

食水系感染症病原体の検査法 - 10

ボツリヌス

こ ぎき しゅん じ こう だ とも こ
 小 崎 俊 司 : 幸 田 知 子
 Shunji KOZAKI Tomoko KOHDA

I. 病原体

1. 病原体

ボツリヌスはボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が産生する毒素によって起こる疾病の総称であり、「感染症法」ではボツリヌス症として4類感染症に分類されている。ボツリヌス症は古典的な毒素型食中毒であるボツリヌス中毒以外、主として6カ月未満の乳児の消化管に取り込まれた芽胞が発芽、増殖し毒素を産生することにより起こる乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症、成人腸管定着性ボツリヌス症がある。

わが国ではE型菌による食中毒が最も多いが、最近、散発的にA型あるいはB型菌による乳児ボツリヌス症が発生し、またE型以外の型のボツリヌス中毒の事例も認められる。ボツリヌス菌は偏性嫌気性グラム陽性の桿菌で耐熱性芽胞を形成する。本菌は産生する毒素の抗原性の違いによりA～G型の7型に分類され、毒素産生性があることが分類上の基本となっている。そのため、毒素型は菌の生化学的な性状とは一致しないが、蛋白分解性や糖分解性などにより4群に分類することができる。第I群菌にはすべてのA型菌とタンパク分解性B、F型菌が属し、最も耐熱性の高い芽胞を形成する。第II群にはすべてのE型菌と蛋白非分解性のB、F型菌が属している。第III群菌にはC、D型菌が属している。この群に属する菌は他の群の菌と比べて高い嫌気条件を要求する。第IV群菌としてG型菌のみが属しているが、遺伝学的な相同性から *C. argentinense* の名称が提案されている。欧米で発生した乳児ボツリヌス症の分離菌の中で、ある種の *C. butyricum*、*C.*

baratii がそれぞれE、F型と非常に類似した毒素を産生することも明らかになっている。

2. 疫学

ボツリヌス食中毒の発生は芽胞の分布と関係がある。わが国では117事例が報告されているが、1951年北海道で起こった「ニシンのいずし」によるE型中毒が最初であり、大部分(104事例)が北海道、東北地方で発生したE型菌によるものである。実際、これら地域の沿岸でE型菌が高頻度で分布していることと一致する。その他、A型9事例、B型3事例、型別不明1事例の発生がある。1986年、わが国で初めて確認された乳児ボツリヌス症は、これまで24事例報告され、毒素型はA型(16例)、B型(3例)、C型(1例)、E型(*C. buryicum*、1例)および不明(3例)である。発生初期は蜂蜜の摂取歴が多く見られたが、現在では原因が不明な事例が多い。

食品中で菌が増殖し毒素を産生するためには、温度、pH、水分活性(A_w)、酸化還元電位などの種々の要因を必要とする。原因食品の多くは保存食品、発酵食品であり、わが国では「いずし」に代表される水産物食品があげられる。米国では家庭内で保存食として調理された瓶詰の野菜、果実などの摂取で中毒が多い。ヨーロッパでは塩漬あるいは発酵した肉製品による中毒が多い。1969年宮崎県で発生した中毒は、E型以外の初めての症例でB型菌が原因である。喫食者65名、患者21名、死者3名の事例で推計学的に原因食品として西ドイツ産キャビアと考えられている。1984年熊本県名産の真空包装詰辛子蓮根で患者36名、死者11名の広域大規模食中毒が発生した。本事例は本邦で初めてのA型中毒であり、製品の大部分からA型菌が、半数からA型毒素が検出された。辛子粉がA型芽胞の汚染源

食水系感染症病原体の検査法 - 10

と考えられたが、製造工程における熟成および加熱処理、真空包装などの諸条件が重なったためと考えられている。わが国ではA型、B型菌は自然界からほとんど検出されていないため、輸入食材への対応が必要と考えられる。

3. 臨床症状

ボツリヌス食中毒の症状は通常12～72時間後に出現するが、14日後に発症した例もある。一般的には潜伏期が短いほど重篤な症状を示すことが多い。E型中毒の場合、特徴的な神経症状が出現する前に嘔気、嘔吐を呈することがある。脱力感、倦怠感、めまい等の症状が現れ、さらに視力障害（弱視、複視、眼瞼下垂）、発声困難、嚥下困難、口渇、嗄声が現れる。消化器症状としては、一時的な下痢に続く重度の便秘、腹部膨満、腹痛が見られる。他の症状としては、尿閉、血圧低下が見られる。筋麻痺も著明で握力低下、歩行困難になる。体温は正常で意識は明瞭である。死亡の原因は呼吸失調による。

乳児ボツリヌス症の症状は便秘に始まり、飲乳減弱、脱力感、嗜眠、嚥下困難が見られる。首の座りが悪く、泣き声が弱いことも顕著な症状である。これらの症状は長期間持続し、6週間あるいはそれ以上続くこともある。無症状の乳児から時々ボツリヌス菌が分離されたりするので症状の程度は非常に多様である。ボツリヌス食中毒の治療の原則は消化管からの毒素の排除と呼吸の確保である。治療として抗毒素の投与と対症療法が行われる。抗毒素の投与は症状にもよるが、なるべく早期に静脈内、または筋肉内、あるいは点滴注射する。わが国では発生頻度の高いE型に対する単価ウマ抗毒素および多価（A、B、E、F型）ウマ抗毒素の入手が可能である。乳児ボツリヌス症の治療の基本は人工呼吸を含む対症療法である。原則的には抗生物質やウマ抗毒素の投与は行わない。

II. 検査法

1. 毒素の検出と菌分離

ボツリヌス症（食中毒、乳児ボツリヌス症）の疑

いがある場合には、検体として入手した患者血清、糞便、原因食品から毒素の検出および毒素の型別を行うことが菌の分離より優先される。乳児ボツリヌス症が疑われる場合には、ベビーフード、ハウスダスト、屋内外の土等も検査対象とする。検体の希釈液（0.2%ゼラチン含有0.4%リン酸ナトリウム溶液、pH 6.2）には必要に応じて、300U/mlペニシリンと0.5mg/mlストレプトマイシンを添加する。原因食品および培養液はトリプシン処理により毒素を活性化することが望ましい。毒素の検出および型別にはマウス接種試験法が広く用いられている。検体あるいは培養液を適宜希釈し、マウス腹腔内に接種後、4日間生死を観察する。毒素が検出された場合には、診断用抗毒素血清を用いた中和試験を行う。使用する抗血清はD型以外、1U/mlに希釈する（D型は10U/ml）。抗毒素と検体（毒素）を等量混合後、0.5mlをマウス腹腔内に接種し、どの型の抗毒素がマウスを生残させるかを観察する。中和反応が不完全な場合は検体をさらに希釈する方が望ましい。免疫学的検出法（ELISA、凝集反応など）が報告されているが、市販までには至っていない。感度、特異性を検討することにより、動物代替法としては今後期待される方法でもある（図1）。

検体を直接培地に接種する場合もあるが、乳剤化した検体を低速で遠心分離（500 \times g、10分間）し、粗い夾雑物を除去した後、上清を高速で遠心分離（2,400 \times g、20分間）し、沈殿物を培地に接種するこ

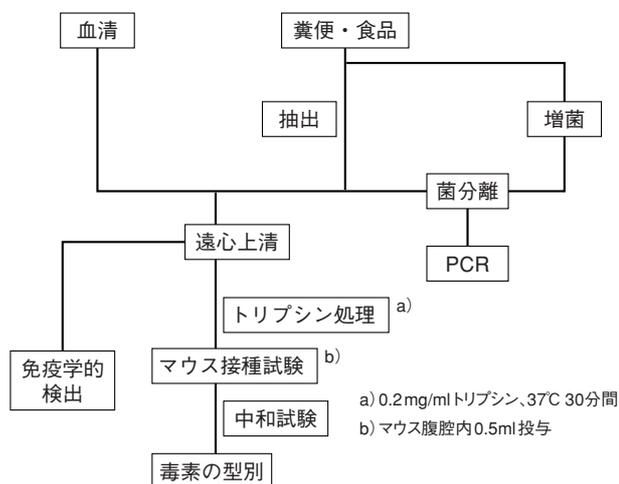


図1 ボツリヌス毒素の検出・型別と菌分離の概念図

とにより検出率が向上する場合がある。すべての型の菌に最適な培地、培養法はない。第Ⅲ群菌以外の増菌には0.3%グルコースを添加したクックドミート培地が用いられる。芽胞の発芽を促進するために0.2%可溶性澱粉を加えることもある。第Ⅲ群菌には炭酸カルシウムと硫酸などを含む強化クックドミート培地が適しているが、他の菌群はこの培地では毒素産生が悪い。検体を培地に接種後、80℃10分間加熱（E型菌は65℃）することは発芽を促進する効果があるが、一般には加熱、非加熱両方の条件で増菌培養を行う。培養は第Ⅰ、Ⅱ群菌は30℃、第Ⅲ、Ⅳ群菌は37℃で2～4日間行い毒素産生の有無を確認する。分離培地としてGM寒天またはCW寒天培地が適している。滅菌後、最終濃度が5%になるように卵黄を加える。第Ⅲ群菌に対しては、GM寒天培地調製時に0.1%システインを加えpHを再調整する。培地作成後、嫌気および乾燥条件下で一晩放置し、培地表面を十分に乾燥させることが必要である。毒素産生が確認された培養液を寒天培地に塗布し、30℃あるいは37℃（第Ⅲ群菌）で2日間嫌気培養を行う。嫌気培養にはアネロパック®・ケンキ（三菱ガス化学）が簡便である。ボツリヌス菌は不定形の集落を形成するが、リパーゼを産生するため集落周辺に限局して特徴的な真珠様光沢が見

られる（写真1）。集落を釣菌してクックドミート培地に接種し培養後、毒素産生を確認する。

2. 遺伝子検出法

①毒素遺伝子の特性

最近、動物試験に代わる方法として遺伝学的検査が数多く報告されている。しかし、毒素遺伝子配列が明らかになるにつれて、同じ毒素型間で神経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も明らかになっている。A型菌には5つのサブタイプがあるが^{1,2)}、わが国ではA1およびA2サブタイプの存在が明らかになっている⁵⁾。また、A型菌にはB型神経毒素遺伝子の部分断片をサイレント遺伝子として保有している菌が多数認められることから、それらの判別も考慮する必要がある²⁾。B型菌は4つのサブタイプ（第Ⅱ群菌の蛋白非分解性B型菌を含む）があり、わが国ではB2サブタイプに加えて新規のサブタイプが分離されている⁴⁾。C型およびD型菌間では神経毒素C末端側が他方の型に置き換わったC/DあるいはD/Cモザイク神経毒素が、鳥類あるいは牛ボツリヌス症の原因菌から産生される³⁾。これらのサブタイプ間の主要な変異は神経毒素遺伝子の3'末端側（神経毒素重鎖C末端側）に認められることから、使用するプライマーの性状を

A型菌（62A株）



C. butyricum (KZ1885株)

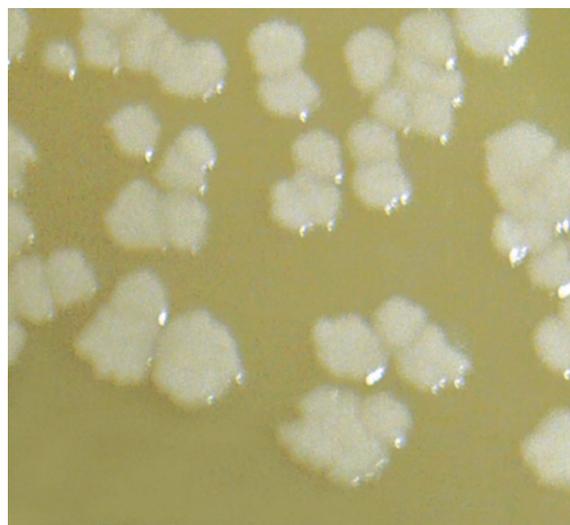


写真1 ボツリヌス菌および毒素産生性 *C. butyricum* の GAM 寒天平板上の集落

A型菌は比較的円形の集落を形成するが、ブチリカム菌はE型菌と同様に扁平であるのが特徴である。KZ1885株は金沢大学中村先生から分与を受けた中国食中毒分離株である。

食水系感染症病原体の検査法 - 10

十分把握した上で遺伝学的検査を行う必要がある。

② PCR 法

DNA の抽出は通常の方法によって行うことが可能である。しかし、市販のキットを用いて行う方が安定した結果が得られる。クックドミート培地に菌を接種後、30℃あるいは37℃（第Ⅲ群菌）で2日程度培養を行い、さらに0.1%システイン添加BHI培地で18時間培養を行う方がよい。培養液の遠心沈殿物からDNeasy tissue kit（キアゲン）を用いてDNAを抽出する。このDNAを鋳型にしてPCRを行い、その産物を電気泳動で確認する。合成プライマーは市販（タカラバイオ）されているが、神経毒素遺伝子上流の軽鎖領域を検出するように設計されており、型別は可能であるがサブタイプの選別には

向かない⁶⁾。わが国で発生したヒトおよび家畜・家禽のボツリヌス症起因菌の持つA～D型菌神経毒素遺伝子および、各型サブタイプの型別を可能にする multiplex PCR法は報告されているので、使用するプライマー、PCR条件については各論文を参照されたい³⁻⁵⁾。

文 献

- 1) Dover, N., et al., J. Clin. Microbiol. **47** : 2349-2350, 2009.
- 2) Hill, K. K., et al., J. Bacteriol. **189** : 818-832, 2006.
- 3) Nakamura, K., et al., Vet. Microbiol. **140** : 147-154, 2010.
- 4) Umeda, K., et al., J. Clin. Microbiol. **47** : 2720-2728, 2009.
- 5) Umeda, K., et al., Microbiol. Immunol. **54** : 308-312, 2010.
- 6) Takeshi, K., et al., Microbiol. Immunol. **40** : 5-11, 1996.