

総説

ボツリヌス症

小崎俊司^{1)†} 幸田知子¹⁾ 梅田 薫²⁾

1) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

2) 大阪市立環境科学研究所 (〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34)

BOTULISM

Shunji KOZAKI^{1)†}, Tomoko KOHDA¹⁾ and Kaoru UMEDA²⁾1) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-Orai-Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*2) *Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka, 543-0026, Japan*

1 はじめに

ボツリヌス症はグラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) から産生される毒素により極めて致死性の神経麻痺を起こす。毒素は抗原性の違いによりA～Gの7種類の存在が知られている。通常、1つの菌株は1種類の毒素を産生するが、例外的に2種類の毒素を産生する菌がある。本菌は、生化学的性状及び16S rRNA 遺伝子の相同性から4つの群 (第I群～第IV群) に分類されているが、毒素型による分類と一致しない。ボツリヌス菌以外では、一部の *C. butyricum* 及び *C. baratii* が、それぞれE型、F型毒素と類似した毒素を産生することが知られており、分類学上多少の混乱が生じている。一方、毒素の持つ神経に対する高い親和性により、人を含む多くの脊椎動物が罹患し、罹患動物と毒素型には関連性がある。人のボツリヌス症はA、B、E型菌が原因であり、まれにF型菌中毒の発生が認められている。家畜・家禽のボツリヌス症は、主としてC型及びD型菌が原因とされているが、B型菌による牛、馬のボツリヌス症も報告されている。わが国の人のボツリヌス症はE型菌による食中毒が多いことが知られていたが、A型及びB型菌による乳児ボツリヌス症の発生も散見される。家畜・家禽においては鶏ボツリヌス症の発生は認められていたが、牛ボツリヌス症が全国的に発生しており、原因菌などの探求が課題とな

っている。本稿では、人及び動物のボツリヌス症における起因菌及び産生する毒素の特徴等、これまで私共が得た知見を中心に最近の知見もあわせて解説する。

2 ボツリヌス毒素

ボツリヌス毒素は菌体が溶菌する際に放出される。毒素は神経毒素と分子量の異なる無毒成分が結合した複合体 (progenitor toxin) の形で産生される。無毒成分は単一の分子ではなく、複数のタンパクの構成物で、それらの組み合わせにより複合体毒素の分子量が異なる。無毒成分の中で最も大きい分子量を持つ成分は血球凝集活性を持たないNTHA (non-toxic non-hemagglutinin) が神経毒素と直接結合している。複合体毒素は型によりA型では3種類 (LL, L, M)、B、C、D型は2種類 (L, M)、E、F、G型は1種類 (MあるいはL) の毒素を産生する。複合体毒素はボツリヌス毒素が経口毒として作用するために必須の構造であり、NTHA及びHA成分が神経毒素を小腸上部で吸収されるまで胃内や消化管内で保護していることが分かっている。吸収された複合体毒素は、リンパ管、血管内で神経毒素と無毒成分に解離し、神経毒素は血行性に神経筋接合部や自律神経に作用すると考えられている。神経毒素は150 kDaの1本鎖 (Intact form) ポリペプチドの形で産生される。A型及びB型菌では神経毒素は同時に産生されるタンパク分解酵素により、毒素分子内に解裂 (nicking) が生じ、50

† 連絡責任者: 小崎俊司 (大阪府立大学大学院生命環境化学研究科)

〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58

☎072-463-5513 FAX 072-463-5691

E-mail: kozaki@vet.osakafu-u.ac.jp

† Correspondence to: Shunji KOZAKI (Osaka Prefecture University)

1-58 Rinku-Orai-Kita, Izumisano, 598-8531

TEL 072-463-5513 FAX 072-463-5691 E-mail: kozaki@vet.osakafu-u.ac.jp

表1 国内のボツリヌス症発生状況

| 毒素型 | 食餌性ボツリヌス症 | 乳児ボツリヌス症 |
|-----|-----------|----------|
| A | 13 | 21 |
| B | 3 | 5 |
| C | 0 | 1 |
| E | 104 | 1* |
| 不明 | 1 | 3 |
| 計 | 121 | 31 |

食餌性ボツリヌス症 (1955~2012年)

乳児ボツリヌス症 (1986~2012年)

*: E型毒素産生性 *C. butyricum*

kDaの軽鎖 (L: Light chain) と100 kDaの重鎖 (H: Heavy chain) の2本鎖構造 (Nicked form) に変化する。さらに神経毒素は3つのドメインから構成されていることが結晶構造の解析から明らかになっている。各ドメインは神経細胞膜に存在する受容体へ結合、細胞内侵入及び細胞質内への移行、細胞質内の標的タンパク質の修飾など、一連の毒性発現過程でそれぞれ独立した機能を持つ。軽鎖は細胞質内での毒性発現活性、重鎖N末端領域 (HN) には細胞内移行に関わる脂質二重膜にチャンネル形成を担う活性、重鎖C末端領域 (HC) には受容体への結合活性があることから、それぞれ毒性ドメイン、チャンネル形成ドメイン、結合ドメインと呼ばれている。

神経毒素はHCを介して、シナプス前膜に特異的に結合するが毒素型により結合部位が異なる。そのため毒素型特異受容体としてタンパク質因子の存在が注目された。実際、A型及びB型毒素受容体はシナプス小胞膜に存在するシナプス小胞タンパク質2 (SV2) あるいはシナプトタグミンであることが明らかになっている。毒作用の本態は軽鎖の持つ亜鉛依存性のタンパク分解酵素活性であり、シナプス小胞が前膜と融合する際に必要なSNAP (soluble NSF attachment protein) 受容体 (SNARE) と呼ばれる3種類の細胞内蛋白 (VAMP, SNAP-25, シンタキシン) のいずれかを特異的に分解する。その結果、小胞膜と前膜の融合が阻害されシナプス小胞内の神経伝達物質の放出が阻害される。

3 人のボツリヌス症

ボツリヌス症は発症機序により、食餌性ボツリヌス症 (ボツリヌス食中毒)、乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症、成人腸管定着性ボツリヌス症の4つに分類される [1]。

ボツリヌス症は「感染症法」において全数把握の4類感染症に定められており、本症を診断した医師は直ちに最寄りの保健所に届け出る義務がある。届出基準は厚生労働省 HP に明記されている (厚生労働省: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-04->

表2 近年の国内における食餌性ボツリヌス症発生状況 (1984~2012年)

| No. | 発成年 | 発生場所 | 患者数 (死者数) | 原因食品 | 毒素型 | 毒素サブタイプ |
|-----|------|------|-----------|--------------------|------------------|---------|
| 1 | 1984 | 熊本県 | 36 (11) | からしレンコン (パック詰め) | A | A(B) |
| 2 | | 青森市 | 1 (0) | イワシの飯ずし | E | NT |
| 3 | | 栃木県 | 1 (0) | 不明 | B | NT |
| 4 | | 北海道 | 6 (0) | ハタハタ、鮭の飯ずし | E | NT |
| 5 | 1985 | 北海道 | 1 (1) | イワシの飯ずし | E | NT |
| 6 | 1988 | 岡山県 | 1 (0) | 不明 | A | NT |
| 7 | | 北海道 | 3 (0) | 自家製鮭の調味乾燥品 | E | NT |
| 8 | 1989 | 北海道 | 1 (0) | ニシンの飯ずし | E | NT |
| 9 | | 滋賀県 | 3 (0) | 自家製ハスずし | E | NT |
| 10 | | 北海道 | 2 (0) | カレイの飯ずし | E | NT |
| 11 | 1991 | 青森県 | 1 (0) | ウグイの飯ずし | E | NT |
| 12 | | 青森県 | 1 (0) | アユの飯ずし | E | NT |
| 13 | | 広島市 | 1 (0) | 不明 | A | NT |
| 14 | 1993 | 秋田県 | 4 (0) | 里芋 (缶詰) | A | NT |
| 15 | | 大阪府 | 1 (0) | 不明 | 不明 ¹⁾ | NT |
| 16 | 1995 | 青森県 | 1 (0) | コハダの飯ずし | E | NT |
| 17 | | 青森県 | 3 (0) | ウグイの飯ずし | E | NT |
| 18 | | 北海道 | 6 (0) | 鮭の飯ずし | E | NT |
| 19 | 1996 | 千葉県 | 1 (0) | 不明 | A ²⁾ | NT |
| 20 | 1997 | 福島県 | 3 (0) | ハヤの飯ずし | E | NT |
| 21 | | 福島県 | 1 (0) | イワナの飯ずし | E | NT |
| 22 | 1998 | 東京都 | 18 (0) | イタリア産グリーンオリーブ (瓶詰) | B | B2 |
| 23 | 1999 | 東京都 | 1 (0) | 不明 | A | A1 |
| 24 | | 千葉県 | 1 (0) | ハヤシライスソース (パック詰め) | A | A(B) |
| 25 | | 大阪市 | 1 (0) | 不明 | A | A(B) |
| 26 | 2007 | 岩手県 | 1 (0) | アユの飯ずし | E | NT |
| 27 | 2008 | 栃木県 | 1 (0) | 不明 | A | A(B) |
| 28 | 2011 | 広島市 | 1 (0) | 不明 | A | A2 |
| 29 | 2012 | 鳥取県 | 2 (0) | あずきばっとう (パック詰め) | A | A(B) |
| 30 | 2012 | 熊本県 | 1 (0) | 不明 | A | A(B) |

1) 臨床決定、2) A型毒素検出のみで菌不検出

NT: サブタイプ不明

32.html)。ボツリヌス食中毒及び乳児ボツリヌス症が発生した場合には、食品衛生法による対処も必要である。また、本法においてすべての型のボツリヌス菌及び毒素は二種病原体に指定され、その所持、輸入、移動には厚生労働大臣の許可が必要である。

(1) 食餌性ボツリヌス症 (ボツリヌス食中毒)

食品内に産生された毒素を摂取することにより発症する、典型的な食品内毒素型食中毒である。1日~数日間の潜伏期を経て、下痢、腹痛等の非特異的症状が出現し、次いで、複視、眼瞼下垂、口渇、嚥下困難、閉尿、呼吸困難等の神経症状が出現する。これらの症状はボツリヌス毒素の麻痺作用によるものである。治療にはウマ血清

表3 国内の乳児ボツリヌス症発生状況

| No. | 発生前年 | 発生場所 | 月齢 | 性別 | 便中菌 検出 | ハチ ミツ 摂取 | 毒素型 | 毒素 サブ タイプ |
|-----|------|------|----|----|-----------|----------------|-----|-----------------|
| 1 | 1986 | 千葉 | 2 | 男 | + | + | A | A2 |
| 2 | 1987 | 京都 | 1 | 女 | + | + | A | A2 |
| 3 | | 大阪 | 1 | 女 | - | + | ? | NT |
| 4 | | 石川 | 2 | 女 | + | + | A | A2 |
| 5 | | 大阪 | 1 | 男 | - | + | A | A2 |
| 6 | | 京都 | 3 | 男 | ? | + | ? | NT |
| 7 | | 愛媛 | 4 | 男 | ? | + | ? | NT |
| 8 | | 愛媛 | 4 | 男 | + | + | A | A2 |
| 9 | | 神奈川 | 4 | 男 | + | + | A | A2 |
| 10 | | 岐阜 | 3 | 男 | + | + | A | NT |
| 11 | 1989 | 神奈川 | 4 | 男 | + | + | A | NT |
| 12 | | 岡山 | 1 | 男 | + | + | A | NT |
| 13 | 1990 | 北海道 | 5 | 女 | + | - | C | NT |
| 14 | 1992 | 大阪 | 2 | 女 | - | - | A | NT |
| 15 | 1995 | 石川 | 6 | 女 | + | - | B | B2 |
| 16 | 1996 | 東京 | 3 | 女 | + | - | A | NT |
| 17 | 1999 | 広島 | 7 | 男 | + | - | A | A(B) |
| 18 | 2004 | 東京 | 9 | 男 | + | - | E* | NT |
| 19 | 2005 | 愛知 | 9 | 女 | + | - | A | NT |
| 20 | | 大阪 | 3 | 女 | + | - | B | B6 |
| 21 | 2006 | 大阪 | 5 | 女 | + | - | B | B2 |
| 22 | | 宮城 | 1 | 男 | + | - | A | A(B) |
| 23 | 2007 | 岩手 | 10 | 男 | + | - | A | A(B) |
| 24 | | 茨城 | 6 | 女 | + | - | A | A(B) |
| 25 | 2008 | 岩手 | 7 | 男 | + | - | A | A(B) |
| 26 | 2010 | 福岡 | 9 | 女 | + | - | A | A(B) |
| 27 | 2011 | 岡山 | 10 | 女 | + | - | B | B6 |
| 28 | | 愛媛 | 11 | 男 | + | + | B | B5 |
| 29 | | 愛知 | 10 | 女 | + | - | A | A1 |
| 30 | | 広島 | 7 | 男 | + | - | A | A(B) |
| 31 | | 大阪 | 6 | 男 | + | - | A | A(B) |

* : *C. butyricum* ? : 報告なし NT : サブタイプ不明

を用いた抗毒素療法 (A, B, E, F型4価混合あるいはE型単価) が用いられる。他の食中毒と比較して致死率が高いが、近年は早急に呼吸管理や治療が施される場合が多く、死亡例は著しく減少している。1955年以来、国内では121事例の食中毒が発生している (表1, 2)。1990年代中頃までは主に、魚・米などを発酵させた北海道・東北地方の伝統食品 (飯ずし、きりこみなど) を原因とする、E型菌による事例が年に数例発生していた。これは、日本各地の湖沼、河川にはE型菌が広く分布していることを反映している [2]。しかし、各家庭で伝統食品を作る機会が減少したことや、行政による衛生対策指導が功を奏し、これらの食品を原因とする事例は減少した。一方、1990年代以降は、輸入食品やパック詰め食品を原因とする事例や、原因食品が特定されない事例が散発的に発生している。これらの事例ではE型菌ではなくA型菌、B型菌が分離されることが特徴である。

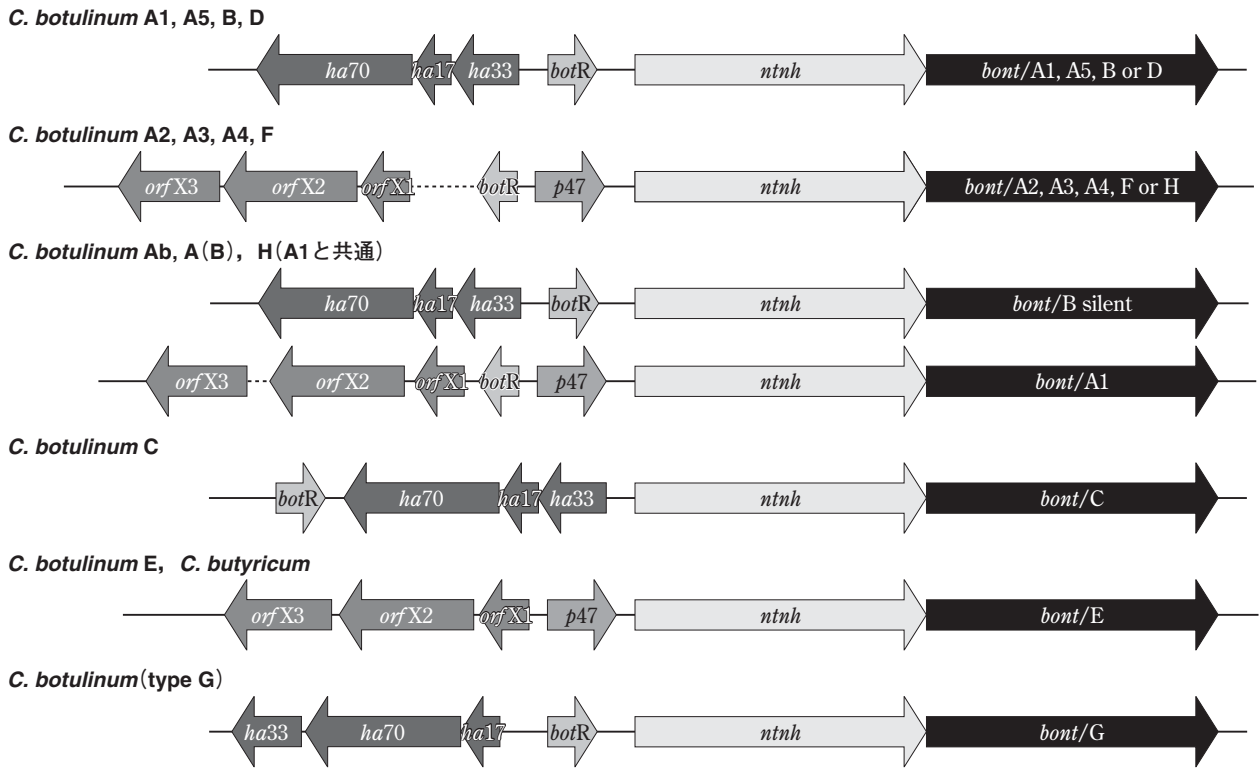
最近では、2012年に鳥取県でパック詰め食品「あずきぱっとう」(あずき餡汁にひら打ちのうどんを合わせた岩手県の郷土料理) を原因食品とする事例が発生した [3]。患者2名及び、食品残品からA型菌が検出されたため、ボツリヌス食中毒と断定された。この事例を受けて、厚生労働省より食品関係事業者及び消費者に向けて「真空パック詰め食品などのボツリヌス食中毒対策についての注意喚起」が実施された。食品関係事業者に向けては、容器包装密封でpHが4.6を超える、かつ、水分活性が0.94を超える食品には、ボツリヌス芽胞を完全に死滅させる120℃、4分間加熱する方法または、これと同等以上の効力を有する方法での殺菌を行うこと、あるいは生産から消費まで冷蔵(10℃以下)で管理・保存し、消費者に要冷蔵商品であることが明確に分かるよう表示することなどが喚起された。消費者に向けては、「要冷蔵」等表示の確認、喫食前に十分に加熱することなどが喚起された (厚生労働省HP : http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/03-4.html)。

この事例以外にも、近年のボツリヌス食中毒には、缶詰、瓶詰、パック詰食品が深く関わっている。パック詰め食品による事例は、1984年に熊本県で発生した「からしレンコン」を原因とする事例や、1999年に千葉県で発生した「ハヤシライスソース」を原因とする事例が報告されている。他にも、密封保存食品が関与する事例として、1993年に秋田県で発生した缶詰め里芋による事例や、1998年に東京都で発生したイタリア産瓶詰グリーンオリーブによる事例が報告されている。いずれも中途半端な加熱殺菌によって生き残った食品中の芽胞が、容器内で嫌気状態に置かれ、不適切な温度管理等の条件も加わることで発芽し、毒素が産生されたと考えられる。同ロット品の検査からは必ずしもボツリヌス菌が検出されないこともあり、汚染芽胞量が少なくても発芽条件が整うと毒素産生に至る可能性が高いと考えられる。

この傾向は国内だけではなく、近年、北米、欧州、アジアを中心に、キャロットジュース、ポテトスープ、チリソース、タケノコ、大豆加工食品等の缶詰、瓶詰、パック詰め食品による食中毒事例が報告されている。

(2) 乳児ボツリヌス症

1歳未満の乳児がボツリヌス芽胞を摂取後、腸管内で発芽・増殖し、産生された毒素を吸収することによって発症する感染型の疾患である。数日間から数週間の潜伏期を経て、便秘傾向に始まり、哺乳力低下、泣声微弱、無表情、脱力、頸部筋肉の弛緩によって首が据わらなくなること等の神経症状が出現する。治療は、呼吸管理及び栄養管理を主とした対症療法である。抗生物質の投与・抗毒素療法は基本的には実施しない。おおむね後



引用文献 [9, 14] より改変

図1 ボツリヌス菌毒素遺伝子複合体の遺伝子組成

は良好であり、致死率も食餌性ボツリヌス症に比べて低い。

本症は、1976年に初めて米国で報告された、比較的新しい感染症である。国内では、1986年に初めて千葉県で報告されて以来、現在までに31症例が報告されている(表1, 3)。1986～1987年にかけて、ハチミツを感染源とする症例が全国で相次いで10症例報告された。これらの毒素型は、判明しているものはすべてA型であった。当時の厚生省から、ハチミツを1歳未満の乳児に与えないように指導する通知が実施されたこともあり、その後はハチミツを感染源とする症例は発生しなくなった。

しかしながら2000年以降、感染源が特定されない症例が全国各地で散発的に報告されている。その毒素型はA型だけでなく、B型、C型、E型毒素産生性 *C. butyricum* と多様である。C型症例の報告は、世界的にもわが国での1症例のみである [4]。1歳未満の乳児が経口摂取するものの種類は限られているが、喫食残品、同ロット品、患者宅のハウスダスト等の検査からはボツリヌス菌が検出されず、感染源が特定できないことが多い。近年の事例で判明した感染源は、自家製野菜スープ、ミルクや白湯に使用していた自家用井戸水のみである。一般に、ハチミツに関連する患者は1～4カ月齢が中心であるのに対して、感染源不明の症例では6カ月齢以上の患者が多い傾向が見られる。

海外では、北米、欧州を中心に25カ国で患者の発生が報告されている [5]。最も患者数の多い米国では、年間約80～110症例が報告されている (National botulism surveillance (米国CDC) : http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism_surveillance.html)。米国での患者発生数の多さは、診断数を反映するものと考えられ、患者発生が報告されていない国・地域においても潜在的な患者が存在する可能性はある。海外では主な感染源として、ハチミツ以外に、コーンシロップ、ベビーフード、ハウスダストが原因と考えられる症例が報告されている。米国では2012年に、F型毒素産生性 *C. baratii* による感染源不明の乳児ボツリヌス症が相次いで報告され、わが国でも警戒が必要である。

(3) その他のボツリヌス症

創傷性ボツリヌス症は、患者の創傷部位に侵入した芽胞が発芽・増殖し、産生された毒素により発症する。欧米では麻薬中毒患者の注射痕からの感染事例が報告されている。

成人腸管定着性ボツリヌス症とは、1歳以上の子供と成人において、乳児ボツリヌス症と同様に腸管内でボツリヌス菌が定着、増殖して発症する現象である。外科手術や抗菌薬の投与によって患者の腸内細菌叢の破壊や菌交代現象が起こることが起因となると考えられる。いずれもこれまでに国内での患者発生報告例はない。

4 毒素サブタイプの分類

遺伝子解析技術の発達により、様々な由来のボツリヌス菌株の毒素遺伝子塩基配列が解読され比較されている(図1)。その中で、同一の毒素型間で毒素遺伝子の塩基配列が部分的に異なるサブタイプの存在が明らかになっている。サブタイプの定義は明確ではなく、塩基配列の比較のみで決められている場合もあれば[6]、産生毒素の抗原性や作用の違いを証明した場合もある[7, 8]。サブタイプ間のアミノ酸配列の相同性は63.8~99.0%である。現在、各毒素型は多種類のサブタイプ(A1~A7, B1~B7, C, C/Dモザイク型, D, D/Cモザイク型, E1~E11, F1~F7, G)に分類されている[9]。

A型菌及びB型菌では、サブタイプの分布に地理的な差異が見られる。A型菌の場合、北米ではA1, 南米ではA2, A3, 欧州ではA2が多く分離される。B型菌の場合、北米ではB1, 欧州及びアジアではB2, B4が多い傾向が見られる。サブタイプは分離株の疫学的な差異を反映し、国内外でのデータの相互比較が容易であることから、ボツリヌス症の疫学解析にも応用されている[10-12](表2, 3)。

国内の乳児ボツリヌス症において、1986~1987年に発生したハチミツ摂取を原因とする症例から分離されたA型菌は、すべてA2に分類され、これは当時の主なハチミツ輸入国の土壤中におけるA型菌のサブタイプ分布と一致している[10]。一方、1990年以降のハチミツ摂取歴のないA型症例分離株はA1及びA(B)に分類される。また、1995年から2011年にかけて散発的に発生したB型乳児ボツリヌス症の分離株は、B2, B5及び、世界的にもまれなB6に分類される[11]。国内のA型ボツリヌス食中毒事例分離株は、A1, A2, A(B)に分類される。また、1999年以降、A(B)型菌によるボツリヌス食中毒が5事例、乳児ボツリヌス症が8症例発生しており、それ以前と比べて著しく増加している。これらの事例では原因食品・感染源が判明していないことが多く、今後の発生動向への留意、輸入食品等も含めた監視が必要である。

ボツリヌス菌は、例外的に2種類の毒素を産生する菌が分離されている。この場合、産生量の多い毒素型を大文字で、少ない毒素型を小文字で表し(例: Ab, Ba), 2種類の毒素産生量がほぼ同等な場合は両方を大文字で示す(例: AB)。また、上述したA(B)は、B型毒素遺伝子が完全長でなく、不活性化毒素遺伝子を保有する場合に表記する。2013年には、G型毒素が発見されて以来、約40年ぶりとなる新型ボツリヌス毒素(H型毒素)産生菌が、米国の乳児ボツリヌス症患者から分離された[13]。この菌は、B型とH型毒素の2種類を産生する株(Bh型)であり、産生毒素は、A型~G型の抗

毒素血清に中和されなかった。また、二重免疫拡散試験、毒素アミノ酸配列比較からも、既存のA型~G型毒素とは異なる型であると考えられた。アミノ酸配列から軽鎖領域はF型毒素と類似し、重鎖C末端領域はA型毒素と類似している[14]。しかしながら、いずれの領域も毒素の中和とは関係ないことから新規の毒素型と判断された。H型毒素を単独で産生する株が発見されていないことから、複数の毒素を産生する株も含めて、今後、型別診断を行う際には慎重な配慮が必要である。

5 動物のボツリヌス症

わが国における動物のボツリヌス症は産卵鶏、プロイラーでのボツリヌス症が多発した時期もあったが、水禽類のボツリヌス症も散見されている。一方、牛のボツリヌス症は、古くから南アフリカ、南米、オーストラリアなどの地域で斃死した牛の体内で産生されたD型毒素を摂取して起こる疾病として知られていた。欧州ではサイレージ中に混入し斃死した小動物が毒素源とする発生や、サイレージの発酵不完全により産生された毒素による牛ボツリヌス症が報告されている[15]。しかしながら、毒素源を見いだせない症例も報告されており、発生原因の探求を困難にしているのが現状である[16, 17]。わが国では1994年北海道でC型菌による本症の発生があったが、2004年以降現在まで乳牛、肥育牛の区別なく散発的に全国的な発生が認められている。

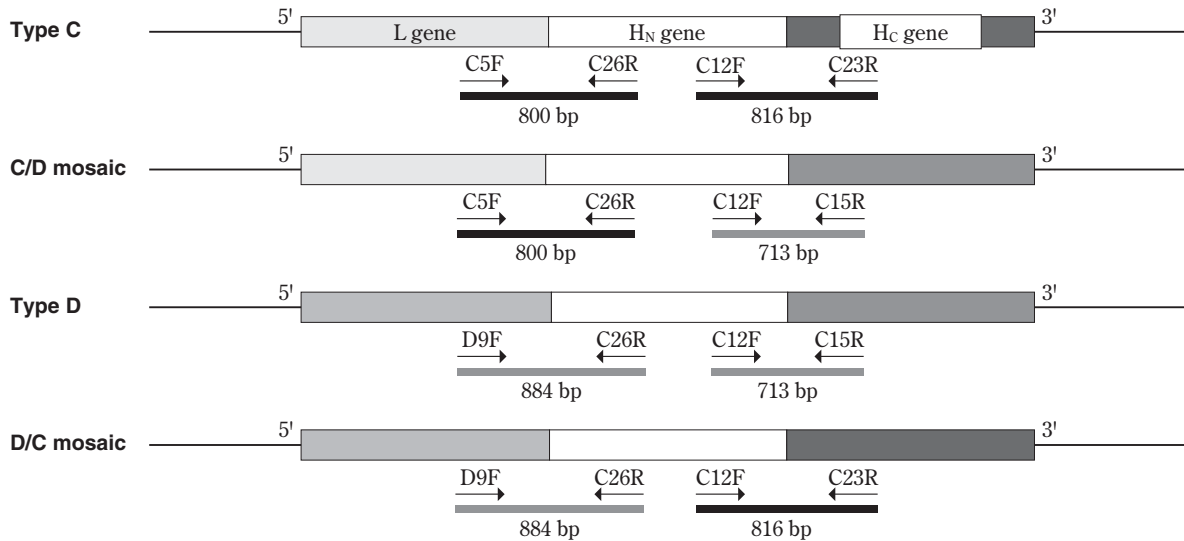
(1) C型及びD型毒素間の免疫学的交差性

C型及びD型毒素は他の型の毒素と比較し抗原類似性が高く、元来C型菌ではC α とC β の亜型が提案されていた。Jansen[18]は粗毒素標品を抗原として作成した抗毒素血清を用いた中和試験より、C α 亜型は3種類の毒素因子(毒素本体ではなく抗原因子と考えられる)、C1, C2及びD因子を産生し、C β 亜型ではC2のみ、D型菌はD及びC1因子を産生すると報告した。これらの知見は、C型とD型毒素間の免疫交差性を理解する上で貴重な知見であるが、その理由については不明であった。その後、多くの細菌毒素と同様にボツリヌス毒素遺伝子の解明も急速な進展が見られ、C型及びD型毒素遺伝子の解析過程でC, D型毒素の中に、重鎖C末端領域が相互に入れ替わったC・Dモザイク毒素(C/DあるいはD/C)の存在が報告された[19]。

(2) 鳥類ボツリヌス症由来菌の毒素の性状

鳥類ボツリヌス症の検体から菌を分離し、その毒素の型別を行ったところ、C型及びD型毒素の両抗血清で中和された。鳥類ボツリヌス症由来菌株の毒素遺伝子の解析から、すべての菌株の毒素遺伝子において重鎖C末端領域がD型神経毒素と非常に類似したC/Dモザイク構造を持つことが分かった。さらに、既報のC型、D型毒素遺伝子及び鳥類ボツリヌス症由来菌毒素遺伝子の塩基

ボツリヌス症



Location of primers within specified genes.

| Primer | Sequence | Location within gene | | | |
|--------|--------------------------------|----------------------|------------|-----------|------------|
| | | CB-19(C) | 003-9(C/D) | 1873(D) | OFD05(D/C) |
| C5F | 5'-ATAAAGCAATAGATGGTAGAT-3' | 1313-1333 | 1313-1333 | | |
| D9F | 5'-TTAATATAGAAAATTCGGGTCA-3' | | | 1217-1238 | 1217-1238 |
| C12F | 5'-GTTGGTGAAGTAGATAGATTTAAA-3' | 2476-2498 | 2476-2498 | 2464-2486 | 2464-2486 |
| C26R | 5'-TGAATCTTTCATCTCTTAA-3' | 2103-2112 | 2103-2112 | 2081-2100 | 2081-2100 |
| C23R | 5'-AACATTAGTATATTGCAAGCT-3' | 3271-3291 | | | 3259-3279 |
| C15R | 5'-TCTCTAATCCAAAGCATCTG-3' | | 3169-3188 | 3157-3176 | |

引用文献 [21] より改変

図2 C型, D型及びD・Cモザイク毒素遺伝子検出用プライマーとPCR産物

配列を参考に軽鎖, 重鎖C末端領域, 及び重鎖N末端領域内でそれぞれ各型に特異的な塩基配列をコードするプライマーを設計し, これらを4組のプライマーセット(C型NT遺伝子の上流と下流, 及びD型NT遺伝子の上流と下流)としてPCR反応を実施した(図2). その結果, 鶏, キジ, アイガモ, オシドリ, コサギなど鳥類ボツリヌス症由来菌株の持つ神経毒素遺伝子はPCRですべてC/Dモザイクであることが判明した[20]. これらの成績は, Jansenが報告したC α 重型の抗原性状を示していると考えられた.

(3) 牛ボツリヌス症由来菌の毒素の性状

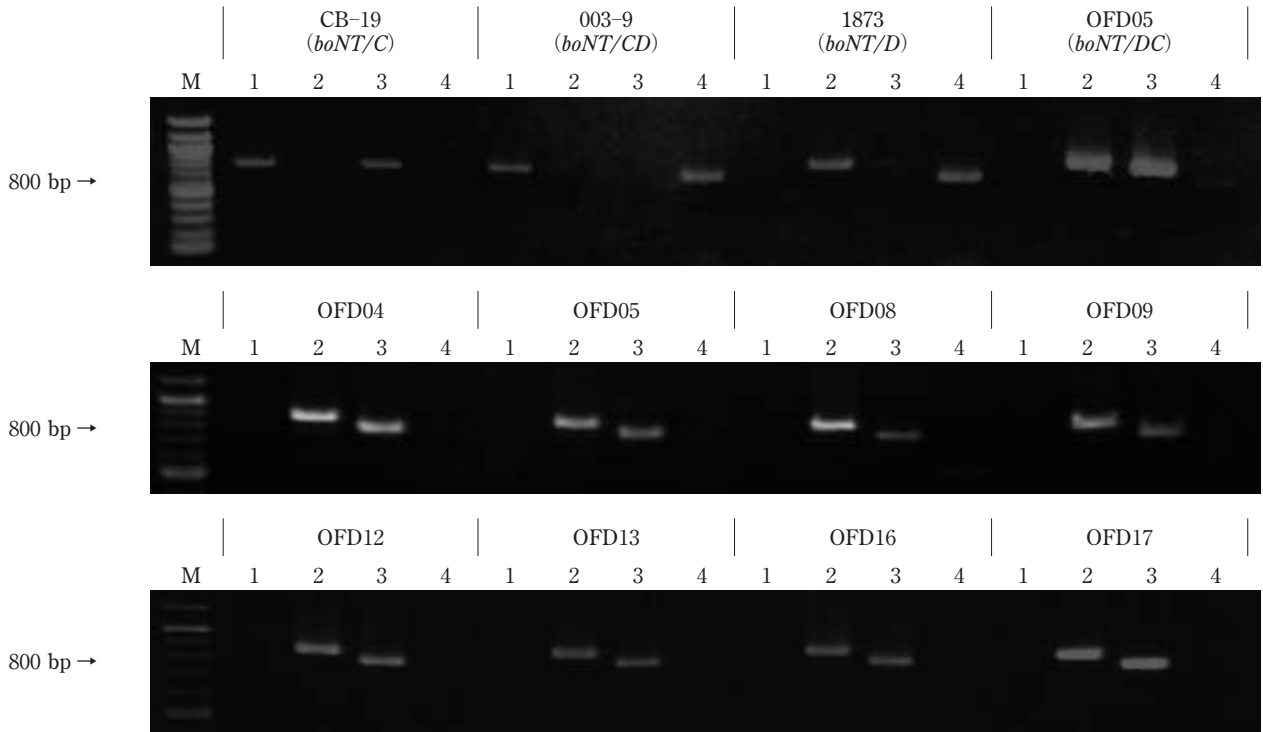
牛ボツリヌス症は乳牛, 肥育牛, 月例の区別なく発症する. 症状は38℃前後の低体温(発熱しない), 起立不能, 腹式呼吸が特徴的である. 子牛(2カ月齢程度)の発症は少なく, 発症から半日から2日の経過で死亡する牛が大半である. わが国における本症のすべてで毒素源が飼料などからは検出されておらず, 消化管内に侵入した菌が増殖し, 産生された毒素による疾病と考えられる.

牛ボツリヌス症由来菌の培養上清を用いて, マウス中和試験を行った結果, 毒素はD型抗毒素血清で完全に中和されたが, C型抗毒素血清でも致死時間が遅延する

ことから部分的な中和が認められた. 分離菌の保有する毒素遺伝子塩基配列を解析した結果, 重鎖C末端領域がC型神経毒素と非常に類似したD/Cモザイク構造を有していることが分かった. そこで, 従前のC/Dモザイク毒素遺伝子の検出に用いたPCR法を改良し, 典型的なC型, D型及び2種類のモザイク毒素遺伝子を判別するため, 各遺伝子に共通する部分と変異部分を組み合わせたプライマーセットを新たに構築して, 各神経毒素遺伝子の判別が可能なPCR法を開発した. このPCR法により種々の牛ボツリヌス症由来菌が保有する毒素遺伝子を調べ, すべてがD/Cモザイク構造を持つことが分かった[21](図3). さらに, 分離菌の全DNAを制限酵素Sac IIまたはNru Iで処理し, パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を行うと共に, 神経毒素遺伝子全長の塩基配列を決定した. Sac II・Nru Iいずれの場合もPFGEに基づく dendrogramにより分離菌は3つのクラスターに分類された(図4). D/Cモザイク毒素のアミノ酸配列は同一のPFGEパターンを示した株間で完全に一致した.

6 今後の課題

ボツリヌス症の発生は芽胞の地理的分布と関連性がある



M : molecular size marker (100 bp DNA ladder : BioLabs)

引用文献 [21] より

図3 PCRによるC型、D型及びD・Cモザイク毒素遺伝子の検出

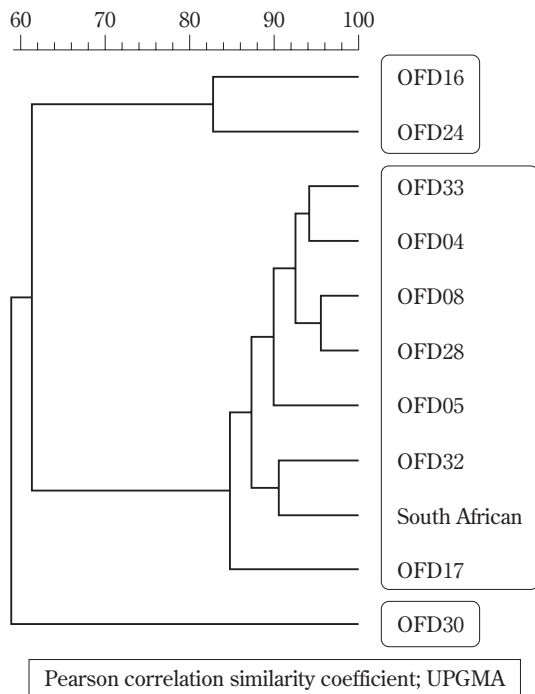


図4 DCモザイク神経毒素産生株のNru I処理によるPFGEに基づくデンドログラム

ると言われてきたが、乳児ボツリヌス症起因菌が示すように、わが国の多くの事例で、その発生源が探求されていないのが実状である。また、毒素遺伝子の解析が進むにつれて、数多くのサブタイプの存在が明らかになってきており、人のボツリヌス症に使用される治療用抗毒素

の効果をあらためて評価する時期にきている。家畜・家禽のボツリヌス症は、生産者に対して経済的な損失や消費者に対して食の安全に対する不安感を助長させることから、科学的な根拠に基づいた情報発信が必要である。しかしながら、ボツリヌス症の発生要因や毒素検出法の開発、原因毒素の性状解析などの科学的な知見が十分に集積されているとは言えない。このため、ボツリヌス症起因菌の産生する毒素の性状を迅速に検出・同定できる検査法の確立が必要と思われる。

引用文献

- [1] 小崎俊司：Clostridium botulinum, 食品由来感染症と食品微生物, 仲西寿男・丸山 務編, 中央法規出版, 456-468 (2009)
- [2] 中村信一：ボツリヌス菌の疫学, 日本食品微生物学会雑誌, 23, 1-5 (2006)
- [3] 上田 豊, 花原悠太郎, 阪本智宏, 松村 毅, 北村 勝, 百瀬愛佳, 朝倉 宏, 岡田由美子, 五十君静信, 岩城正昭, 加藤はる, 柴山恵吾：鳥取県で発生した国内5年ぶりとなる食餌性ボツリヌス症, IASR, 33, 218-219 (2012)
- [4] Oguma K, Yokota K, Hayashi S, Takeshi K, Kumagai M, Itoh N, Tachi N, Chiba S : Infant botulism due to Clostridium botulinum type C toxin, Lancet, 336, 1449-1450 (1990)
- [5] Koepke R, Sobel J, Arnon SS : Global occurrence of infant botulism, 1976-2006, Pediatrics, 122, e73-82 (2008)
- [6] Hill KK, Smith TJ, Helma CH, Ticknor LO, Foley BT,

- Svensson RT, Brown JL, Johnson EA, Smith LA, Okinaka RT, Jackson PJ, Marks JD : Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains, *J Bacteriol*, 189, 818–832 (2007)
- [7] Kozaki S, Nakaue S, Kamata Y : Immunological characterization of the neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type A associated with infant botulism in Japan, *Microbiol Immunol*, 39, 767–774 (1995)
- [8] Kozaki S, Kamata Y, Nishiki T, Kakinuma H, Maruyama H, Takahashi H, Karasawa T, Yamakawa K, Nakamura S : Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan, *Intect Immun*, 66, 4811–4816 (1998)
- [9] Hill KK, Smith TJ : Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes, *Current topics in Microbiology and Immunology*, 364, 1–19 (2013)
- [10] Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S : A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A gene cluster typing, *Microbiol Immunol*, 54, 308–312 (2010)
- [11] Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S : Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan, *J Clin Microbiol*, 47, 2720–2728 (2009)
- [12] 京塚明美, 築地裕美, 田内敦子, 佐藤真帆, 国井悦子, 坂本 綾, 伊藤文明, 橋本和久, 笠間良雄, 小林良行, 藤井裕士, 石川暢恒, 川口浩史, 中村和洋, 小林正夫, 藤井裕樹, 上野弘貴, 中村 毅, 山脇健盛, 松本昌泰 : 広島市で同時期に確認されたボツリヌス症2事例について, *IASR*, 33, 136–137 (2012)
- [13] Barash JR, Arnon SS : A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins, *J Infect Dis*, Epub ahead of print (2013)
- [14] Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS : Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene, *J Infect Dis*, Epub ahead of print (2013)
- [15] Notermans S, Dufrenne J, Oosterom J : Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism, *Appl Environ Microbiol*, 41, 179–183 (1981)
- [16] Bohnel H, Schwagerick B, Gessler F : Visceral botulism—a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 48, 373–383 (2001)
- [17] Smart JL, Roberts TA : Bovine botulism, *Vet Rec*, 101, 201–202 (1977)
- [18] Jansen BC : The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. Onderstepoort, *J Vet Res*, 38, 93–98 (1971)
- [19] Moriishi K, Koura M, Abe N, Fujii N, Fujinaga Y, Inoue K, Oguma K : Mosaic structure of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D organisms, *Biochim, Biophys, Acta*, 1307, 123–126 (1996)
- [20] Takeda M, Tsukamoto K, Kohda T, Matsui M, Mukamoto M, Kozaki S : Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism, *Avian Dis*, 49, 376–381 (2005)
- [21] Nakamura K, Kohda T, Umeda K, Yamamoto H, Mukamoto M, Kozaki S : Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan, *Vet Microbiol*, 140, 147–154 (2010)