

称号及び氏名	博士(獣医学) 梅田 薫
学位授与の日付	平成22年3月31日
論文名	わが国で発生したA型およびB型乳児ボツリヌス症起因菌の 遺伝学的解析
論文審査委員	主査 小崎 俊司 副査 三宅 眞実 副査 山崎 伸二

論文要旨

緒言

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、耐熱性芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、強力な神経毒素 (BoNT)を産生する。本菌は毒素の抗原性の違いによりA型～G型の7型に分類されている。また、生化学的性状および*rRNA* 遺伝子の相同性から4つの群(第I群～第IV群)に分類することができるが、毒素型による分類とは一致しない。ヒトにボツリヌス症を引き起こすのはA, B, E, F, G型菌で、C, D型菌はトリや家畜などに中毒を引き起こす。一方A, B, C, D, E型毒素は、各型内で複数の subtype に分類されている。A型毒素は5種類の subtype (BoNT/A1～A5)に分類されるが、ほとんどの株はBoNT/A1もしくはBoNT/A2に属し、BoNT/A3、BoNT/A4およびBoNT/A5は各1株のみが報告されている。タンパク分解性(第I群)B型菌産生毒素は3種類の subtype (BoNT/B1～B3)に分類されるが、ほとんどの株はBoNT/B1もしくはBoNT/B2に属し、BoNT/B3は1株のみが報告されている。ヒトのボツリヌス症は発症機序により、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および成人腸管定着性ボツリヌス症に分けられるが、わが国では、1951年～2007年の間に24症例の乳児ボツリヌス症および117事例のボツリヌス食中毒の発生が報告されている。乳児ボツリヌス症は、初めての国内症例が報告された1986年から翌年にかけてハチミツを感染源とする10症例が連続して報告され、毒素型が調べられた7症例はすべてA型であった。その後当時の厚生省から乳児にハチミツを与えないよう指導する通達が出されたこともあり、ハチ

ミツを原因とする同症の発生は報告されなくなったが、1990年以降、感染源が不明なA型およびB型症例の発生が認められている。本研究では、発生動向が変化しつつあるわが国のA型およびB型乳児ボツリヌス症起因菌を中心に遺伝学的解析を行った。

第1章 A型ボツリヌス症分離株の分子疫学的解析

国内で発生した乳児ボツリヌス症分離株10株、ボツリヌス食中毒分離株4株に食品分離株等を加えた27株のA型菌について、BoNT/A subtypeを決定するとともに、*boNT/A* 遺伝子クラスター型別および制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE 解析を行った。*boNT/A* 遺伝子クラスター型別は、新たに構築した Multiplex PCR 法による BoNT/A subtype 遺伝子 (*boNT/A1*, *A2*) と無毒成分遺伝子 (*ha33*, *p47*) の検出により3種類の *boNT/A* 遺伝子クラスター型 (1, 2, 3) に分類した。1986年～1987年の乳児ボツリヌス症分離株7株と当時市販されていた南米産ハチミツ分離株は *boNT/A* 遺伝子クラスター2型に分類され PFGE パターンもよく類似しており、高い関連性が示唆された。1999年～2007年の同症分離株3株は *boNT/A* 遺伝子クラスター3型に分類されたが、このうち1999年広島県および2006年宮城県で発生した乳児ボツリヌス症分離株と1999年千葉県で発生した食中毒分離株 (*boNT/A* 遺伝子クラスター3型) は同一の PFGE パターンを示した。これらの3株は、他の制限酵素 (*Xho* I, *Sac* II, *Nru* I) を用いた PFGE パターンも同一であったため、遺伝学的に同一あるいは極めて関連性が高いと考えられた。以上の結果から、A型乳児ボツリヌス症分離株の遺伝子型は発生年代によって変化していることが分かった。輸入ハチミツを感染源とする1986年～1987年の事例と異なり、1999年以降のハチミツ非関連事例では食中毒事例との関連も示唆されたことから、今後は病型に関わりなくボツリヌス症対策として種々の食品についてリスク評価の必要があると考えられた。

第2章 B型乳児ボツリヌス症分離株の毒素遺伝子の解析

わが国のB型乳児ボツリヌス症は1995年に石川県で初めての発生が報告されて以来、10年間発生がなかったが、2005年、2006年に大阪府下で相次いで2症例が発生した。3症例ともハチミツ摂取歴がなく感染源は特定されていない。各症例分離株 (111株、Osaka05株、Osaka06株) に、米国での同症分離株や食品分離株等を加えた15株の第I群B型菌について、*boNT/B* 遺伝子の解析および制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE 解析を行った。Osaka05株およびOsaka06株の *boNT/B* 遺伝子塩基配列全長 (3,876 bp) を決定し、既知の *boNT/B* 遺伝子塩基配列とともに分子系統解析を実施した結果、Osaka05株の *boNT/B* 遺伝子は既存の第I群BoNT/Bの subtype に属さなかったため、新たなBoNT/B subtype であることが示唆された。Osaka05株とOkra株 (BoNT/B1株) および111株 (BoNT/B2株) との毒素アミノ酸配列の相同性は、96.2% および 98.5% であった。なお、Okra株と111株の相同性は95.7%である。BoNTは軽鎖(L)、重鎖N末端領域 (H_N)、重鎖C末端領域 (H_C) の3つの機能的ドメインに分けられるが、subtype間の毒素アミノ酸置換は H_C ドメインに集中していた。Osaka06株は111株と同じくBoNT/B2に分類された。米国での乳児ボツリヌス症分離株5株はすべてBoNT/B1に分類され、わが国での同症分離株とは subtype が異なっていた。食品分離株は豚肉分離株2株がBoNT/B1、ショウガ分離株およびハチミツ分離株がBoNT/B2に分類された。国内のB型乳児ボツリヌス症分離株3株のPFGE

パターンは明らかに異なっており、事例間の疫学的関連性は低いと考えられた。毒素遺伝子の多様性を利用してBoNT/B subtype遺伝子(*boNT/B1*, *B2*, *Osaka05*)を検出するMultiplex PCR法を確立した。本法はB型菌の分子型別に応用可能と考えられる。2007年にOkra株の*boNT/B*遺伝子が約150 kbpのプラスミド上に存在することが報告されたことから、供試菌株の*boNT/B*遺伝子の存在位置を確認した。その結果、BoNT/B1に属する10株中Okra株と食品分離株407株および米国の乳児ボツリヌス症分離株89E00061-2株がそれぞれ150 kbpおよび260 kbpのプラスミド上に、BoNT/B2に属する4株中111株が275 kbpのプラスミド上に、Osaka05株が280 kbpのプラスミド上に*boNT/B*遺伝子が存在していた。その他の株は染色体上に*boNT/B*遺伝子が存在したことから、BoNT/B subtypeと*boNT/B*遺伝子の存在位置とは関連しないことが示唆された。

第3章 Osaka05株が産生するB型毒素の抗原性の解析

前章で毒素遺伝子の分子系統解析から新たなBoNT/B subtypeであると考えられたOsaka05株の産生するBoNTの抗原性をBoNT/B1およびBoNT/B2と比較した。BoNT/B2はBoNT/B1と異なる抗原性を有し、その抗原決定基はH_Cドメイン上に存在することが明らかにされている。Osaka05株、Okra株(BoNT/B1)および111株(BoNT/B2)のリコンビナントH_Cドメイン(rH_C/Osaka05, rH_C/OkraおよびrH_C/111)をそれぞれpQE30ベクターで発現、精製し、これらのrH_Cに対する抗体を調製した。Sandwich ELISA法により各抗体のrH_C/Osaka05, rH_C/OkraおよびrH_C/111への反応性を比較した。抗rH_C/Osaka05抗体を用いたELISAでは、rH_C/111およびrH_C/Okraの反応性は有意に低く、rH_C/OkraはrH_C/111よりも低い反応性を示した。抗rH_C/Okra抗体を用いたELISAでは、rH_C/Osaka05およびrH_C/111は顕著に低い反応性を示した。抗rH_C/111抗体を用いたELISAでは、rH_C/Osaka05およびrH_C/Okraの反応性は有意に低く、rH_C/OkraはrH_C/Osaka05よりも低い反応性を示した。Osaka05株、Okra株および111株のPYG培地培養上清を用いたSandwich ELISAにおいても、rH_Cを用いた場合と同様の結果が得られた。以上の結果より、Osaka05株が産生するBoNT/Bの抗原性は、BoNT/B1およびBoNT/B2とは異なることが明らかになった。BoNT/Bアミノ酸配列の相同性から予想された通り、Osaka05株産生BoNT/BとBoNT/B1との抗原性の差異は、Osaka05株産生BoNT/BとBoNT/B2との差異よりも大きかった。他の供試第I群B型菌株についても*boNT/B*遺伝子塩基配列から決定したsubtypeと、PYG培地培養上清を用いたELISAの結果は一致した。

第4章 連続継代培養によるボツリヌスB型菌の毒素産生性への影響

ボツリヌス菌は毒素型や群によって生化学性状や毒素遺伝子の存在位置が異なるとされてきた。しかし第2章において、一部のB型菌では毒素遺伝子が大型プラスミドに存在することが明らかになった。本章では、B型菌における毒素遺伝子の存在位置と毒素産生性との関連をさらに調べるため、毒素遺伝子がプラスミドおよび染色体に存在するB型菌を連続継代培養し、毒素産生性および毒素プラスミドの安定性について検討した。毒素遺伝子がプラスミドに存在するB型菌4株(Okra株、111株、Osaka05株、89E00061-2株)および染色体に存在する2株(67B株、Osaka06株)を供試し、PYG培地を用いて37°C・嫌気下にて3~4日間隔で継代培養し、初代および10回、20回、30

回継代時に培養液の毒力(LD₅₀/ml)を測定した。また、各培養液をGAM-EY寒天培地に塗抹し、37°C・嫌気下にて培養後 10 コロニーを釣菌し、PCR法で毒素遺伝子の検索を行った。釣菌した菌株は適宜、PFGE、毒素産生性および生化学性状の確認を行った。毒素遺伝子がプラスミドに存在する 4 株の 30 回継代培養液の毒力は、初代培養液と比較して 1/100~1/1000 未満に低下していた。Okra株および 89E00061-2 株では、継代培養菌株はすべて毒素遺伝子を保有し、PFGEパターン、生化学性状ともに初代培養菌株と同一であり、毒素産生性が低下した原因は不明である。111 株およびOsaka05 株では、継代培養により毒素プラスミドが脱落した無毒株が分離されたが、Osaka05 株は 111 株と比較して分離頻度が低く、また毒素遺伝子を保有しながら毒素産生性が低下した株の出現は認められなかった。毒素遺伝子が染色体に存在する 2 株では、継代培養による毒力の変化および毒素遺伝子の脱落は認められなかった。B型菌において多彩な毒素産生性が生じる原因を究明するには、今後より詳細な解析が必要と考えられる。

総括

1. 新たな分子型別法として、迅速、簡便に A 型毒素遺伝子クラスター型別および B 型毒素 subtype 型別を行う Multiplex PCR 法を確立し、ボツリヌス症の疫学解析への応用を試みた。
2. わが国で発生した A 型乳児ボツリヌス症分離株の解析から、A 型菌では発生年代により遺伝子型が異なっていること、病型に関わりなく感染源や感染ルートを究明する必要があることが明らかになった。
3. わが国で発生した B 型乳児ボツリヌス症分離株の解析から、大阪市内で同症より分離された Osaka05 株が、遺伝学および免疫学的見地から新規 B 型毒素 subtype であることが示された。
4. 一部の B 型菌では毒素遺伝子が約 150~280 kbp の大型プラスミドに存在していることが分かった。それらの菌株では連続継代培養による毒素産生性の低下や毒素プラスミドの脱落が確認されたが、毒素プラスミドの安定性は菌株間で差異が見られた。

審査結果の要旨

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、耐熱性芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、強力な神経毒素 (BoNT)を産生する。本菌は毒素の抗原性の違いにより A 型~G 型の 7 型に分類されている。また、生化学的性状および rRNA 遺伝子の相同性から 4 つの群(第 I 群~第 IV 群)に分類することができるが、毒素型による分類とは一致しない。ヒトにボツリヌス症を引き起こすのは A, B, E, F, G 型菌で、C, D 型菌はトリや家畜などに中毒を引き起こす。一方 A, B, C, D, E 型毒素は、各型内で複数の subtype に分類されている。わが国では、1951 年~2007 年の間に 24 症例の乳児ボツリ

ヌス症および 117 事例のボツリヌス食中毒の発生が報告されている。乳児ボツリヌス症は、初めての国内症例が報告された 1986 年から翌年にかけてハチミツを感染源とする 10 症例が連続して報告され、毒素型が調べられた 7 症例はすべて A 型であった。その後当時の厚生省から乳児にハチミツを与えないよう指導する通達が出されたこともあり、ハチミツを原因とする同症の発生は報告されなくなったが、1990 年以降、感染源が不明な A 型および B 型症例の発生が認められている。本研究では、発生動向が変化しつつあるわが国の A 型および B 型乳児ボツリヌス症起因菌を中心に遺伝学的解析を行った。

第 1 章では、国内で発生した乳児ボツリヌス症分離株、ボツリヌス食中毒分離株に食品分離株等を加えた A 型菌について、BoNT/A subtype の同定と *boNT/A* 遺伝子クラスター型別および PFGE 解析を行った。*boNT/A* 遺伝子クラスター型別 (1, 2, 3) は、新たに構築した Multiplex PCR 法による BoNT/A subtype 遺伝子 (*boNT/A1*, *A2*) と無毒成分遺伝子 (*ha33*, *p47*) の検出により検討した。1986 年～1987 年の乳児ボツリヌス症分離株は *boNT/A* 遺伝子クラスター 2 型に分類されたが、1999 年～2007 年の同症分離株は *boNT/A* 遺伝子クラスター 3 型に分類された。

第 2 章では、B 型乳児ボツリヌス症分離株 (111 株、Osaka05 株、Osaka06 株) に、米国の分離株、食品分離株等について、*boNT/B* 遺伝子の解析および PFGE 解析を行った。Osaka05 株および Osaka06 株の *boNT/B* 遺伝子塩基配列から既知の *boNT/B* 遺伝子塩基配列と共に分子系統解析を行った結果、Osaka05 株 *boNT/B* 遺伝子は既存の subtype B1 および B2 ではなく新たな BoNT/B subtype であることが示唆された。Osaka06 株は 111 株と同じく BoNT/B2 に分類された。試菌株の *boNT/B* 遺伝子の存在位置を確認した結果、subtype B1 の Okra 株を含む 3 株で 150 kbp あるいは 260 kbp プラスミドに、subtype B2 に属する 111 株で 275 kbp プラスミドに、Osaka05 株で 280 kbp プラスミドに *boNT/B* 遺伝子が存在することを確認した。

第 3 章では、Osaka05 株の産生する BoNT の抗原性を BoNT/B1 および BoNT/B2 と比較するために、リコンビナント H_c (rH_c/Osaka05, rH_c/Okra および rH_c/111) を調製し、これらの抗体を作成した。Sandwich ELISA 法により各 rH_c の免疫学的交叉性を調べた結果、rH_c/Osaka05 は rH_c/111 および rH_c/Okra とは抗原性が異なることを明らかにした。さらに各 BoNT/B のアミノ酸残基の相同性から、BoNT/Osaka05 と BoNT/B1 との抗原性の差異は BoNT/B2 よりも大きいことが予想された。

第 4 章では、B 型菌における毒素遺伝子の存在位置と毒素産生性との関連をさらに調べるため、毒素遺伝子がプラスミドあるいは染色体上に存在する B 型菌を各々連続継代培養し、毒素産生能の安定性について検討した。毒素遺伝子が染色体に存在する菌株では、継代培養による毒力の変化および毒素遺伝子の脱落は認められなかった。毒素遺伝子がプラスミドに存在する菌株においては、すべて 30 回継代培養液の毒素産生量が初代培養液と比較して 1/100～1/1000 未満に低下していた。しかし、これらの原因については、継代培養中すべて毒素遺伝子を保有しながら、毒素産生性が低下する菌株、プラスミド脱落の程度により毒素産生性の程度の違いがみられる菌株が存在するなど多彩であった。この理由を明らかにするためには今後より詳細な解析が必要と考えられた。

以上の結果は、わが国で発生した A 型および B 型乳児ボツリヌス症起因菌の持つ遺伝

学的背景を明らかにし、A型乳児ボツリヌス症の原因菌の遺伝子型が発生年代により異なっていることを明らかにした。また、B型乳児ボツリヌス症起因菌が新規の subtype に分類できることを示すと共に、一部のB型ボツリヌス菌の毒素遺伝子が大型プラスミドに存在すること、その安定性は菌株間で差異が認められることを明らかにした。本論文の成績は、わが国における乳児ボツリヌス症の発生に対する対策に有用な知見を提供するものであり、獣医感染症学ばかりでなく公衆衛生学分野にも大きく貢献すると考えられる。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。