

称号及び氏名 博士（獣医学）竹田 正人

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 3 1 日

論 文 名 「鳥類ボツリヌス症由来菌の産生する神経毒素の性状と
オイルアジュバントワクチンによる防御効果」

論文審査委員 主査 小崎 俊司
副査 馬場 栄一郎
副査 倉園 久生
副査 向本 雅郁

論文要旨

緒論

グラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌は芽胞形成能を持ち、土壌、河川・湖沼・海の泥中、あるいは動物の腸管などに広く分布している。菌は産生する神経毒素（NT）の抗原性の違いによりAからG型に分類されている。NTは毒素の型に共通して軽鎖（L）、重鎖N末端領域（H_N）および重鎖C末端領域（H_C）の機能の異なる 3 つのドメインから構成されている。人のボツリヌス中毒は主としてA、B、E、F型菌によって起こり、C、D型菌は鳥類や家畜のボツリヌス症の原因となることが知られている。元来、CおよびD型NT間で免疫学的交差性が高く、さらに、C型菌ではC α とC β の亜型が提案されていたが、それらの病原性と罹患動物との関係は不明であった。多くの細菌毒素と同様にNT遺伝子の解明も急速な進展がみられ、C型菌ではミンク由来株とウマ由来株NT遺伝子が非常に類似し、これらが典型的なC型菌NTであると考えられている。一方、C、D型NTにはH_C領域が相互に入れ替わったC・DモザイクNT（C/DあるいはD/C）の存在が報告されているが、ボツリヌス症発症における意義については解明が進んでいないのが現状である。また、これらのNTの存在がC、D型菌の型別を決定する際に混乱を生じさせている。

一般に芽胞に汚染された環境の浄化は非常に困難であり、クロストリジウム症の対策としてトキソイドワクチンが開発されている。鳥類ボツリヌス症に対してもミンク由来 C 型菌から作製されたトキソイドを用いたワクチンに関する研究が報告されている。しかし、使用されているアルミニウムゲルはアジュバント作用が比較的弱く複数回にわたるワクチン接種を必要とするため、捕獲の困難な鳥類では使用しにくい欠点がある。本研究では、

鳥類ボツリヌス症由来菌株の産生する NT の性状を詳細に検討することにより、哺乳動物由来菌とは異なる免疫学的、遺伝学的特徴を有することを明らかにした。さらに、鳥類ボツリヌス症に対して有効な免疫賦与方法を確立するために、養鶏産業界で実用化されているオイルアジュバントを用いた免疫方法を検討した。

第 1 章 鳥類ボツリヌス症由来菌の神経毒素遺伝子の性状

大阪府下の鳥類飼育展示施設でボツリヌス症を疑う症例が発生し、種々の検体から C 型と D 型の両抗血清で中和される毒素が検出された。これら症例の分離菌の産生する毒素も同様に C、D 型抗毒素で中和された。そこで鳥類ボツリヌス症由来菌株の持つ NT 遺伝子の解析を行った結果、すべての菌株の NT 遺伝子において H_C 領域が D 型 NT 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。塩基配列から推定されたアミノ酸配列を比較した結果、C 型 NT と C/D モザイク NT は、全長において 76 %、軽鎖 97 %、H_N 93 %、H_C 44 % の同一性を示した。また、C/D モザイク NT と D 型 NT のアミノ酸配列を比較すると、全長 70-71 %、軽鎖 49 %、H_N 72-73 %、H_C 92-94 % の同一性を示した。C/D モザイク NT を産生する菌株間において、同じアミノ酸配列を示すアイガモ、キジ、オシドリ由来株を C 型菌 6813 株と比較すると、軽鎖 2 残基、H_N 領域 2 残基の違いがみられた。ニワトリ由来株と 6813 株を比較すると、軽鎖 3 残基 H_N 領域 3 残基に対し、H_C 領域では 18 残基異なることがわかった。

C 型、D 型菌 NT 遺伝子の性状を容易に区別するために PCR による判別法を確立した。既報の C 型、D 型 NT 遺伝子および鳥類ボツリヌス症由来菌 NT 遺伝子の塩基配列を参考に遺伝子解析ソフトを用いて、軽鎖内、H_C 領域内、重鎖 N 末端 (H_N) 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 8 種類の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、および D 型 NT 遺伝子の上流と下流) として PCR を行なった。中和試験で C、D 型両抗血清で中和されたニワトリ、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 NT 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。

CB-19 株 (C 型)、003-9 株 (C/D モザイク) および 1873 株 (D 型) の精製 M 毒素をニワトリに静脈内投与し、その感受性を調べた。ニワトリは C 型毒素より C/D モザイク毒素に高い感受性を示した。D 型毒素に対しては耐性であることがわかった。

第 2 章 ELISA 法による免疫カモの抗体価測定とボツリヌス症罹患カモ類の診断

哺乳動物と比べて鳥類 IgG 間の免疫学的交差についてはよく調べられていない。そこでアイガモ、コサギ、ホオアカトキ、ニワトリの卵黄から精製し得られた IgG に対するウサギ抗 IgG 抗体を調製し鳥類 IgG 間の交差性を調べた。3 目 4 科 21 種の鳥血清を用いて交差反応の有無をゲル内沈降反応で調べた。各抗鳥 IgG 血清は同目の鳥血清と交差反応し、さらに抗アイガモ血清はキジ目であるニワトリ血清と、抗ニワトリ血清はカモ目の血清とも交差反応を示した。しかし、交差反応の程度が十分に判別できないため、精製ウサギ抗鳥 IgG 分画を用いた ELISA 法によって反応性を調べた。各抗鳥 IgG 抗体は同科の鳥 IgG との間

に強い交差反応性を示し、鳥類 IgG の特異性は科によって分類することが可能であることが示唆された。

003-9 株 NT を固相化抗原、ウサギ抗アイガモ IgG を二次抗体として、血中抗毒素抗体価（抗体価）を測定するための間接 ELISA 法を検討した。ボツリヌス症に罹患した後、治療により耐過したカモ科のオナガガモ 3 羽、ハシビロガモ 1 羽の抗毒素抗体の出現の有無を調べた。自然発生例では発症後 2 週間目に速やかに抗体が出現し 5 週間目には消失することがわかり、発症初期のボツリヌス症診断に有効であることが示唆された。また、高い抗体価が検出されたオナガガモの発症後 2 週間目の血清について、ウサギ抗ニワトリ、コサギ、ホオアカトキ IgG を二次抗体として用いた間接 ELISA 法では抗毒素抗体は検出できなかった。血中抗体を ELISA で検出するためには、同科の抗鳥 IgG を用いる必要があると考えられた。

第 3 章 鳥類ボツリヌス症に対するオイルアジュバントワクチンの有効性

芽胞に汚染された土壌の清浄化は非常に困難である。野鳥や放し飼い形式で展示する飼育鳥類に対するボツリヌス症対策としてワクチン接種が最も有効な方法と考えられる。そこで、養鶏産業界で実用化されているオイルアジュバントを用いたワクチンを利用した免疫方法を検討した。

C/D モザイク毒素の抗原特異性を確認する目的で、アイガモ抗 C/D モザイク抗毒素血清を用いて C 型、D 型および C/D モザイク NT に対する反応性をイムノブロッティングで調べた。抗 C/D モザイク抗毒素血清は C 型 NT の重鎖と軽鎖および D 型 NT 重鎖と反応したが、C/D モザイク NT に比べてその反応性が弱いことから、C/D モザイク毒素は C、D 型毒素とは異なる一定の特異性を持つことがわかった。さらに抗 C/D モザイク抗毒素血清の中和力価を生物学的製剤基準に準じて測定した。標準抗毒素として市販ヤギ標準 C 型および D 型抗毒素を、標準毒素として C 型 CB19 株、D 型 CB16 株および C/D モザイク 003-9 株 M 毒素を用いた。抗毒素存在下でマウスの半数が死亡する各毒素の毒素量を算出し、アイガモおよびウサギ抗 C/D モザイク抗毒素血清の力価を標準抗毒素に対する相対力価として求めた。C/D モザイク毒素を C 型および D 型の標準毒素とした場合、抗 C/D モザイク抗毒素血清の力価は C 型および D 型抗毒素に比べて非常に高い値を示したことから、C/D モザイク毒素は C および D 型毒素に対して独自の抗原特異性を持つことがわかった。

ワクチンとして C/D モザイクトキソイド（M 毒素）10 μg と 50 μg をサルモネラオイルアジュバントワクチンと混合し、それぞれ 4 羽のアイガモに接種した。対照群として 2 羽のアイガモにはオイルアジュバントワクチンのみを投与した。接種後 1 週間隔で採血し間接 ELISA 法により抗毒素抗体価の推移を調べた。また、標準 C 型抗毒素を標準抗毒素として用いてマウス中和法を実施し中和力価を測定した。間接 ELISA 法では抗毒素抗体価はワクチン接種後 2 週目にピークを示し、その後一定値で推移した。高用量トキソイド接種群と低用量接種群間では、1 週目に高用量接種群で速やかな抗体上昇がみられたが、2 週目以降は大きな差はみられなかった。一方、中和力価は徐々に上昇する傾向がみられ 5 週目が最も高

値を示した。5週目の中和力価は、高用量投与群が低用量投与群に比べ高値を示した。ワクチンの効果を確認するため、ワクチン接種後5週目に4アイガモiv LD₅₀相当量の003-9株M毒素を全羽に静脈内投与した。毒素投与実験では、非免疫対照群はすべて30時間以内に死亡したが、ワクチン接種群は高用量、低用量接種群ともに耐過した。

総括

1. 鳥類ボツリヌス症はC/Dモザイク毒素に起因することが示唆され、開発したPCR法はその診断に有効であると考えられた。
2. ニワトリはC/Dモザイク毒素に高い感受性を示したこと、抗C/Dモザイク毒素血清はC-Dモザイク毒素に対して特異性と高い相対力価を持つことから、鳥類ボツリヌス症を防御するにはC/Dモザイクトキソイドを用いて免疫する必要があると考えられた。
3. C/Dモザイクトキソイドを用いたオイルアジュバントワクチンの接種はアイガモにおいて抗体価と中和力価の上昇を促し、鳥類ボツリヌス症防御に有効であると思われた。
4. 間接ELISA法は免疫カモ類の抗体価測定に有効であるとともに、ボツリヌス症に罹患したカモ類の診断への適用が可能であることが示唆された。

本研究で検討したワクチン接種法はアイガモを代表としたカモ類では有効な予防法と思われる。しかし、検証期間が5週間と短いため長期にわたる抗体価と中和力価の推移を調べる必要がある。また、ボツリヌス症に罹患する鳥類は多種に渡り、そのIgGは各科で特異的であるため、それぞれの科に適用できる抗体価測定法についても確立することが重要である。さらに、鳥類の種類における毒素に対する感受性の差異についての検討も鳥類ボツリヌス症の解明に必要な課題と考えられる。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌は産生する神経毒素（NT）の抗原性の違いによりAからG型に分類されている。NTは毒素の型に共通して軽鎖（L）、重鎖N末端領域（H_N）および重鎖C末端領域（H_C）の機能の異なる3つのドメインから構成されている。人のボツリヌス中毒は主としてA、B、E、F型菌によって起こり、C、D型菌は鳥類や家畜のボツリヌス症の原因となることが知られている。多くの細菌毒素と同様にNT遺伝子の解明も急速な進展がみられ、C型菌ではミンク由来株とウマ由来株NT遺伝子が非常に類似し、これらが典型的なC型菌NTであると考えられている。元来、CおよびD型NT間で免疫学的交差性が高く、さらにH_C領域が相互に入れ替わったC・DモザイクNT（C/DあるいはD/C）の存在が報告されているが、これらモザイク型NTと鳥類、家畜のボツリヌス症における病原因子としての意義について解明が進んでいないのが現状である。芽胞に汚染された環境の浄化は非常に困難であり、本症の対策として種々のトキソイドを用いたワクチンに関する研究が報告されているが、複数回にわたるワクチン接種を必要とするため、捕獲の困難な鳥類では使用しにくい欠点がある。

本研究では、鳥類ボツリヌス症由来菌株の産生する NT の性状を詳細に解析し、哺乳動物由来菌とは異なる免疫学的、遺伝学的特徴を有することを明らかにした。さらに、鳥類ボツリヌス症に対して有効な免疫賦与方法を確立するために、オイルアジュバントを用いた方法を検討した。

第 1 章では、大阪府下の鳥類飼育展示施設で発生したボツリヌス症の検体から C 型と D 型の両抗血清で中和される毒素が検出された。分離菌の産生する毒素も C、D 型抗毒素で中和された。そこで鳥類ボツリヌス症由来菌株の持つ NT 遺伝子の解析を行った結果、すべての菌株の NT 遺伝子において H_C 領域が D 型 NT 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。C/D モザイク、C 型、D 型菌 NT 遺伝子を区別するための PCR 法を確立し、他の鳥類由来株 NT 遺伝子を調べ、すべての株が C/D モザイク遺伝子を有し、さらにニワトリは C 型毒素より C/D モザイク毒素に高い感受性を示すことを明らかにした。これらの結果から、鳥類ボツリヌス症は C/D モザイク毒素に起因することが示唆され、開発した PCR 法はその診断に有効であると考えられた。

第 2 章では、罹患鳥類の抗体検出を目的として、まず鳥類 IgG 間の免疫学的交差性を調べ、抗鳥 IgG 抗体は同科の鳥 IgG との間にもみ交差反応性があることを明らかにした。C/D モザイク NT を固相化抗原、ウサギ抗アイガモ IgG を二次抗体として、血中抗毒素抗体価(抗体価)を測定するための ELISA 法を検討した。ボツリヌス症に罹患した後、治療により耐過したカモ科のオナガガモ、ハシビロガモの抗毒素抗体の出現の有無を調べた。自然発生例では発症後 2 週間目に速やかに抗体が出現し 5 週間目には消失することがわかり、本 ELISA 法は発症初期のボツリヌス症診断に有効であることが示唆された。

第 3 章では、C/D モザイク毒素の抗原特異性をアイガモおよびウサギ抗 C/D モザイク抗毒素血清を用いて中和反応を指標に調べた。C/D モザイク毒素を C 型および D 型の標準毒素とした場合、抗 C/D モザイク抗毒素血清の力価は C 型および D 型抗毒素に比べて非常に高い値を示したことから、C/D モザイク毒素は C 型および D 型毒素に対して独自の抗原特異性を持つことがわかった。サルモネラオイルアジュバントワクチンと混合した C/D モザイクトキソイドをアイガモに接種し抗毒素抗体価の推移を調べたところ、ELISA 法では抗体価はワクチン接種 2 週目にピークに達し、その後一定値で推移した。一方、中和力価は徐々に上昇する傾向がみられ 5 週目が最も高値を示した。ワクチンの効果を確認するため、ワクチン接種後 5 週目に 4 アイガモ iv LD₅₀ 相当量の C/D モザイク毒素を静脈内投与した。毒素投与実験では、非免疫対照群はすべて死亡したが、ワクチン接種群は耐過した。これらの知見から、C/D モザイクトキソイドを用いたオイルアジュバントワクチンの鳥類への接種はボツリヌス症防御に有効であると考えられた。

以上の結果は、ボツリヌス菌 C 型菌の産生する毒素の性状と鳥類ボツリヌス症との関係を初めて明らかにした知見であり、さらにボツリヌス症に対する希少鳥類保護対策の面から有益な情報を提供し、感染制御学の研究領域に寄与することが大きいと考えられる。したがって、最終試験の結果と併せて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。