol.* **32**:149-154.
10. Franciosa, G., F. Floridi, A. Maugliani, and P. Aureli. 2004. Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7192-7199.
11. Fujinaga, Y., K. Inoue, S. Watarai, Y. Sakaguchi, H. Arimitsu, J. C. Lee, Y. Jin, T. Matsumura, Y. Kabumoto, T. Watanabe, T. Ohyama, A. Nishikawa, and K. Oguma. 2004. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology* **150**:1529-1538.
12. Hielm, S., J. Bjorkroth, E. Hyytia, and H. Korkeala. 1998. Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:703-708.
13. Hill, K. K., T. J. Smith, C. H. Helma, L. O. Ticknor, B. T. Foley, R. T. Svensson, J. L. Brown, E. A. Johnson, L. A. Smith, R. T. Okinaka, P. J. Jackson, and J. D. Marks. 2006. Genetic diversity among botulinum neurotoxin producing clostridial strains. *J. Bacteriol.* **189**:818-832.
14. Hutson, R. A., M. D. Collins, A. K. East, and D. E. Thompson. 1994. Nucleotide sequence of the gene coding for non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B neurotoxin: comparison with other clostridial neurotoxins. *Curr. Microbiol.* **28**:101-110.
15. Ihara, H., T. Kohda, F. Morimoto, K. Tsukamoto, T. Karasawa, S. Nakamura, M. Mukamoto, and S. Kozaki. 2003. Sequence of the gene for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1625**:19-26.
16. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases. 2008. Botulism in Japan as of January 2008. *Infect. Agents Surveill. Rep.* **29**:35-36. (In Japanese.)
17. Johnson, E. A., and M. Bradshaw. 2001. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon* **39**:1703-1722.
18. Kakinuma, H., H. Maruyama, H. Takahashi, K. Yamakawa, and S. Nakamura. 1996. The first case of type B infant botulism in Japan. *Acta Paediatr. Jpn.* **38**:541-543.
19. Kirma, N., J. L. Ferreira, and B. R. Baumstark. 2004. Characterization of six type A strains of *Clostridium botulinum* that contain type B toxin gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:159-164.
20. Kohda, T., H. Ihara, Y. Seto, H. Tsutsuki, M. Mukamoto, and S. Kozaki. 2007. Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. *Microb. Pathog.* **42**:72-79.
21. Kozaki, S., S. Nakae, and Y. Kamata. 1995. Immunological characterization of the neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type A associated with infant botulism in Japan. *Microbiol. Immunol.* **39**:767-774.
22. Kozaki, S., Y. Kamata, T. Nishiki, H. Kakinuma, H. Maruyama, H. Takahashi, T. Karasawa, K. Yamakawa, and S. Nakamura. 1998. Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect. Immun.* **66**:4811-4816.
23. Lee, J. C., K. Yokota, H. Arimitsu, H. J. Hwang, Y. Sakaguchi, J. Cui, K. Takeshi, T. Watanabe, T. Ohyama, and K. Oguma. 2005. Production of anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of *Clostridium botulinum* type B 16S toxin-haemagglutinin. *Microbiology* **151**:3739-3747.
24. Lindstrom, M., and H. Korkeala. 2006. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:298-314.
25. Marshall, K. M., M. Bradshaw, S. Pellett, and E. A. Johnson. 2007. Plasmid encoded neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* serotype A subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**:49-54.
26. Matsumura, T., Y. Jin, Y. Kabumoto, Y. Takegahara, K. Oguma, W. I. Lencer, and Y. Fujinaga. 2008. The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell. Microbiol.* **10**:355-364.
27. Midura, T. F., and S. S. Arnon. 1976. Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces. *Lancet* **ii**:934-936.
28. Nishida, H., M. Shiota, K. Nakagawa, T. Minamigata, M. Takuwa, T. Morishima, H. Kumakura, T. Yoshioka, A. Uematsu, N. Haneda, D. Hata, K. Umeda, J. Ogasawara, and M. Takahashi. 2007. An infant botulism case due to *Clostridium botulinum* type B toxin, October 2005—Osaka City. *Infect. Agents Surveill. Rep.* **28**:168-169. (In Japanese.)
29. Noda, H., K. Sugita, A. Koike, T. Nasu, M. Takahashi, T. Shimizu, K. Ooi, and G. Sakaguchi. 1988. Infant botulism in Asia. *Am. J. Dis. Child.* **142**:125-126.
30. Oguma, K., Y. Fujinaga, and K. Inoue. 1995. Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. *Microbiol. Immunol.* **39**:161-168.
31. Pickett, J., B. Berg, E. Chaplin, and M. A. Brunstetter-Shafer. 1976. Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. *N. Engl. J. Med.* **295**:770-772.
32. Rummel, A., S. Mahrhold, H. Bigalke, and T. Binz. 2004. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* **51**:631-643.
33. Santos-Buelga, J. A., M. D. Collins, and A. K. East. 1998. Characterization of the genes encoding the botulinum neurotoxin complex in a strain of *Clostridium botulinum* producing type B and F neurotoxins. *Curr. Microbiol.* **37**:312-318.
34. Shone, C., J. Ferreira, A. Boyer, N. Cirino, C. Egan, E. Evans, J. Kools, and S. Sharma. 2006. The 5th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Neurotoxins. Workshop review: assays and detection. *Neurotox. Res.* **9**:205-216.
35. Smith, L. A. 1998. Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. *Toxicon* **36**:1539-1548.
36. Smith, T. J., K. K. Hill, B. T. Foley, J. C. Detter, A. C. Munk, D. C. Bruce, N. A. Doggett, L. A. Smith, J. D. Marks, G. Xie, and T. S. Brettn. 2007. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. *PLoS One* **2**:e1271.
37. Smith, T. J., J. Lou, I. N. Geren, C. M. Forsyth, R. Tsai, S. L. Laporte, W. H. Tepp, M. Bradshaw, E. A. Johnson, L. A. Smith, and J. D. Marks. 2005. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect. Immun.* **73**:5450-5457.
38. Swaminathan, S., and S. Eswaramoorthy. 2000. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**:693-699.
39. Szabo, E. A., J. M. Pemberton, and P. M. Desmarchelier. 1993. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3011-3020.
40. Takeshi, K., Y. Fujinaga, K. Inoue, H. Nakajima, K. Oguma, T. Ueno, H. Sunagawa, and T. Ohyama. 1996. Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* **40**:5-11.
41. Whelan, S. M., M. J. Elmore, N. J. Bodsworth, J. K. Brehm, T. Atkinson, and N. P. Minton. 1992. Molecular cloning of the *Clostridium botulinum* structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2345-2354.
42. Yamakawa, K., T. Karasawa, H. Kakinuma, H. Maruyama, H. Takahashi, and S. Nakamura. 1997. Emergence of *Clostridium botulinum* type B-like nontoxicogenic organisms in a patient with type B infant botulism. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2163-2164.
43. Zhou, Y., H. Sugiyama, H. Nakano, and E. A. Johnson. 1995. The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin complex are on a plasmid. *Infect. Immun.* **63**:2087-2091.

[食中毒における毒素産生細菌とその毒素 6]

ボツリヌス菌と神経毒素

Foodborne Botulism: *Clostridium botulinum* and its Neurotoxin

国立感染症研究所
細菌第二部第三室長¹⁾
国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部第四室長²⁾

高橋 元秀¹⁾, 鎌田 洋一²⁾

National Institute of Infectious Diseases¹⁾
National Institute of Health Sciences²⁾

Motohide TAKAHASHI¹⁾, Yoichi KAMATA²⁾

I はじめに

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、耐熱性のある芽胞として広く食品を汚染し、食品中で増殖すると同時に、人を死に至らしめる毒素を食品内に産生する。食品の保存のために食品と空気の接触を避ければ、本菌はかえって増殖する。また、一部の菌株では低温でも増殖し毒素を産生する。殺菌しようと考えて中途半端な温度で加熱すると、むしろ芽胞が活性化し増殖相に誘導される。

本菌は細菌性の食中毒であるにもかかわらず、下痢や嘔吐といった消化器症状を引き起こすのではなく、複視、発語障害、全身の脱力といった神経機能障害に基づく弛緩性麻痺を起こす。神経毒素は天然毒物のなかで最高レベルの致死毒力を示す。

近年「ボツリヌス」は、バイオテロによりすっかり有名になってしまった感があるが、本稿では食品衛生からみたボツリヌス菌と神経毒素について解説する。

II ボツリヌス菌の生態

ボツリヌス菌は、1897年に van Ermengen によってハム中毒の事例から初めて分離された。本菌はグラム陽性の偏性嫌気性桿菌で鞭毛を有し、亜偏在性の耐熱性芽胞を形成する。当初、菌の分類は混乱し *Bacillus botulinum* と記述されたこともある。

ボツリヌス菌の定義は、「ボツリヌス神経毒素を産生する」とこととされている。ボツリヌス菌は、リパーゼ産生、牛乳カゼイン消化、ブドウ糖分解などの生化学的性状の違いによって I から IV 群に分類される。一方、菌が産生する神経毒素は抗原性の異なる A から G 型まで 7 型に分類される。

最近の研究で例外が解析されつつあるが、原則的に 1 菌株が 1 種類の神経毒素を産生する。産生する毒素の型によって、菌株の分類がなされる。すなわち、A 型神経毒素を産生する菌株を A 型ボツリヌス菌と称する。表 1 に示すように、菌が属する群と産生する毒素の型の関係は、少し複雑で

表1 ボツリヌス菌の性状

群	I	II	III	IV
レシチナーゼ産生	-	-	-	-
リパーゼ産生	+	+	+	-
ゼラチン液化	+	+	+	+
牛乳カゼイン消化	+	-	-	+
グルコース発酵	+	+	+	-
ラクトース発酵	-	-	-	-
インドール産生	-	-	-	-
芽胞の耐熱性	120℃, 4分	80℃, 30分	100℃, 15分	?
発育至適温度	37~39℃	28~32℃	40~42℃	37℃
最低発育温度	10~12℃	3~5℃	10~15℃	?
神経毒素産生	A, B, F	B, E, F	C, D	G

(参考文献1~3より)

一貫しない部分がある。E型神経毒素を産生する *C. butyricum*, F型毒素産生性の *C. baratii* のようなボツリヌス神経毒素を産生する非ボツリヌス菌の存在が報告されている^{1,2)}。

また、各群においてそれぞれ至適な増殖温度、増殖可能な最低温度が異なるため、冷蔵庫内で増殖し毒素産生する菌群および産生する毒素の型も異なる。ほかに菌がタンパク質分解酵素を産生するかしないかという違いもあり、芽胞の耐熱性も群間で異なる。

群間の相違は大きく、ついにIV群は独立し *C. argentinense* となった。現在までに報告のあった食中毒事例は、A, B, E型ボツリヌス毒素によるもので、F型毒素が原因の食中毒は、わずか1例にすぎない。

毒素の型別は抗体を用いての毒素中和反応によってなされる。すなわち、食品や患者由来物(血清・便)や分離菌の培養液と、ある型の毒素に対するポリクローナル抗体を混合し、マウスに注射する。弛緩性麻痺から死を誘導する神経毒素の毒性を中和できるか否かで型別される。毒素の型別は、患者の治療をする場合重要になる。治療は、呼吸を確保し、毒素の型に対応した抗毒素血清療

法を施す。適切な治療をしない場合、高い死亡率を示す。C型とD型毒素の間には交差反応がある。過剰量の抗C型抗毒素血清はD型毒素を中和する。またその逆も起こる。CおよびD型毒素とはかの型の神経毒素の間には交差反応はない。C, D型毒素が原因の食中毒は起こっていない。したがって、抗A, B, E, F型抗毒素血清をそろえるわが国の現在の体制で、ボツリヌス食中毒の診断が可能で、その治療も行える。患者の呼吸を確保した医師が、症状からボツリヌス中毒を疑い検査を依頼し、診断用抗毒素血清を常備した自治体の衛生研究所が検査を実施することによって、ボツリヌス中毒に対処できる。

III ボツリヌス菌の分布および汚染される食品

致死性の食中毒を誘発するボツリヌス菌および食品汚染を起こすような芽胞は、土壌、河川、海岸、湖沼の底などに存在する。一度ボツリヌス菌の汚染を受けた環境は、耐熱性の芽胞の生存地として何十年も汚染源になる。芽胞はヨーロッパ、アジア、南北アメリカ大陸等、世界中に分布し、農産物を汚染する。土の上に生きる家畜、土が持

ち込まれる食肉処理場や食品加工場も例外ではない。現在までに報告されているボツリヌス中毒の原因食品に、ハム、ソーセージ、自家製の野菜の缶詰、びん詰食品、魚の発酵食品、真空パック製品などがある。酸素除去という食品の保存に適した保存法や製品がボツリヌス食中毒の機会を提供する。

わが国で初めてのボツリヌス中毒が、魚の発酵食品である「いずし」で起こったのは有名である。1951年北海道で発生し、以来60年、自治体の衛生研究所や国立系の研究所、医学系、食品系、獣医学系、薬学系の大学などの研究者によって、検査方法の研究や菌分離、菌の疫学、神経毒素の精製、診断用・治療用の抗毒素血清の作製、毒素の作用機構や抗原性の解析がなされてきている。レトルト食品やレトルト類似食品中での菌と毒素の関係等、厚生労働省も注目し注意喚起を行っている。新しい製造方法や保蔵方法、新規の食品形態が開発される際には、芽胞の汚染を排除できず、致死性の食中毒を引き起こすボツリヌス菌とその毒素には特別の注意が必要だろう。

IV 経口毒素としてのボツリヌス毒素の構造と食中毒発現機構

細菌性毒素の、特にタンパク質性毒素のなかで、ボツリヌス神経毒素は最初に精製され結晶化されている。1946年Lamannaによってなされた。ボツリヌス毒素の致死毒性の強さ、その構造や機能の複雑さなどが研究者を刺激し、多くの知見が集積している。ボツリヌス食中毒は、食品内に芽胞の混入があり、菌の増殖を許してしまい、産生されてしまった毒素によって起こる。以下、食品内で産生されたボツリヌス毒素が、どのような性状をもち、どのように毒性を発揮するのか、そのエッセンスを紹介する。

Lamannaの精製した毒素は分子量が900KDa

あった。A型毒素に始まり、G型毒素の精製まで進んだ過程のなかで、ボツリヌス菌は培養液や食品中に、分子サイズの異なる複数種類の毒素を産生することが認められた。すなわち、500KDa、および300KDaの分子量の毒素の存在で、900KDaおよび500KDaの分子サイズの毒素は、精製毒素標品中に血球凝集活性があることが示された。

一方、弱アルカリ性環境下における陰イオン交換クロマトフィーの技術によって、分子量150KDaの神経毒素活性をもつ画分が分離された。3種の分子サイズの異なるボツリヌス毒素は、神経毒素活性をもつタンパク質が1分子、神経毒素活性も血球凝集活性もないタンパク質が1分子、さらに、この2成分の合体毒素に、血球凝集成分が結合した複合体タンパク質毒素である。血球凝集成分は、3種類の分子量の異なるタンパク質がいくつも組み合わさって構成されている。

ボツリヌス菌は食品内で毒素を産生するため、非神経毒素成分は、胃酸やタンパク質分解消化酵素から神経毒素を守るためと位置づけされていた。最近の研究からも、血球凝集成分が複数の分子から構成されていること、そのなかの一部が毒素の消化酵素(トリプシン)耐性を担うことが明らかにされている。少し古い報告になるが、非神経毒素成分が神経毒素分子とともに腸管上皮細胞を通過し、リンパ管内へと吸収されることがわかっていた。

また、最近の研究から、非神経毒素成分が小腸上皮微絨毛に結合し、神経毒素分子を血液中に取り込まれやすくしていることが明らかにされている。これまでは非神経毒素成分が、酸や消化酵素から神経毒素を守るという、受身的な役割を担うと考えられていたが、神経毒素を標的の人体内に運び込むという積極的役割が見いだされた。ボツリヌス毒素が複合体毒素である意義と、ボツリヌス食中毒が食品内毒素型のそれであることを何よ

りも鮮明にした研究結果と思われる。すなわち、経口毒としての複合体毒素の優位性である。

AからG型までの神経毒素をコードする遺伝子がクローニングされ、塩基配列が明らかになっている。以前より、ポリクローナル抗体を用いての交差性試験において、CとD型毒素間に強く、EとF型毒素間には弱い免疫学的交差性が知られていた。塩基配列レベルでも、この交差性は証明されている。中毒事例由来菌株が保有する毒素遺伝子の塩基配列も次つぎに調べられ、その結果、抗原性は同一型の毒素であるとされている毒素においても、株間で塩基配列が一部異なり、毒素遺伝子(アミノ酸配列)の多様性が示されている。この多様性が抗原性の多様性にまで反映するかは明らかにされていない。現在、ボツリヌス毒素の型別はポリクローナル抗体で行われている。ここに記述した多様性が、型別、したがって、治療に用いる抗毒素血清の選択を混乱させるものではないと想像しているが、その科学的証左は示されていない。株間の塩基配列の違いは、ボツリヌス神経毒素遺伝子の由来を探る系統樹解析に利用されたり、塩基配列の違いをマーカーとして利用した分子疫学解析に応用され、新しいボツリヌス中毒事

例研究が展開されている。

V ボツリヌス神経毒素の分子構造と神経毒性発現機構

ボツリヌス神経毒素は、ジスルフィド結合された2本鎖構造をもったとき活性型となる。分子量50KDaの軽鎖と呼ばれるN末端側サブユニットと、分子量100KDaの重鎖と呼ばれるC末端側サブユニットから構成される。重鎖はさらに中央部分から2つのドメインに機能的構造的に分かれる。X線結晶解析から三次元構造が明らかになっている型の毒素がある。

ボツリヌス神経毒素の直接の標的部位は神経筋接合部の神経終末で、重鎖C末端ドメインが受容体への結合を担う。受容体として最初に同定されたのは、B型毒素に対するシナプトタグミン・ガングリオシド複合体である。A型毒素の受容体はsynaptic vesicle protein2と呼ばれるタンパク質として同定されている。受容体に結合した毒素分子(軽鎖と重鎖とも)は、受容体介在性エンドサイトーシスによって、小胞に取り囲まれたまま、神経終末内に取り込まれる。エンドソームとなった小胞から軽鎖が細胞質内に入る。このとき重鎖の

食品衛生教育シリーズ

食品衛生の基本 たいせつな手洗い

手洗いはとても大切です。手に付着した細菌がどのように増殖し、手洗いによってどのようにきれいになるかを、イラスト、写真を使って説明。講習会等のテキストに最適です。

A5判 24ページ・定価300円(本体価格+税)



社団法人 日本食品衛生協会

N末端ドメインがエンドソーム膜を突破するチャネル機能を発揮する。軽鎖は亜鉛イオン依存性タンパク質分解酵素活性をもつ。

神経終末における神経刺激伝達機構の概略を述べると、以下ようになる。アセチルコリンを含んだ小胞の膜上の特定のタンパク質と、シナプス前膜上の特定のタンパク質とが結合し、小胞が前膜に密着する。その後、膜の融合が起こり、小胞内部のアセチルコリンがシナプス間隙に放出される。筋肉側のエンドプレートに分布する受容体にアセチルコリンが到達し、上流からの神経刺激がシナプスを越えて筋肉へと伝わる。ボツリヌス毒素の軽鎖は、シナプトプレビン、シンタキシン、SNAP-25というアセチルコリン小胞とシナプス前膜の結合・融合にかかわるタンパク質群を切断し、機能を発揮させなくする。アセチルコリン小胞とシナプス前膜の結合・融合が阻害され、結果としてシナプス小胞からのアセチルコリン放出が阻害される。軽鎖のタンパク質切断作用は、*in vitro* 実験で証明されている。しかしながら、1分子の軽鎖がいくつの小胞の動きを止めるのかは明らかになっていない。ボツリヌス神経毒素の非常に強力な神経機能障害作用が、受容体への結合の特異性や酵素活性だけで説明できるのか、明確な証左はない。

非神経毒素成分によって胃酸や消化酵素から保護され、さらに血球凝集成分による体内取り込み促進を受けた神経毒素は、リンパ液から血液中へと移行し、全身に分布する。神経毒素は未知の機構で血管上皮を通過し、組織内を移行し、神経筋接合部に到達する。腸管内からの吸収の後の、ボツリヌス毒素の体内移行メカニズムはわかっていない。神経毒素は大きな分子であるので、血液中の毒素分子は肝臓や腎臓に捕捉されてしまうだろう。血液中のボツリヌス毒素は、速やかに血管中から組織へと移行するのだろうか。組織内のボツ

リヌス毒素は単純に拡散によって体内を移行し、神経終末に達するのだろうか。毒素の移行を仲介する物質が生体内にあり、ボツリヌス毒素の超強力な毒性発現を助けているかもしれない。ボツリヌス食中毒の発現メカニズムの全容の解明はこれからだろう。

VI 食中毒事例・症状・対策

国内の食餌性ボツリヌス症は、1951年に北海道の岩内町で自家製の「ニシンのいずし」を食べた24名中14名が発症するE型毒素を原因とする食中毒が確認されたのが最初である。

以来、北海道や東北地方でさまざまな魚を素材とした「いずし」による事例が報告され、1980～2000年にかけて散発的に報告されている。2000年以降は、所轄の衛生部、保健所等による予防対策、中毒の原因がおもに自家製のいずしにあることを注意喚起した「食べない」「あげない」「作らない」運動なども効果的だったようである。近年では、2007年4月に岩手県で自家製の鮎いずしによる事例(患者1例)が発生した⁴⁾。この例を含めて、「いずし」によるボツリヌス食中毒の原因毒素型はE型のみが報告されている。

いずし以外の原因食品はびん詰キャビア(1969年宮崎県、B型、患者23例、死亡3人)、真空パックのカラシレンコン(1984年14都道府県、A型、患者36例、死亡11人)、オリーブびん詰(1998年東京都、B型、患者18例)、真空パックハヤシライスソース(1999年千葉県、A型、患者1例)などによる事例があり、大半が輸入食材または食品が原因食でA、B型毒素によるものである。

また、2008年8月には栃木県の83歳の男性が、桃およびパイナップルの缶詰と自家製ミョウガを食べた後に発症した。患者は血清学的な診断結果を待たずに、治療用の乾燥ボツリヌスウマ抗毒素を投与し、良好に回復した。患者血清中からA

表2 国内の乳児ボツリヌス症発生状況

	都道府県	確認年月	便 中			ハチミツ		報告論文等
			毒素型	毒素	菌	摂取歴	菌分離	
1	千葉	1986年5月	A	+	+	+	+	IASR Vol.7
2	京都	1987年7月	A	+	+	+	-	Jpn J Med Sci Biol 43: 233-237(1990)
3	大阪	〃年7月	?	-	-	+	-	Personal communication
4	石川	〃年7月	A	+	+	+	+	IASR Vol.9 No.3(1988)
5	大阪	〃年8月	A	-	-	+	+	Shonika Shinryo 52: 2799-2804(1989)
6	京都	〃年8月	?	?	?	+	-	Personal communication
7	愛媛	〃年9月	?	?	?	+	?	Personal communication
8	愛媛	〃年10月	A	+	+	+	+	IASR Vol.9 No.3(1988)
9	神奈川	〃年10月	A	-	+	+	-	Chiryogaku 25: 207-209(1991)
10	岐阜	〃年10月	A	+	+	+	+	Shonika Rinsho 41: 551-554(1988)
11	神奈川	1989年2月	A	+	+	+	+	Acta Paediatr Jpn 33: 394-397(1991)
12	岡山	〃年10月	A	+	+	+	+	The 22nd Meeting of JSPID
13	北海道	1990年2月	C	+	+	?	?	Lancet 336: 1449-1450(1990)
14	大阪	1992年9月	A	+	-	-	ND	JJAID 68: 259-262(1994)
15	石川	1995年3月	B	+	+	-	ND	Acta Paediatr Jpn 38: 541-543(1996)
16	東京	1996年4月	A	+	+	-	ND	IASR Vol.17 No.10
17	広島	1999年3月	A	+	+	-	ND	IASR Vol.20 No.12
18	東京	2004年12月	E*	+	+	-	ND	IASR Vol.27 No.2 p.46-48
19	愛知	2005年7月	A	+	+	-	ND	IASR Vol.26 No.9 p.246-247
20	大阪	〃年10月	B	+	+	-	ND	IASR Vol.28 No.6 p.168-169
21	大阪	2006年5月	B	+	+	-	ND	IASR Vol.27 No.10 p.275-276
22	宮城	〃年9月	A	+	+	-	ND	IASR Vol.28 No.4(2007)
23	岩手	2007年1月	A	+	+	-	ND	IASR Vol.29 No.2(2008)
24	茨城	〃年10月	A	+	+	-	ND	The 40th Meeting of JSPID
25	岩手	2008年9月	A	+	+	-	ND	—

* E型毒素産生 *C. butyricum* による

型ボツリヌス毒素を検出し、便からもA型菌を分離した。患者の喫食物および環境からは菌および毒素は検出されず、原因食品は特定されなかった。さらに、この患者は50病日に採取した便からもA型菌を検出し、通常の食中毒では認められない長期間の菌の便排出を確認されていることで成人腸管定着ボツリヌス症(child and adult botulism from intestinal colonization)であった疑いもある⁵⁾。

患者の症状は、食中毒では原因食品の摂取から発病までの時間、摂取された毒素の量と型により異なることが多い。一般的には数時間から2日程

度で、副交感神経と運動神経が遮断され、口内の渇き、嚥下困難、複視、便秘、全身の筋弛緩などが起こる。発症初期には複視や散瞳等の眼症状が顕著に観察されることが多い。重症の場合は呼吸筋の麻痺による呼吸不全で致命的となる。乳児ボツリヌス症では、便秘傾向にはじまり全身の筋力低下(カエル様姿)が見られる。泣き声、ほ乳力が弱まり、頸部筋肉の弛緩によって頭部を支えられなくなる。顔面は無表情(能面顔)になり、散瞳、眼瞼下垂、対光反射の緩慢などボツリヌス食中毒と同様な症状も現れる。乳児の国内発生状況を表2に示したが、食中毒患者に比べて、乳児ボツリ

ヌス症の死亡率は低く2%程度である。

感染症法では食中毒患者、無症状病原体保有者、感染症死亡者および感染症死亡疑い者の死体を診断した場合は届け出を直ちに行うことが求められている⁶⁾。

患者報告は、1999年4月施行の感染症法では「乳児ボツリヌス症」は全数把握の4類感染症に定められていたが、2003年11月の改正で「すべてのボツリヌス症」が対象となり、さらに乳児ボツリヌス症も経口感染との解釈で食中毒として届け出ることとなった。この場合、食中毒と乳児ボツリヌス症は分類・区別されているが、医師が乳児ボツリヌス症をどちらで届けるかは決められていない。そのために、食品が原因の場合は食品衛生法に基づき食中毒としての届け出も必要であるために、両法律における届け出解釈が異なる場合は患者の統計数が異なることが予想される。

Ⅶ 毒素および毒素産生細菌の検査法

ボツリヌス中毒を疑う患者の検査は、国内では地方衛生研究所と国(国立感染症研究所と国立医薬品食品衛生研究所)の両方で協議した標準的検査法を作成して、さらに検査システムを衛生微生物技術協議会で構築したレファレンスセンターが検討している。ボツリヌスレファレンスセンターは、平成18年6月に開催された理事会・検査情報委員会・レファレンス委員会合同委員会において、ジフテリア・百日咳レファレンスセンターに組み込むかたちで承認されている。センター設立にあたっては、ボツリヌス毒素・菌の検査方法、発生状況等の情報提供や感染症法の一部改正に伴うボツリヌス菌および毒素の取扱い等の規制対応および試験に使用する診断用ボツリヌス血清の作製・配布等が当面の課題であった。

また、国際的に求められている実験動物を使用

しない早期診断法の改良・開発も目指すこととなった。現在までの実績として、(1)実験室内診断としてマウス試験法に必要なA, B, EおよびF型の診断用血清を作製し検査体制を整えた。また、簡易試験法の開発として厚生労働科学研究費補助金の支援を受けて、(2)A, B, EおよびF型毒素検出用としてデンカ生研の協力でラテックス凝集反応試薬を作製し、(3)A型毒素検出用にアドテックの協力でイムノクロマトキットを作製して、それぞれ15カ所のセンターに配布してスクリーニング用試験薬として評価・検討している。

患者発生に際して実験室診断の検査対象物は、食中毒と乳児ボツリヌス症の場合は、喫食した食品と食材等の関係食品とともに、便ならびに血清が中心である。特に食品の検査ではE型以外の菌は国内の土壌から分離された報告は少ないために、海外からの輸入品(食材を含む)も調査の対象とする。近年の事例では、食中毒および乳児ボツリヌス症の患者環境の調査において原因食品が特定されない場合が多く、公衆衛生上の予防対策が困難な状況にある。

なお、検査手順や方法の詳細は「実験室内検査」としてIASRを参照されたい⁷⁾。

Ⅷ 海外での発生状況、新たな知見等

患者の治療に用いる治療用ウマ抗毒素製剤について述べる。希少感染症でもあるボツリヌスの治療用のウマ抗毒素製剤には、その採算面から企業の自助努力ではその安定的な供給が困難な抗毒素として、国が企業から定期的買い上げ、保管・供給するという国有ワクチン制度がある。この国有ワクチン制度によって、ボツリヌスは患者が少なく、ほとんど使われないが、国民保健上必要不可欠な抗毒素を自国内で生産し、国内での技術の伝承を保ちつつ安定的な供給が図られている。ま

た、患者発生に際して速やかに医療現場に抗毒素を届けることを可能にするために、国内数カ所に配備されている。なお、過去に患者発生があった都道府県においては、国有ワクチンを国から直接買い上げ、独自に県内に保管し供給体制を構築している場合もある。

この抗毒素製剤は海外でも製造・備蓄している国は少ないために、緊急時には国際機関を通じて供与依頼がある。2006年3月タイにおいて、保存していた水煮タケノコを原因食品として、仏教徒の年祭に集まった325人の村人のうち190人もの人が発症するという、近年まれにみる大規模なボツリヌス食中毒が起こった。このときWHOによるボツリヌス抗毒素の呼びかけにより、抗毒素の備蓄国であるUK, USA (CDC), カナダ (Sanofi-Pasteur) および日本から緊急供与した。日本はA, B, E および F 型の多価抗毒素を23本提供し、

投与した8人中6人は12時間後に症状の改善が確認されている。さらに、9月には韓国へも緊急供与している⁸⁾。

IX おわりに

食中毒および経口感染症としてのボツリヌス中毒、ボツリヌス菌、ボツリヌス神経毒を解説した。食品への芽胞の汚染が避けられず、また、死を誘発してしまうのがボツリヌス食中毒・感染症で、事例数は少ないものの、注意を怠ってはならない食品衛生上の重要な疾病である。

ここで、わが国が世界に冠たるボツリヌス研究国であることを申し添えたい。基礎から応用研究まで、また、診断法の開発から毒素作用機構解明にわたり、非常に多くの優秀な研究がなされている。参考文献には、和文における総説数編と参考資料を追記しておく^{1,2,9~12)}。

参 考 文 献

- 1) 笹川千尋ら編：ボツリヌス菌，医科細菌学，南江堂(2008)
- 2) 山中英明ら編：ボツリヌス菌による食中毒，食品衛生学 第二版，恒星社厚生閣(2007)
- 3) 阪口玄二：ボツリヌス菌毒素の構造と機能，日本細菌学雑誌，**43**，951-960(1988)
- 4) IASR：岩手県で発生したボツリヌス食中毒事例について，**29**(2)，38(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3362.html>
- 5) IASR：食餌性が疑われたA型ボツリヌス中毒の事例，**30**(7)，187(2009)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/30/353/kj3531.html>
- 6) 厚生労働省：感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について 32 ボツリヌス症
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-32.html>
- 7) IASR：ボツリヌス症の実験室内検査，**29**，39-41(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3364.html>
- 8) IASR：タイ，韓国における食餌性ボツリヌス症発生に対する日本の抗毒素供給支援，**29**，45-46(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3368.html>
- 9) 小崎俊司：ボツリヌス神経毒素の構造と作用発現機構，日本細菌学雑誌，**51**，513-522(1996)
- 10) 小熊恵二：ボツリヌス毒素およびボツリヌス中毒について，日本食品微生物学雑誌，**21**，1-7(2004)
- 11) 大山 徹：ボツリヌス毒素の機能とそのサブユニット，蛋白質核酸酵素，**51**，2334-2340(2006)
- 12) 中村信一：ボツリヌス菌の疫学，日本食品微生物学雑誌，**23**，1-5(2006)

5

ボツリヌス毒素研究と将来展望

1) 品質管理とその定量法

国立感染症研究所細菌第二部 高橋元秀

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)が産生する神経毒素は、神経伝達物質の放出に対して運動ニューロンを妨げることによって麻痺を引き起こす強力な神経筋遮断剤として開発された。本製剤は筋肉の異常興奮または痙攣を含む数種の神経筋疾患の治療に広く各国で用いられている。

ボツリヌス毒素製剤の品質管理は臨床使用における安全性と有効性確認のために重要であり、物理化学的試験法で重量測定するだけでなく、生物学的製剤として毒素の効果判定を生物検定(バイオアッセイ)で試験することが求められる。

1

生物学的製剤としてのボツリヌス毒素の品質管理



- 治療用ボツリヌス毒素はボツリヌス菌を培養した毒素を高度精製した生物学的製剤である。
- 生物学的製剤の製造と品質管理方法については WHO のガイドラインに則った規制・手法が国際的に導入されている。
- 品質管理試験は、感度、再現性および信頼性に優れ、ヒト接種後に起こりうる副反応を未然に防ぐ、高い安全性を保證する方法が必要である。
- 同様に、毒素の期待される特異的な効果を適切に反映する、よくバリデートされ、技術移転が容易な有効性試験が求められる。

WHO による生物学的製剤の定義は、1970 年には、「ヒトまたは動物の病気の予防、治療および診断に用いる製剤で、その力価および安全性を化学的または物理学的の方法のみでは評価できないため、生物学的方法を用いて評価するもの」すなわち、動物、微生物、細胞などを用いた生物検定(バイオアッセイ)で評価される医薬品のことを示すとされた(WHO Tec. Rep. Ser. No.444, 1970)。ここで意味することは、製剤を“物”として具体的に示すのではなく、“試験法の特性”から規定された製剤であることを示していた。その後、1992 年に生物学的製剤 GMP(good manufacturing practice)指針が示され、微生物および真核細胞株の増殖、ヒトや動物および植物組織を含む生物や組織からの抽出物質、DNA 組み換え技術、細胞融合技術、胚細胞または動物における微生物の増殖産物等の生産物と定義された。具体的には、アレルゲン、抗原、ワクチン、ホルモン、サイトカイン、酵素、ヒト全血および血漿分画製剤、免疫血清、モノクローナル抗体、組み換え DNA 製品等が対象製剤であることを具体的に挙げている(WHO Tec. Rep. Ser. No.822, 1992)。

製剤の均質性の確保の検証として、製造承認審査・認可申請(安全試験、有効性試験)、製造工程における工程管理試験および国家検定(ロットリリース)時に規格値に適合しているかの確認試験が実施されている。これら試験は、物理化学試験(重量等)で測定・表現できない生物活性の評

価が求められ、実験動物を用いた有効性(力価)、安全性試験を実施する。試験法は感度、精度および再現性に優れた分析評価系の確立を目指す必要がある。したがって、ボツリヌス毒素の品質保証は科学的根拠に基づいた実証が求められている。

生物学的製剤の有効性と力価の関係は、必ずしも一致するものではない。すなわち、有効性が確認できるのは、ヒトに実用接種した場合に期待する効果が得られたときである。現在、ボツリヌス製剤の力価(単位)は、製造承認された製剤の工程管理において定めた規格値に適合していること、またロットごとの製造の連続性を確認する指標である。製剤の有効性を実験動物を用いた試験(*in vivo*法)で、生物活性を数値化して示すことにより、品質管理の性状確認試験の一つの指標となっているにすぎない。ヒトに接種した後の効果は狙った筋肉が毒素の麻痺により総合的に運動機能の復元が期待されるために、この毒素の麻痺作用を直接的に定量化することによって、より信頼性の高い製剤の品質管理に繋げることが議論となっている。具体的な問題提議は、米国で製造された Botox[®] と英国で製造された A 型ボツリヌス毒素製剤において、同じ単位表現であるにもかかわらず等価でないために、同様な臨床結果を得るには異なる単位(LD₅₀)を接種しなくてはならないことが報告された¹⁾。さらに、毒素製剤の単位をマウスの局所麻痺を指標とした値で評価すると、ヒト接種時に求める臨床効果と相関があることも示された²⁾。

2

ボツリヌス毒素の定量法と動物実験の必要性



- マウス腹腔内注射法(マウス ipLD₅₀ 法)は古典的な方法ではあるが、ゴールドメソッドとして国際的に使われている。
- 海外で販売されている複数の製造所の製剤のラベルに記載されている単位(LD₅₀)の含量は一様ではない。
- ヒトにおける臨床反応を外装することのできる筋肉麻痺活性を実験動物での効果判定で評価される。
- 動物愛護の側面から、実験動物を用いない簡易な *in vitro* 法の導入が急務である。

ボツリヌス食中毒の実験室内診断法やボツリヌス菌の同定・解析に用いる細菌学試験法として開発され、マウス腹腔内投与後に観察される麻痺の延長上にある致死を指標とした方法である。本方法は、古典的ではあるが感度も優れているために(純品毒素の 10 ~ 20 pg を検出)、国際的にボツリヌス毒素定量の標準試験法として用いられている。現在もマウスの致死を指標として、試験結果を統計学的手法で解析して求めた 50% 致死量(LD₅₀)で示す方法がボツリヌス製剤の値付けに適用されている。

近年、動物愛護の観点から、現状のボツリヌス毒素の定量系である実験動物試験法の代替法(3Rs)の推進が世界的に提議されている(表 1)。米国では毒性試験法の開発、バリテーション方法について国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整する機関として NICEATM(The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)を開設している。また、その組織の下に国レベルの専門的な組織として ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)を作り、活発な議論と活動を行っている。欧州連合(EC)でも同様に ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)を設立し対応している。