

ボツリヌス毒素に対する カビ毒吸着剤の吸着作用

▼大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医学専攻獣医感染症学教室

幸田知子, 中村佳司, 向本雅郁

ボツリヌス症とは

ボツリヌス菌(クロストリジウム ボツリヌス)はグラム陽性偏性嫌気性桿菌で、芽胞の形で自然界に広く分布している。本菌は産生する毒素により極めて致死性の高い弛緩性の神経麻痺を呈するボツリヌス症を引き起こす。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。ヒトのボツリヌス症は A, B, E 型菌により起こり、稀に F 型の事例が報告されている。家畜・家さんのボツリヌス症は、主として C 型および D 型菌が原因とされ、鳥類ボツリヌス症と牛ボツリヌス症の発生が全国的に認められる。

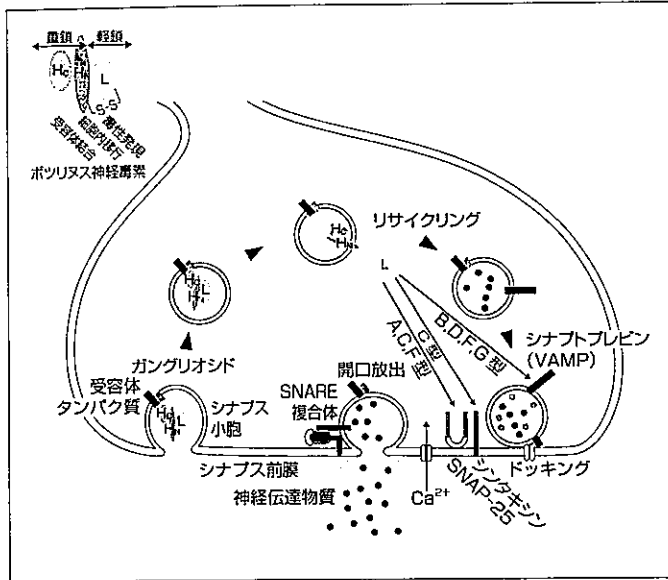
毒素作用機序

ボツリヌス毒素は、菌体内で分子量 150 kDa の神経毒素と無毒成分の複合体毒素として、菌体が溶菌する際に放出される。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をしており、無毒成分は神経毒素を胃酸やペプシンなどの消化酵素による分解から保護し、腸管上皮細胞への神経毒素の吸収を促進する役割を担っている。小腸から吸収後、神経毒素は無毒成分と解離し、神経筋接合部や自律神経に作用すると考えられている。解離後、蛋白分解酵素により解裂が生じ、重鎖と軽鎖の 2 本鎖がジスルフィド結合した構造に変化する。神経毒素は 3 つの機能的に異なるドメインから構成されている¹⁾。軽鎖は細胞質内での毒性発現活性、重鎖 N 末端領域(H_C)は細胞内移行

に関わる活性、重鎖 C 末端領域(H_C)は受容体への結合活性を有している。H_Cを介してシナプス前膜の受容体に結合し、エンドサイトーシスにより神経細胞内に侵入する。エンドソーム内の酸性化に伴い、H_Cの構造変化と H₃によるエンドソーム膜のチャネル形成により、軽鎖が細胞内に移行する。軽鎖は亜鉛依存性の蛋白分解酵素活性を有し、毒素型特異的な SNARE タンパク質を切断することにより、シナプス小胞のシナプス前膜への融合が阻止され、神経伝達物質放出障害が起こると考えられている(図-1)²⁾。

発症機序

ヒトの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³⁾。我が国では食餌性ボツリヌス症と乳児ボツリヌス症の発生が見られている。食餌性ボツリヌス症は食品内で産生された毒素を経口的に摂取することにより発症する。1 日から数日間の潜伏期を経て、下痢、腹痛がみられた後、ボツリヌス毒素の麻痺作用による眼瞼下垂、嚥下困難や呼吸困難などの神経症状が出現する。治療にはウマ血清を用いた抗毒素療法が用いられる。他の食中毒と比較して致死率は高いが、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。乳児ボツリヌス症は 1 歳児未満の乳児がボツリヌス菌の芽胞を摂取後、腸管内で発芽・増殖し、産生された毒素により発症する。数日から数週間の潜伏期を経て、便秘傾向になり、哺乳力低下、無表情、首が据わらなくなるなどの神経症状が出現する。



SNARE 複合体：SNAP-25，シンタキシン，シナプトブレビン

【表-1】 我が国における牛ボツリヌス症発生状況

事例	発生地域	発生年	用途	死豚 / 飼養	死亡率*
1	A	1994	乳用	52/58	90%**
2	B	1998	肥育	4/150	3%**
3	C	1999	肥育	28/42	67%**
4	C	2004	肥育	17/550	31%
5	D	2005	肥育	80/700	11%
6	E	2005	肥育	33/250	13%
7	F	2005	肥育	127/140	91%
8	G	2005	乳用	4/52	8%
9	H	2005	乳用	35/130	27%
10	I	2006	乳用	37/51	73%
11	J	2006	肥育	4/160	3%
12	E	2007	肥育	35/130	27%
13	E	2008	乳用	未確認	
14	K	2009	不明	未確認	
15	B	2009	肥育	14/100	14%
16	E	2009	乳用	未確認	
17	B	2010	肥育	61/1040	6%
18	I	2010	乳用	56/58	88%
19	F	2011	肥育/乳用	18/426	4%
20	I	2011	肥育	13/501	3%
21	B	2011	肥育	1/26	4%
22	B	2012	肥育	4/143	3%
23	L	2012	肥育	53/78	68%
24	C	2013	乳用	8/63	13%
25	M	2013	不明	3/?	
26	I	2014	乳用	8/17	47%
総死豚頭数				676	

* : 検査依頼を受けた農場の発生報告より
** : 報告のみ

【図-1】 ボツリヌス毒素の作用機構

抗菌剤投与や抗毒素療法は基本的に実施しない。致死率は食餌性ボツリヌス症に比べて低い。

鳥類ボツリヌス症は1910年前後に北米やオーストラリアで野生のカモや水鳥の死亡が発生し、土壌や水、水鳥の体内からボツリヌスC型菌が発見され、死因はC型菌の産生する毒素であると報告されたのが最初である。日本における鳥類ボツリヌス症はニワトリ、アイガモ、ニホンキジなどで散発的な発生が確認されている。罹患した鳥は毒素による神経麻痺で特徴的な頸部麻痺を起こして頭部を地面に垂れ下げる軟頸症(limberneck 症状)を呈し、死に至る。発生機序については、土壌などから経口的に摂取されたボツリヌス菌芽胞が消化管、特に盲腸内で発芽・増殖して毒素を産生し、腸管から吸収され、血中に移行し、体内に蓄積されて発症するとされている。また、ボツリヌス症罹患動物あるいはその死体で産生された毒素を蛆が摂取し、その蛆が鳥が摂取することで発症する報告もある。従来、鳥類ボツリヌス症の原因毒素はC型毒素であるとされてきたが、近年、神経毒素遺伝子の解析により鳥類ボツリヌス症由来株の神経毒素はすべて、H_CがD型と非常に類似したC/Dモザイク構造を有している⁴⁾。

牛ボツリヌス症は欧州においてサイレージ中に混入し、斃死した小動物を毒素源とする発生や、サイレージの発酵不完全が原因で産生された毒素により発生したという報告がある⁵⁾。我が国では2004年以降、乳牛・肥育牛および月齢の区別なく散発的な発生が現在も続いている(表-1)。

牛ボツリヌス症の症状は38℃前後の低体温、起立不能、腹式呼吸が特徴である。発症後、半日から2日の経過で死亡する牛が大半である。我が国で発生したボツリヌス症のすべてで、飼料などから原因菌が検出されていないことから、乳児ボツリヌス症のように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ている。実際、発生農場で生残した見かけ上は健康と思われる牛から毒素と菌が長期間排泄されることが確認されており、罹患牛が糞便中に排菌することにより、同一農場内で水平伝搬が起こる可能性が示唆されている。分離菌の保有する毒素遺伝子の塩基配列を解析した結果、ほとんどの菌において、神経毒素遺伝子のH_CがC型神経毒素遺伝子と非常に類似したD/Cモザイク構造を有している⁶⁾。

ボツリヌス毒素の毒力は非常に強く、マウス腹腔内注射法による毒素活性は10⁷～10⁹(ip LD₅₀/mg protein)で、牛ボツリヌス症のD/Cモザイク構造毒素が最も高い毒素活性を示し、pg単位で全身麻痺と呼吸困難で死亡する(表-2)。

カビと吸着剤について

フザリウム属やアスペルギルス属などのカビが産生するカビ毒に汚染された飼料を家畜が摂取すると、カビ毒の影響によって生産性が低下する。また、高い汚染度の場合、乳などの畜産物へ残留し、ヒトへの健康被害が懸念されるため、世界的規模で重要な課題となっている。カビ毒の毒

【表-2】 ポツリヌス毒素の毒性比較(マウス致死活性)

毒素	由来	菌株名	毒素活性 (ip LD ₅₀ /mg protein)
D/C モザイク	ウシ	OFD05	1.1 × 10 ⁹
D 型	不明	1873	2.8 × 10 ⁸
C/D モザイク	ニワトリ	003-9	6.2 × 10 ⁷
C 型	ミンク	CB-19	5.4 × 10 ⁷
A 型	ヒト	62A	1.1 × 10 ⁸
B 型	ヒト	Okra	1.2 × 10 ⁸

性も非常に強く、細胞毒性、免疫毒性、生殖毒性を有し、微量な濃度で家畜に影響を及ぼす。飼料安全法により主要なマイコトキシンの規制値が設けられており、乳牛用配合飼料のアフラトキシン B1 は 10 μg/kg (0.01 ppm) である。しかし、近年の研究より、低濃度であっても複数のカビ毒の相乗作用によって、単独のカビ毒濃度の 1/10 量で毒性を示すなど、カビ毒同士の相互作用が明らかになってきている⁷⁾。

カビ毒に対する予防方法として、鉱物系や酵母系などを原料としたカビ毒吸着剤を飼料に添加する方法が一般的に行われている。1988 年に Phillips らが粘土のカビ毒との結合特性を明らかにし、家さんなどのアフラトキシン症の予防に有効であることなど数多く報告されている^{8,9)}。

本稿では、極微量で発症し高い致死率を示すポツリヌス毒素に対するカビ毒吸着剤の吸着作用に関する検証について紹介する。

カビ毒吸着剤の検討

市場には数多くのカビ毒吸着剤が市販されており、大きく区別すると、鉱物系原料のみの吸着剤と鉱物系と酵母系原料を組み合わせた吸着剤がある。はじめに、カビ毒吸着剤の一般的使用目的がカビ毒対策であることから、生産現場で多く利用されている異なるタイプのカビ毒吸着剤(表-3)を用いて、アフラトキシン B1, ゼアラレノン, デオキシニバレノール(DON)に対する吸着作用を *in vitro* 試験にて評価した。

試験方法は、各カビ毒をアセトニトリル液で溶解後、リン酸緩衝液 pH 3.0 または pH 6.0 に終濃度 3 ppm になるよう添加した。カビ毒吸着剤は各製品の推奨濃度になるように

【表-3】 各カビ毒吸着剤の主原料

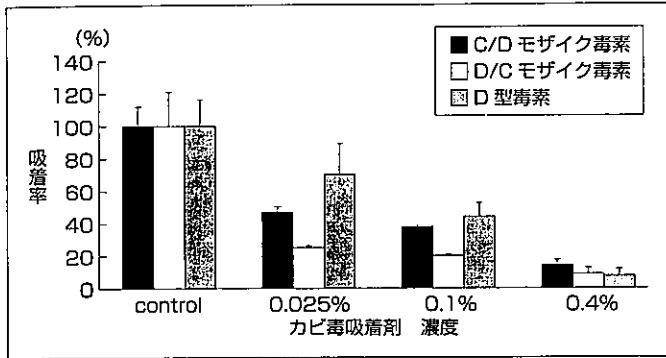
	A 製品	B 製品	C 製品	D 製品
吸着作用主原料	鉱物系	鉱物系	鉱物系	酵母細胞壁
		酵母細胞壁	乾燥酵母	鉱物系

製品中に含まれる割合の高い原料が上段

【表-4】 各種カビ毒吸着剤のカビ毒吸着率の比較

	カビ毒吸着剤 添加量	アフラトキシン B1		ゼアラレノン	
		pH 3.0	pH 6.0	pH 3.0	pH 6.0
A 製品	50 mg / 10 mL (0.5%)	98.1%	98.6%	28.4%	15.3%
B 製品	10 mg / 10 mL (0.1%)	98.6%	99.8%	53.3%	44.5%
C 製品	10 mg / 10 mL (0.1%)	98.6%	99.6%	5.9%	12.7%
D 製品	10 mg / 10 mL (0.1%)	71.5%	72.5%	36.2%	29.5%

各カビ毒溶液に添加した。混合して 37℃ で 1 hr インキュベート後に遠心して上清を回収した。回収した遠心上清中に残存するカビ毒を、r-Biopharm 社の RIDA スクリーンキット (ELISA kit) にて定量した。カビ毒吸着剤を添加していないカビ毒溶液をコントロールとして、インキュベート、遠心を同様に行い測定した。コントロール溶液中の残存するカビ毒濃度を 100% として、各カビ毒吸着剤の吸着率を求めた。その結果を表-4 に示した。アフラトキシン B1 に対しては、各カビ毒吸着剤も pH に大きく影響せず高い吸着率を示した。ゼアラレノンについては、カビ毒吸着剤の種類によって吸着率が異なること、および酸性域で吸着率が高くなることが認められた (C 製品は除く)。結果には記述していないが、すべてのカビ毒吸着剤とも DON に対する吸着作用は認められなかった (B 製品のみ 8% の吸着率)。一般的に鉱物系原料はアフラトキシンをよく吸着し、ゼアラレノンは 30% 以下、DON は 6% 以下程度の吸着率で、酵母系原料はゼアラレノンが 30% 程度、DON が 10% 以下程度の吸着率とされており、今回の試験で用いたカビ毒吸着剤は、種類により吸着率は異なるもののカビ毒に対する一定の吸着作用が確認された。



【図-2】 表面プラズモン共鳴システムによるボツリヌス毒素吸着作用の評価

ボツリヌス毒素に対するカビ毒吸着剤の吸着作用の検証

今回評価した4製品のうちカビ毒に対する吸着作用が最も高かったB製品(主原料: 鈹物系 + 酵母細胞壁)を用いて、ボツリヌス毒素に対する吸着作用を検証した。毒素は表-2のうち、鳥類ボツリヌス症原因毒素のC/Dモザイク毒素、牛ボツリヌス症の原因毒素であるD/Cモザイク毒素および、D型毒素の3種類にて評価した。評価方法は、50 mM 酢酸塩溶液 pH 6.0 に各ボツリヌス毒素が5 μg/mL、カビ毒吸着剤が0.025, 0.2, 0.4%濃度になるよう添加した。混合した後37°Cで1 hr インキュベート後に遠心して上清を回収した。遠心上清中に残存するボツリヌス毒素を下記方法で確認した。

- ①表面プラズモン共鳴システムを用いた抗ボツリヌス毒素抗体と毒素の結合によるシグナル上昇定量法。
- ②マウスの尾静脈に接種して毒力と致死時間の標準曲線を用いて毒素活性を算出するマウスバイオアッセイ法。

表面プラズモン共鳴系における抗原抗体反応のセンサーグラム評価方法の結果は、インキュベーションおよび遠心を同様に行ったボツリヌス毒素5 μg/mL(Control)のみのResponse Unitを100%として各検体の毒素残存率を求めて、結果を図-2に示した。カビ毒吸着剤の濃度に依存して遠心上清中に残存する毒素量が減少し、0.4%濃度では、C/Dモザイク毒素が14.6 ± 3.6%、D型毒素が8.7 ± 4.0%、D/Cモザイク毒素が7.6 ± 4.2%であった。

マウスバイオアッセイ評価方法では、C/Dモザイク毒素

【表-5】 マウスバイオアッセイによるボツリヌス毒素吸着作用の評価

	C/Dモザイク毒素 (鳥類ボツリヌス症原因毒素)		D/Cモザイク毒素 (牛ボツリヌス症原因毒素)	
	毒素活性	%	毒素活性	%
コントロール	20,000 ± 2,700	100 ± 13.0	230,000 ± 28,000	100 ± 12.0
0.025% カビ毒吸着剤	7,800 ± 1,100	38 ± 5.5	26,000 ± 1,600	12 ± 0.7
0.1% カビ毒吸着剤	< 3,350	< 17	24,000 ± 3,500	10 ± 1.5
0.4% カビ毒吸着剤	< 3,350	< 17	21,000 ± 3,800	9 ± 1.6

およびD/Cモザイク毒素で評価し、その結果を表-5に示した。インキュベーションおよび遠心を同様に行ったC/Dモザイク毒素5 μg/mL(Control)のみの毒素活性は20,000 ± 2,700を示したのに対して、カビ毒吸着剤0.025%濃度は7,800 ± 1,100(Controlに対して38 ± 5.5%)、0.1%と0.4%濃度では< 3,350(Controlに対して< 17%)を示した。同様に、D/Cモザイク毒素5 μg/mL(Control)のみの毒素活性は230,000 ± 28,000を示し、カビ毒吸着剤0.025%濃度は26,000 ± 1,600(Controlに対して12 ± 0.7%)、0.1%濃度は24,000 ± 3,500(Controlに対して10 ± 1.5%)、0.4%濃度は21,000 ± 3,800(Controlに対して8.9 ± 1.6%)であった。

表面プラズモン共鳴系における抗原抗体反応のセンサーグラム評価方法とマウスバイオアッセイ評価方法ともに、本試験に用いたカビ毒吸着剤は3種類のボツリヌス毒素を吸着し、吸着量はカビ毒吸着剤濃度に依存することが確認された。

今回の *in vitro* 吸着試験より、カビ毒吸着剤によるカビ毒のアフラトキシンB1、ゼアラレノンおよび、ボツリヌス毒素のC/Dモザイク毒素、D/Cモザイク毒素、D型毒素の吸着作用が確認された。この吸着は以下の作用機序が推測される。カビ毒吸着剤の鈹物系原料は、ケイ素、アルミニウム、カルシウム、ナトリウムを含む鈹物でイオン電荷による複数の化学構造体により構成されており、単極性(マイナス電荷)や双極性(プラス電荷、マイナス電荷)を持つことから、毒素とのイオン結合と考えられる。一方、酵母系原料は、酵母細胞壁の成分であるマンナンオリゴ糖・β-グルカン高分子と毒素との水素結合と考えられる。カビ毒吸

着剤の種類によってカビ毒の吸着能が異なった結果より、すべてのカビ毒吸着剤のボツリヌス毒素吸着作用の有無については今後の検討課題である。家畜の胃や腸管内は、pHの変化や消化酵素の分泌、腸内内容物の存在などとても複雑な環境下であるため、条件によってはカビ毒吸着剤と毒素の結合が外れることが懸念されるが、梅田は鉍物系+酵母細胞壁のカビ毒吸着剤で、クロストリジウム パーフリンゲンス産生毒素の吸着作用について、*in vitro* および *in vivo* で報告している¹⁰⁾。

ボツリヌス症は、毒素が腸管上皮細胞から吸収されて発症にいたる。したがって、ボツリヌス毒素と鉍物または酵母細胞壁との複合形成物となることで、毒素の吸収が阻害されて便として排泄されると考えられ発症予防が期待される。

現在の牛ボツリヌス症予防としては、牛用トキシドワクチンが市販されており、その有効性が証明されつつある。ワクチン接種は2カ月齢以上の牛であること、免疫を獲得するために2回接種(4週間隔)を必要とする。よって、ボツリヌス症が疑われる農場や過去に発生した農場においては、ワクチン接種ができない子牛や、ワクチン効果が得られるまでの期間にカビ毒吸着剤を飼料に添加して給与する予防対策や、ボツリヌス症の発症が認められた場合、獣医師の指導の下、ワクチン接種と衛生管理などとともにカビ

毒吸着剤を飼料に添加して給与する緊急対応策などの利用方法が考えられる。

参考文献

- 1) Kozaki S., Ogasawara J., Shimote Y., et al. : Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids, *Infect. Immun.* 55, 3051 ~ 3056 (1987)
- 2) Yamamoto H., Ida T., Tsutsuki H., et al. : Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins, *Microbiol. Immunol.* 56, 245 ~ 253 (2012)
- 3) 小崎俊司 : *Clostridium botulinum*, 食品由来感染症と食品微生物, 仲西秀男, 丸山 務 編, 456 ~ 468, 中央法規出版(2009)
- 4) Takeda M., Tsukamoto K., Kohda T., et al. : Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism, *Avian Dis.* 49, 376 ~ 381 (2005)
- 5) 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)
- 6) Nakamura K., Kohda T., Umeda K., et al. : Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan, *Vet Microbiol.* 140, 147 ~ 154 (2010)
- 7) Šegvič Klarič M. : Adverse effects of combined mycotoxins, *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012 Dec, 63(4), 519 ~ 530 (2012)
- 8) Phillips T. D., Kubena L. F., Harvey R. B., et al. : Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin, *Poult Sci.* 1988 Feb, 67(2), 243 ~ 247 (1988)
- 9) Kubena L. F., Harvey R. B., Phillips T. D., et al. : Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate, *Poult Sci.* 69(5), 727 ~ 735 (1990)
- 10) 梅田浩二 : 細菌毒素を吸着する機能性飼料を利用した生産性の向上, *養牛の友*, 10, 58 ~ 61 (2014)