特別講演

ボツリヌス菌の疫学

Epidemiology of *Clostridium botulinum*

中村 信一

(金沢大学副学長)

Shinichi NAKAMURA

(Vice president of Kanazawa University)

はじめに

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) はボツリヌス症の原因菌である。本菌の産生する神経毒素は、その抗原性の違いにより A～G の 7 型に型別され、菌自体もその産生する毒素型により A～G の 7 型に分けられている。わが国においては 1951 年に北海道で「いずし」による E 型ボツリヌス中毒が報告されて以来、2004 年までに 177 事例（患者数、541 名；死者数、116 名）の食餌性ボツリヌス中毒が報告されている。また、近接する中国においては 1958 年に新疆地方の所謂「チャブチャール病（察布查爾病）」（チャブチャール県で流行っていた原因不明で高死亡率の流行病）が A 型ボツリヌス中毒であると報告されて以来、1997 年まで 776 事例（患者数、2,935 名；死者数、482 名）の食餌性ボツリヌス中毒が報告されている。ある地域で発生するボツリヌス中毒の原因菌型は、その地域の土壤に分布している菌型と基本的には一致している。それゆえに、ボツリヌス菌の土壤における分布を明らかにすることは本中毒の予防の観点から重要である。その際、未知の菌が既知の毒素を産生している可能性もあるゆえ、菌を分離することは極めて有意義である。私たちは菌分離に重点を置き、ボツリヌス毒素産生菌の分布について検討してきた。

1. 中国との比較における日本のボツリヌス菌の分布の特性

私たちのボツリヌス菌の疫学の研究は、1973～1974 年に石川県河北潟に多数のカモの斃死が見られたことに端を発する。当時、東京都、茨城県、千葉県などでもカモを主とする多数の野鳥の斃死が見られ、その原因は C 型ボツリヌス菌であることが示されていた。それゆえ、河北潟をはじめとする石川県の主な潟について、1974 年および 1975 年に土壤を採取し、C 型ボツリヌス菌の分布状況を調べることにした（以下、ボツリヌス菌の有無は、土壤を培養し、培養液中の毒素をマウスを用い、

致死毒性試験および毒素中和試験を行うことにより検索した）。河北潟に限らず調べた他の 4 カ所（柴山潟、木場潟、邑知潟、赤浦潟）すべての潟に、その程度は異なるものの、C 型ボツリヌス菌が存在することがわかった（潟当たりの被験土壤検体数、20～40 検体；陽性率、33～100%）¹⁾。また、河北潟における C 型ボツリヌス菌分布の季節変動を、1975 年 2 月～1976 年 6 月にかけて 1～2 カ月ごとに検討した結果、1974 年 9 月の結果とも併せ、渡り鳥が飛来する秋に C 型ボツリヌス菌が高頻度に認められ、渡り鳥が C 型ボツリヌス菌の分布に重要な役割を果たしていると考えられた。C 型ボツリヌス菌の分離は難しいが、ロールチューブ法を用いることにより、C 型ボツリヌス毒素産生菌株および C 型ボツリヌス菌を産生せず C₂ 毒素（神経毒素ではなく、細胞毒素、ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有する）のみを産生する菌株を分離することに成功した。C₂ 毒素のみを産生する菌株は世界的にも少なく、分離した C₂ 毒素高産生株は世界各地に分与され、C₂ 毒素あるいは細胞骨格の研究に使用された。これらの菌株は C 型ボツリヌス毒素産生の有無にかかわらず DNA レベルでは同一の菌種であったが、C 型ボツリヌス菌の代表的菌株である Stockholm 株とは異なっていた。さらに、両者は生物学的性状においても異なっていた。すなわち、産生される毒素により C 型ボツリヌス菌に一括されている菌株には少なくとも 2 群の菌が存在することが示された²⁾。これらの石川県の潟におけるボツリヌス菌の存在に関する研究においては、一衣帯水に位置する中国大陆に広く存在する A 型菌、B 型菌が認められなかった。本当に日本列島には A 型菌、B 型菌は存在しないのであろうか、あるいは極めてまれにしか存在しないのであろうか。そのことを確かめるために、同一の方法（L. DS. Smith 博士が米国大陸横断的にボツリヌス菌を検索したときに用いた土壤培養法。1 検体につき、10 本の肉片加グルコース培地に各 1 g ずつの検体を培養する）を用いて、日本列島、および A 型菌や B 型菌の存在が明らか

表 1. わが国土壌からのボツリヌス菌の検出

採取地域	土壌の種類	試験検体数	ボツリヌス菌陽性検体数 (%)	
			C 型	E 型
石 川 県	水田	33	2 (6)	0
	レンコン田	21	3 (14)	0
	他耕作地	34	4 (12)	1 (3)
山 陰	非耕作地	28	3 (11)	1 (4)
北 九 州	非耕作地	6	0	0
対 馬	非耕作地	35	0	2 (6)
宮 古 島	耕作地*	23	0	1 (4)
	非耕作地	10	3 (30)	3 (30)
石 垣 島	耕作地*	21	5 (24)	0
	非耕作地	23	6 (26)	1 (4)
与那国島	耕作地*	11	2 (18)	0
	非耕作地	21	2 (10)	1 (5)

検体採取期日：石川県，1984 年 4 月および 1984 年 8 月；山陰，1985 年 11 月；北九州，1985 年 11 月；対馬，1985 年 11 月；宮古島，1984 年 12 月；石垣島，1984 年 12 月および 1985 年 12 月；与那国島，1984 年 12 月。

* 主にサトウキビ畑

表 2. 中国土壌からのボツリヌス菌の検出

採取地域	試験検体数	ボツリヌス菌陽性検体数 (%)				
		A 型	B 型	C 型	E 型	F 型
ウ ル ム チ	10	7 (10)	3 (30)	1 (10)	0	1 (10)
トルファン	10	2 (20)	6 (40)	1 (10)	0	0
甘 肅 省	4	0	1 (25)	0	0	0
チ ベ ッ ト	11	0	3 (27)	4 (36)	3 (27)	0

検体採取日：ウルムチ，トルファンおよび甘肅省，1981 年 10 月；チベット，1983 年 7 月。

土壌培養液にボツリヌス毒性が認められたとき，該当ボツリヌス菌陽性とした（以下同様）。

土壌：小麦畑，綿花畑，トウモロコシ畑など。

にされている中国新疆地方の土壌におけるボツリヌス菌の存在を，中国上海第二医科大学余 瀆教授，陸徳源教授のご協力をいただき検討した³⁾。新疆地方の土壌は，1981 年にウルムチ，トルファンにて数 km～数十 km ごとに採取した。また，1983 年にチベット地方の土壌をラサ周辺を中心に採取した。日本では石川県のほか，A 型菌，B 型菌の芽胞が黄砂とともに飛来する可能性を考え，山陰地方・北九州地方の日本海沿いに数十 km ごとに土壌を採取した。さらに，大陸に近い対馬，宮古島，石垣島，与那国島（A 型菌，B 型菌が存在する台湾まで数十 km に位置する）の土壌を，1984～1985 年に採取した。また，1984 年 6 月に熊本県で A 型ボツリヌス菌による辛子レンコン食中毒が発生したので，石川県（日本有数のレンコンの産地）のレンコン田土壌についても検索した。日本土壌については検索に供したいかなる土壌にも，A 型菌，B 型菌の存在は認められなかったが，対馬および北九州を除くすべての地域の土壌検体に C 型菌が，また北九州を除くすべての地域の土壌検体に E 型菌が存在することが示された [C 型菌陽性検体，9%（宮古島）～25%（石垣島）；E 型菌陽性検体，1%（石川県）～12%（宮古島）]（表 1）。新疆地方土壌については，ウルムチ土壌 10 検体中 7 検体に A 型菌，3 検体に B 型菌，1 検体に C 型菌，トルファン土壌 10 検体中 2 検体

に A 型菌，6 検体に B 型菌，1 検体に C 型菌の存在が認められ，新疆地方には A 型菌，B 型菌が高頻度に存在することが確認された（表 2）。さらに数検体について土壌 10 g 中の菌数を検索し，さらに菌分離を行った結果，多いところでは 100～200 個の A 型菌，B 型菌の芽胞が存在すること，また，それらは蛋白分解性 A，B 型菌であることがわかった。チベット土壌には，ウルムチ，トルファンと異なり，11 検体中 3 検体に E 型菌の存在が認められた。以上の結果から，日本列島におけるボツリヌス菌の存在の特性は「日本列島には C，E 型菌が広く存在するが，A，B 型菌は極めてまれにしか存在しない」ことであることが強く示唆された。

E 型菌ボツリヌス菌は河口流域（湖沼，海）の汚泥・堆積物に多量に存在することについて 2 通りの説が示されている。その一つは E 型菌は本来的に内陸部の菌であり，土とともに洗い流されて河口流域に蓄積したとする説であり，他の一つは汚泥・堆積物中で増殖したとする説である。いずれの説がより妥当であるかを検証するため，また，上述の「日本列島には広く C，E 型菌が存在するが，A，B 型菌は極めてまれにしか存在しない」ことをさらに確かめるため，手取川（石川県），長良川（岐阜県），天竜川（長野県，静岡県），千曲川（長野県）について上流域を中心にボツリヌス菌を検索した。さらに

表3. 手取川, 長良川, 天竜川, 千曲川土壌からのボツリヌス菌の検出

河 川	採取検体数	ボツリヌス菌陽性検体数 (%)		
		B 型	C 型	E 型
手取川	38	3 (8)	1 (3)	15 (39)
長良川	18	4 (22)	1 (6)	6 (33)
天竜川	22	0	3 (14)	18 (82)
千曲川	20	0	4 (20)	16 (80)

検体採取期日: 手取川, 1986年8月および1987年8月;
長良川, 1989年11月; 天竜川, 1989年
11月; 千曲川, 1990年7月

は, 手取川および長良川の源流の白山 (標高 2,702 m) についても頂上に至るまで 15 地点で土壌を採取し検討した. いずれの河川においても, その上流域に E 型菌が高頻度 (E 型菌陽性率, 33~82%) に認められ, また C 型菌も, 頻度は E 型菌よりも低い (C 型菌陽性率, 3~20%) が, 認められた⁴⁾ (表 3). また白山土壌の検索では 3 地点 (標高 1,000~1,700 m) の土壌に E 型菌の存在が示された. 以上の結果は, 「日本列島におけるボツリヌス菌の存在の特性」を支持し, また E 型菌内陸説を支持した. その他の型については, 手取川土壌 3 検体 (8%) および長良川土壌 4 検体 (22%) の培養液に B 型毒素が検出された. B 型毒素の検出は, 多くの地域を対象とした我々の研究において初めてであり, また両河川はともに白山が水源であるところから, 白山山系には特異的に B 型菌が存在する可能性が考えられるが, その点については白山山系の他の河川 (九頭竜川など) を検索すること, 日本列島の各地の河川の上流域の土壌を検索することが必要であり, 今後の課題である. 土壌培養液のボツリヌス毒素産生菌を確かめるため, E 型毒素陽性の 4 地点の土壌および B 型毒素陽性の 1 地点の土壌を対象に, 菌の分離を行い, その性状を検討した. いずれの土壌培養液からも, 培養液の毒素型に対応したボツリヌス菌, すなわち E 型ボツリヌス菌および B 型ボツリヌス菌が分離された. ただし, B 型菌は中国の場合と異なり蛋白非分解性であった. 蛋白非分解性 B 型菌はその発見以来, 分離頻度はそんなに多いわけではなく, その基本的生息場所は明らかではないが, 我々の研究から考えると E 型菌と同様, 水系の菌であるように思われる.

2. 神経毒素生産性ブチリカム菌 (*neurotoxicogenic Clostridium butyricum*) の分布

ボツリヌス菌の性状は各型間で異なるものの, 各型に属する菌の性状はほぼ同一であり, 他のクロストリジウム菌種に同定される菌がボツリヌス毒素を産生することはないとされていた. しかしながら, 1985 年米国ニューメキシコでの乳児ボツリヌス症患者の糞便から F 型ボツリヌス毒素を産生するバラチ菌 (*Clostridium baratii*) が, また, 1986 年イタリア, ローマでの 2 例の

乳児ボツリヌス症患者の糞便から E 型ボツリヌス毒素を産生するブチリカム菌 (*Clostridium butyricum*) が分離され, いわゆるボツリヌス菌以外のクロストリジウム菌種がボツリヌス毒素を産生することが明らかとなった^{5~7)}. F 型毒素産生性バラチ菌はその後成人においてもボツリヌス中毒 (おそろしく感染性) の原因となることが報告された⁸⁾. しかしながら, E 型毒素産生性ブチリカム菌については, その後全く報告はなく, 本菌が食餌性ボツリヌス中毒の原因菌となりうるのか, また, 本菌はどこに生息するのかは不明であった.

私たちは 1994 年 1 月, 中国江蘇省連雲港市灌雲県 (中国の行政区は省, 市, 県の順で小さくなる) で発生した E 型ボツリヌス中毒が E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌によるものであることを明らかにし, 本菌が食餌性ボツリヌス中毒の原因となることを初めて報告した⁹⁾. 以下に本事例の概略を記す. 「1994 年 1 月, 自家製の黄豆冬瓜醬を食べた 6 名が食後 2~14 日でボツリヌス症の症状 (漸進性の神経麻痺, 眩暈, 悪心, 嘔吐) を呈した. 次第に視力が低下し, 複視, 眼瞼下垂, 発音障害, 嚥下障害, 呼吸困難が現れ, 3 名が呼吸麻痺で死亡した¹⁰⁾.」

本事例の原因食である黄豆冬瓜醬には E 型ボツリヌス毒素が検出された. そこで, 卵黄寒天平板を用いて, E 型ボツリヌス菌の特徴であるリパーゼおよび白濁環を指標として菌分離を行ったが, E 型菌は分離できなかった. それゆえ, E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌の可能性を考え, リパーゼ陰性・白濁環陰性を指標に菌分離を行ったところ, E 型ボツリヌス毒素を産生する菌を分離することに成功した. 分離菌の性状はブチリカム菌に一致し, また PCR にて E 型ボツリヌス毒素遺伝子の存在も確認でき, E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌と報告した. さらに, 事例が発生した周辺の土壌を検索した結果, 原因食から分離された菌と同一の性状を示す E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌が分離され, 土壌中の本菌による黄豆冬瓜醬の汚染が本事例の原因と考えられた.

以上のように, E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌が原因と考えられる食餌性ボツリヌス中毒事例が中国において見いだされたことから, 蘭州生物制品研究所 (中国甘肅省) に保存している E 型ボツリヌス毒素産生菌株を再度検討した. その結果, 1973 年の山東省済寧市での事例, および 1983 年の江蘇省沛県の事例において, 各々死亡患者の腸内容物および原因食品 (蠶豆) から分離した菌株の性状がブチリカム菌と一致した. 両事例発生場所は微山湖 (660 km²) (微山湖は山東省にあり, 江蘇省との境界に位置している) に近い (約 10 km) ところから, 微山湖に E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌が存在することが考えられた. そこで, 1995 年微山湖を 1 周する形で湖岸の 5 カ所の地点で土壌を採取し, E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌の分離を

表 4. E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌株の生化学性状および分子疫学解析

由 来	遺伝子型	菌株数	糖分解能		各ブライマー による RAPD ^{a)} パターン		各制限酵素消化 による PFGE ^{b)} パターン		サザン法による 毒素遺伝子の位置 (kbp)	
			アラビノース	イヌリン	1	6	SmaI	XhoI	SmaI	XhoI
乳児ボツリヌス症	BL5262	1	+	—	I	i	A1	a1	220	160
	BL6340	1	+	—	I	i	A2	a2	220	160
食中毒	LCL155	4	—	—	II	ii	B1	b1	>388	380
	LCL063	1	—	—	II	ii	B2	b2	>388	380
	LCL095	1	—	—	II	ii	B3	b3	>388	420
微山湖	KZ1886	3	—	+	III-1	iii	C1	c1	>388	160
	KZ1887	2	—	+	III-2	iii	C2	c2	>388	160

^{a)}RAPD, random amplified polymorphic DNA; ^{b)}PFGE, pulsed-field gel electrophoresis (パルスフィールドゲル電気泳動).

試みた。5 地点のいずれにおいても土壌培養液には E 型ボツリヌス毒素が見いだされ、最終的に 5 菌株の E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌を分離することができた¹¹⁾。灌雲県での成績と考え併せると、E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌は基本的にはボツリヌス菌と同様、土壌菌であると推定される。

イタリア乳児ボツリヌス症分離菌株、灌雲県食中毒分離菌株・済寧市食中毒分離菌株・沛県食中毒分離菌株、微山湖土壌分離菌株の生化学性状にはわずかながら相違が認められ、これらは各々群別された。このことは分子疫学解析によっても確認され、さらに各々は 2, 3, 2 群に細分され、E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌には異なった数種のクローンが存在することがわかった¹²⁾ (表 4)。

E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌によるボツリヌス症は、イタリア、中国のほかに 1998 年にインドでも報告され¹³⁾、この 3 地点と関係あるものとして Schecter ら¹⁴⁾はマルコ・ポーロの旅行に言及している。先に述べたようにイタリア株と中国株は異なっており、当該菌の存在はマルコ・ポーロと関係しないと判断される。しかしながら、マルコ・ポーロの旅行行程に沿って E 型ボツリヌス毒素産生性ブチリカム菌の存在を検索することは極めて興味ある課題である。

3. そ の 他

私たちのボツリヌス菌の疫学的研究は主に日本、中国であるが、1986 年にケニア、パラグアイ、2000 年にザンビアの土壌について検討する機会を得た。これらの国ではボツリヌス中毒は極めてまれであるゆえに、ボツリヌス菌の分布に関する研究はなされていないが、ケニアには A, C 型菌が、パラグアイには A, C, F 型菌が、ザンビアには B, D 型菌が存在していることがわかった^{15~17)}。

おわりに

ボツリヌス菌の疫学については多くの優れた研究があるが、本稿ではこれまでに私たちが行ってきた研究成果を

中心に述べた。ボツリヌス菌型の存在が地域によって異なる理由は明らかではないが、菌の生物学・生化学性状、地域の土壌性状・気候状態・生物生息状態などが関係していると考えられる。解決すべき興味ある課題である。

文 献

- 1) Serikawa, T., Nakamura, S. and Nishida, S.: Distribution of *Clostridium botulinum* type C in Ishikawa prefecture and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of *C. botulinum* type C. Microbiol. Immunol., **21**, 127-136 (1977).
- 2) Nakamura, S., Kimura, I., Yamakawa, K. and Nishida, S.: Taxonomic relationships among *Clostridium novyi* types A and B, *Clostridium haemolyticum* and *Clostridium botulinum* type C. J. Gen. Microbiol., **129**, 1473-1479 (1983).
- 3) Yamakawa, K., Kamiya, S., Nishida, S. and Nakamura, S.: Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China. Microbiol. Immunol., **32**, 579-587 (1988).
- 4) Yamakawa, K. and Nakamura, S.: Prevalence of *Clostridium botulinum* type E and coexistence of *C. botulinum* nonproteolytic type B in the river soil of Japan. Microbiol. Immunol., **35**, 583-591 (1992).
- 5) Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J. and Hatheway, C. L.: Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. J. Clin. Microbiol., **21**, 654-655 (1985).
- 6) McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., Fenicia, L., Pasolini, B. and Aurell, P.: Characterization of an organism that produces type E botulinum toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. J. Clin. Microbiol., **23**, 201-202 (1986).
- 7) Aurell, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M. and Hatheway, C. L.: Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. J. Infect. Dis., **154**, 207-211 (1986).
- 8) McCroskey, L. M., Hatheway, C. L., Woodruff, B. A.,

- Greenberg, J. A. and Jurgenson, P.: Type F botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium baratii* from an unknown source in an adult. J. Clin. Microbiol., **29**, 2618–2620 (1991).
- 9) Meng, X., Karasawa, T., Zou, K., Kuang, X., Wang, X., Lu, C., Wang, C., Yamakawa, K. and Nakamura, S.: Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. J. Clin. Microbiol., **35**, 2160–2162 (1997).
 - 10) Zhao, W., Lin, H., Qian, L., Gu, X., Dong, S. and Wang, L.: Study on an outbreak of type E botulism. Chin. J. Health Lab. Technol., **5**, 62–63 (1995). (in Chinese)
 - 11) Meng, X., Yamakawa, K., Zou, K., Wang, X., Kuang, K., Lu, C., Wang, C., Karasawa, T. and Nakamura, S.: Isolation and characterization of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* from soil of China. J. Med. Microbiol., **48**, 133–137 (1999).
 - 12) Wang, K., Maegawa, T., Karasawa, T., Kozaki, S., Tsukamoto, K., Gyobu, Y., Yamakawa, K., Oguma, K., Sakaguchi, Y. and Nakamura S.: Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. Appl. Environ. Microbiol., **66**, 4992–4997 (2000).
 - 13) Chaudhry, R., Dhawan, B., Kumar, D., Bhatia, R., Gandhui, J. C., Patel, R. K. and Purohit, B. C.: Outbreak of suspected *Clostridium butyricum* botulism in India. Emerg. Infect. Dis., **4**, 506–507 (1998).
 - 14) Schechter, R. and Arnon, S. S.: Commentary: Where Marco Polo meets Meckel: Type E botulism from *Clostridium butyricum*. Clin. Infect. Dis., **29**, 1388–1393 (1999).
 - 15) Yamakawa, K., Kamiya, S., Yoshimura, K., Nakamura, S. and Nishida, S.: *Clostridium botulinum* in the soil of Kenya. Annal. Trop. Med. Parasitol., **84**, 201–203 (1990).
 - 16) Yamakawa, K., Hayashi, T., Kamiya, S., Yoshimura, K. and Nakamura, S.: *Clostridium botulinum* in the soil of Paraguay. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **43**, 19–21 (1990).
 - 17) Karasawa, T., Wang, X., Maegawa, T., Nakamura, S., Hangómbé, B. M. and Isogai, E.: Demonstration of botulinum toxins of types B and D in soil samples from Zambia. Ann. Trop. Med. Parasitol., **94**, 409–411 (2000).