

PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子の迅速検出

北海道立衛生研究所 武士甲一

ボツリヌス症（食餌性、創傷性および乳児ボツリヌス症などの総称）発生時に実施されている検査法は熟練と日数（7～10日）を要し、抗毒素の準備や試験に用いるマウスの維持・管理などその実施にあたって種々の制約を受ける。武士らはこれらの欠点を補い、かつ迅速に結果が得られる PCR 法に着目し、有毒株迅速検出法の開発を行った。

供試株は A 型から F 型までのボツリヌス菌有毒株、ボツリヌス C 型および E 型菌無毒株、ボツリヌス G 型毒素を産生する *Clostridium argentinense*、ボツリヌス E 型様毒素を産生する *C. butyricum* (BL 6340)、ボツリヌス F 型様毒素を産生する *C. baratii* (BL 6341) ならびに破傷風菌やウェルシュ菌を含むその他の *Clostridium* 属の計 63 株である。菌株は一夜培養後遠心して菌体を集め、常法に従って核酸を抽出した。プライマーは、既報¹⁻⁶⁾のボツリヌス毒素 L 鎖遺伝子の塩基配列（G 型を除く）の各型特異的配列を基に合成した。

本 PCR システムを用いることにより、ボツリヌス菌有毒株から 284 bp の A 型、314 bp の B 型、290 bp の C 型、497 bp の D 型、266 bp の E 型（BL 6340 を含む）、332 bp の F 型（BL 6341 を含む）の各型毒素遺伝子が確認された。一方、ボツリヌス C 型菌と E 型菌の無毒株およびその他の *Clostridium* 属では PCR 産物は検出されなかった。これら増幅された PCR 産物は制限酵素によって予想されたサイズのフラグメントに解離することを確認した。すなわち、A 型は *Hpa* I により 244 bp および 40 bp、B 型は *Ssp* I により 168 bp および 146 bp、C 型は *Rsa* I により 154 bp および 136 bp、D 型は *Rsa* I により 330 bp および 167 bp、E 型は *Aha* III により 182 bp および 84 bp、F 型は *Aha* III により 222 bp および 110 bp におおの解離することを確認した。また各型特異性は各毒素遺伝子に特異的な塩基配列をプローブ（約 20 塩基、5' 端に [γ -³²P] ATP ラベル）とする Southern hybridization により確定された。なお本プライマーを用いた PCR 法による毒素遺伝子の検出限界は、ボツリヌス A 型菌および E 型菌を用いた場合 2.5 pg DNA で、これはボツリヌス菌栄養細胞の 10 個～数 10 個から得られる DNA 量に相当する。

以上のごとく菌株から抽出した DNA を基質とした PCR 法は、その特異性および検出感度にすぐれ、しかも迅速（約 4 時間程度）に結果が得られることが分かったので、次に食餌性ボツリヌス中毒の原因となった食品から直接その毒素遺伝子の検出を試みた。試験に供した食品は、北海道内でボツリヌス E 型中毒の原因となった自家製サケトバ（試料 1）と熊本県を中心として A 型中毒の原因となった辛子レンコン（試料 2, 3）である。試料はオステライザーで細切後その 10 g ずつを秤量し、これに 5 倍容の滅菌蒸留水を加えて菌体および芽胞の抽出を試みた。抽出液を遠心し、その沈渣に滅菌蒸留水を加えて細菌・芽胞浮遊液とした。これを出発材料として無処理あるいは菌体からの抽出法に準じて核酸を抽出し、おのおのを鋳型 DNA として PCR を行った。その結果、試料 1 は制限酵素 *Aha* III により 184 bp および 82 bp に解離する 266 bp の E 型毒素遺伝子が検出され、マウス毒性・中和試験の結果と一致した。試料 2 は *Hpa* I により 244 bp および 40 bp に解離する 284 bp の A 型と *Ssp* I により 168 bp および 146 bp に解離する 314 bp の B 型毒素遺伝子が検出され、マウス毒性・中和試験の結果と一致した。試料 3 は *Ssp* I により 168 bp および 146 bp に解離する 314 bp の B 型毒素遺伝子が検出されたが、マウスに対する致死毒性は確認されなかった。

以上、本 PCR 法により菌株および中毒の原因となった食品からボツリヌス毒素遺伝子を迅速かつ型特異的に検出することができた。したがって、本 PCR 法はボツリヌス症発生時にその迅速診断のためのスクリーニング試験として今後応用が可能である。しかしながら、ここで若干の問題提起をしたい。その一点目は試料 3 の例のように、本来毒性のないものまで検出してしまうことである。二点目は実際に中毒の原因となった食品でも、その汚染菌数が 10 以下/g であると検出されない可能性があるということである。平成 5 年に秋田県でサトイモ缶詰を原因とする A 型中毒の発生があったが、このとき分与を受けた試料中の A 型菌数は 2/100 g/MPN で、この菌数では PCR での直接検出は困難である。三点目は糞便のように試料中に PCR を阻害する物質（ビリルビンなど）が含まれていると、汚染菌数が多くても検出される可能性は低いということである。したがって本 PCR 法の中毒発生時の診断や食品への応用はスクリーニング試験とし、その判定については増菌培養やマウス試験を併用するなど十分な検討が必要であると考ええる。

- 1) Ferreira, J. L. et al.: *J. Food Protect.*, **56**, 18 (1993).
- 2) Szabo, E. A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 418 (1992).
- 3) Kimura, K. et al.: *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **171**, 1304 (1990).
- 4) Sunagawa, H. et al.: *J. Vet. Med. Sci.*, **54**, 905 (1992).
- 5) Fujii, N. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 519 (1991).
- 6) Alison, K. E. et al.: *Feder. Europ. Microbiol. Societ.*, **96**, 225 (1992).