

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580383

研究課題名（和文） 家畜のボツリヌス中毒を予防する糖成分給餌法の開発

研究課題名（英文） Study on development of sugar feeding method that prevents animal botulism

研究代表者

丹羽 光一（ NIWA KOICHI ）

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：20301012

研究成果の概要（和文）： ウシ腸管からのボツリヌス毒素の吸収を抑制する方法を開発するため、ボツリヌス毒素複合体(L-TC)の小腸上皮細胞に対する透過を調べた。L-TC は培養小腸上皮細胞を透過し、このL-TCの透過はシアル酸の添加によって抑制された。この結果から、腸管からの毒素吸収に細胞膜のシアル酸が寄与しており、シアル酸と毒素を共存させると毒素吸収が抑制されることが明らかとなった。本研究により、家畜飼料にシアル酸を配合することでボツリヌス中毒を予防しうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To establish the preventive against bovine botulism, the effects of sugar on the transport of botulinum toxin complex (L-TC) via cultured intestinal epithelial cells were examined. L-TC permeated the cell monolayers, and the permeation were potently inhibited by sialic acid in the cell culture medium, indicating that the binding of botulinum toxins to cell surface sialic acid leads to their transcytosis through intestinal epithelial cells. Present results imply that bovine botulism can be prevented by an addition of sialic acid to feed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：ボツリヌス症、ボツリヌス毒素、小腸上皮細胞、糖鎖、吸収、疾病予防

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス菌が産生するボツリヌス毒素は、ヒトや家畜に致死的な呼吸麻痺を引き起こす。ウシのボツリヌス症(ボツリヌス中毒)の集団発生が国内で2004年から研究開始当時までに相次ぎ、350頭を超す牛が死亡または廃用となった。現在でも国内外でウシのボツリヌス症は頻繁に報告されており、その病態の解明と予防法の開発は、研究開始当初も現在も畜産学・獣医学の重要な課題である。

ボツリヌス毒素は神経毒素(BoNT)と数種類の無毒タンパク質(NTNHA、HA-70、HA-33、HA-17)が会合した巨大なタンパク複合体(L-TC)を形成しており、BoNTはその抗原性によりAからGの7型に分類されている。L-TCは経口摂取されると小腸上皮細胞にエンドサイトーシスで取り込まれ、血中に移行し、BoNTと無毒成分に解離したのち、BoNTが神経終末からのアセチルコリン放出を疎害する。BoNTの構造や毒性発現機序について

は国内外で非常に多くの研究がなされているが、無毒成分に関する研究は進んでいなかった。これは、ボツリヌス菌の培養および毒素精製が困難であったためである。

著者の研究グループは D 型菌 4947 株 (D-4947) が産生する毒素を高度な精製技術により大量に回収し、電子顕微鏡撮影およびエックス線解析によって立体構造を世界で初めて明らかにした。また、細胞に対する毒素の結合や透過量を測定する方法を確立していた。

このように著者のグループはボツリヌス毒素に関して世界で最も詳細な生化学的知見を有しており、腸管からの吸収も研究することができるという背景があった。ボツリヌス毒素の腸管からの吸収に糖鎖が関与していると考えられていることから、筆者は培養細胞実験および動物実験により腸管からのボツリヌス毒素吸収を抑制する方法を見出すことを計画した。

2. 研究の目的

前述のようにウシのボツリヌス中毒は畜産上重要な問題であるが、ボツリヌス毒素の構造は長年不明であった。著者らは、D-4947 ボツリヌス毒素が、三本足が突き出しているようなユニークな形をした巨大複合タンパク質 (750 kDa) であることを明らかにした。また著者は培養した血管内皮細胞を用いた実験で、ボツリヌス毒素が細胞膜上の糖鎖成分に結合する可能性を見出していた。しかしウシのボツリヌス中毒を引き起こす C 型、D 型ボツリヌス毒素が結合する小腸上皮細胞上の糖鎖成分は不明であり、また糖鎖に結合した後、実際に細胞内へ移行し吸収されるかは不明であった。

そこで本研究では、ボツリヌス毒素が糖鎖と結合する性質を利用し、培養小腸上皮細胞やマウスを用いて、1) ボツリヌス毒素が結合する小腸の糖成分は何か、2) 糖成分を毒素と同時に添加することで毒素の腸管からの吸収が抑制されるか、3) どのような飼料の給餌法がボツリヌス中毒予防に効果的か、を明らかにすることを目的とした。得られた結果から家畜のボツリヌス中毒予防法を提唱できるものと想定した。

3. 研究の方法

(1)ボツリヌス菌の培養と毒素の精製

ボツリヌス D-4947 株、および C 型菌 Stockholm 株 (C-St) を常法にしたがい 5 日間透析培養した。培養上清中のタンパク質を硫酸沈殿させ、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー (SP-Toyopearl 650S) ゲル濾過 (HiLoad 16/60 Superdex 200pg) および陽イオン交換カラムクロマトグラフィー (MONO-S) によって L-TC を単離した。

L-TC からの BoNT の単離は、pH 8.8 の条件で L-TC をゲル濾過 (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg) することで行った。単離した BoNT はさらに陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (Mono Q HR5/5) によって精製した。

(2)小腸上皮細胞 (IEC-6)の培養

ラット小腸由来細胞株である IEC-6 細胞を CO₂ インキュベーター内で継代培養し、実験に用いた。培養液には Dulbecco 's modified Eagle medium (DMEM) にウシ胎仔血清 (FBS; 10%) と抗生物質を添加した溶液を用いた。

(3)毒素の結合試験

FBS を含まない DMEM で BoNT あるいは L-TC を希釈した。IEC-6 をコンフルエントに播種した培養ディッシュを PBS で洗浄し、BoNT あるいは L-TC を添加して 4 において 1 時間インキュベートした。細胞を SDS サンプルバッファーで溶解し、サンプルを SDP-PAGE に供したのち抗 BoNT 抗体を用いたウエスタンブロットによって毒素の結合量を評価した。

毒素の結合を可視化するときは、スライドグラスチャンバーに IEC-6 を播種した。毒素の結合試験を行い、ホルマリンで細胞を固定したのち一次抗体に抗 BoNT 抗体、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識した抗ウサギ IgG 抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。

(4)毒素の透過試験

IEC6 細胞を二重槽培養系 (トランスウェル) の半透膜上に播種して 5 日間培養した。内槽に毒素 (20 nM) を添加してインキュベーションした後、外層の培養液を回収し、SDS サンプルバッファーで希釈した。サンプルを SDP-PAGE に供したのち、抗 BoNT 抗体を用いたウエスタンブロットによって毒素の透過量を評価した。

(5)糖鎖の関与

毒素の結合あるいは透過における糖鎖の関与を調べるため、ガラクトース、ラクトース、N アセチルガラクトサミン、あるいは N アセチルノイラミン酸を標記の濃度で毒素と同時に培養液に添加し、上記の方法で結合試験あるいは透過試験を行った。

シアル酸の関与を調べるため、ノイラミニダーゼ (16.7 mU/mL) を培養液に添加し、細胞を標記の時間インキュベーションした。その後は上記の方法に従い結合試験あるいは透過試験を行った。

4. 研究成果

(1)実験結果

細胞に対する毒素の結合と透過

D-4947 BoNT と L-TC の IEC-6 に対する結合

量を調べた。図1にBoNTとL-TCを添加した後のIEC-6の免疫組織写真を示した。

BoNTよりもL-TCのほうが明らかに結合量は多く、このことからL-TCを構成する無毒タンパク質が細胞への効率的な結合に寄与していることが示唆された。

IEC-6をトランスウェルに播種し、透過性を有する細胞層を作製してBoNTとL-TCの透過性を調べた。図2はトランスウェルの下層に透過した毒素の量を示している。結合の結果と同様に、BoNTよりもL-TCのほうが多く細胞層を透過していた。C-StのBoNTとL-TCについても同様の結果が得られた。以上の結果からL-TCを構成する無毒タンパク質が細胞への効率的な結合と透過に寄与していることが示唆された。

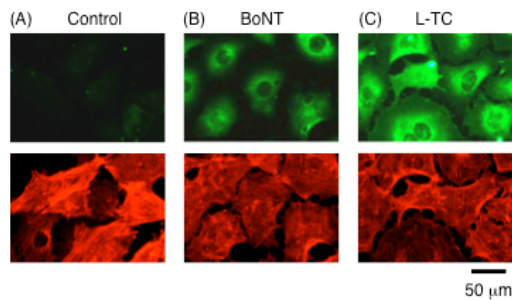


図1. IEC-6に結合した毒素の蛍光顕微鏡写真。上：毒素、下：アクチン。

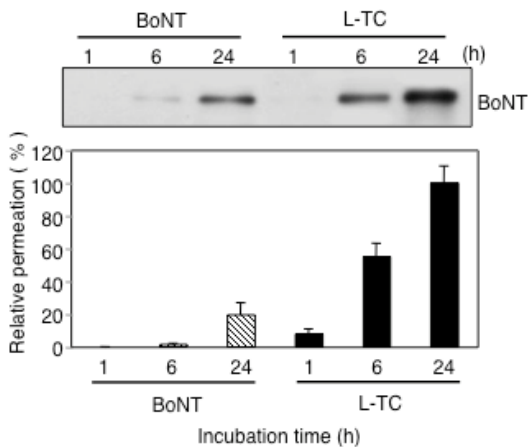


図2. IEC-6細胞層を透過した毒素量。代表的なウエスタンブロットの結果を上に表示した。n = 3、平均値 + 標準誤差。

無毒タンパクの関与

毒素の無毒タンパクのうち、細胞への結合と透過になが最も寄与しているかを調べるため、無毒タンパクの数や種類が異なるD-4947毒素中間体を用いて細胞への結合と透過を調べた。これらの毒素の中で、HA-33を最も多く含む750 kDa L-TCの細胞への結合と透過量が最も多かった。このことから細胞への結合と透過にHA-33が大きく寄与して

いることが明らかとなった。

糖による毒素吸収の抑制

BoNTおよびL-TCが細胞膜上のどの糖鎖に結合して透過するかを調べるために、各種単糖を培養液中に添加して、毒素の結合と透過に及ぼす影響を調べた。

ガラクトース、ラクトース、Nアセチルガラクトサミンの添加は、D-4947 BoNTおよびL-TCのIEC-6への結合と透過に影響を及ぼさなかった。一方、シアル酸であるNアセチルノイラミン酸を添加すると、BoNT、L-TCも結合と透過が大きく抑制された(L-TCの透過に対する糖添加の影響を図3に示した)。

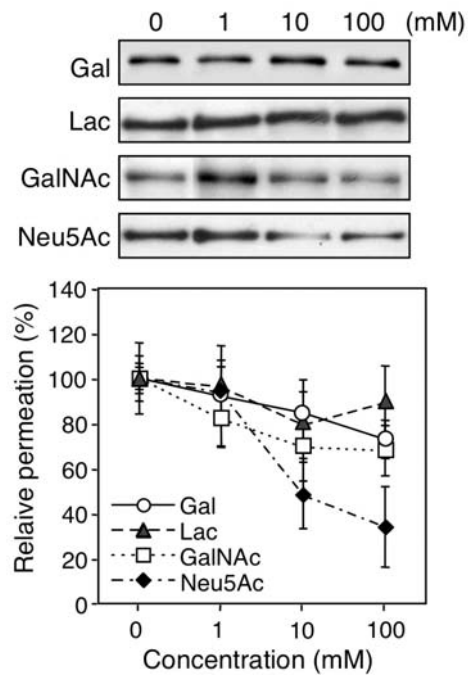


図3. L-TCのIEC-6細胞層透過に対する糖添加の影響。代表的なウエスタンブロットの結果を上に表示した。Gal, ガラクトース; Lac, ラクトース; GalNAc, Nアセチルガラクトサミン; Neu5Ac, Nアセチルノイラミン酸。n = 3、平均値 ± 標準誤差。

毒素の細胞への結合と透過に対するシアル酸の関与をさらに詳しく調べるため、IEC-6をノイラミナーゼで処理し、細胞表面のシアル酸を除去した細胞で結合・透過実験を行った。ノイラミナーゼ処理の時間に比例して、毒素の透過量が抑制された。C-StのBoNTとL-TCについても同様の結果が得られ、このことは細胞膜上にあるシアル酸が、C型およびD型BoNTおよびL-TCの結合と透過に必要であることを強く示唆するものである。一方、同じC型でもYoichi株から産生されるL-TCは、シアル酸ではなくガラクトースを認識する変異種であることを明らかにした。

HA-33 の関与

毒素の結合と透過には、無毒タンパクである HA-33 分子が重要な役割を果たしていることが分かったので、HA-33 分子とシアル酸が結合するか否かを調べた。HA-33 が 2 分子と HA-17 が 1 分子結合した HA-33/HA-17 複合体の細胞層への結合・透過試験を行ったところ、HA-33/HA-17 複合体の結合と透過はノイラミニダーゼ処理によって抑制された。

このことから、L-TC の小腸上皮細胞層の透過は、L-TC の構成成分である HA-33 が小腸上皮細胞の細胞膜上にあるシアル酸に結合することが第一のステップであることが強く示唆された。

シアル酸の添加による細胞間隙の拡張抑制効果

A、B 型ボツリヌス毒素が細胞内を透過するだけでなく、細胞間隙を拡張して細胞間隙を透過するという結果が報告されたので、このことが D 型ボツリヌス毒素でもおきるのか、それは毒素がシアル酸に結合することによっておきるのか、毒素とシアル酸を同時に添加することで拡張を抑制しうるのか検討した。

細胞間隙のトレーサーである FITC デキストランの IEC-6 細胞層に対する透過量を測定すると、D 型 L-TC によって細胞間隙が拡張することが明らかとなり、またこの細胞間隙から毒素が透過することがわかった。この L-TC による細胞間隙の拡張は、毒素と同時にシアル酸を添加することで抑制された（結果未発表）。

以上の結果から、腸管からのボツリヌス毒素の吸収は細胞内経路と細胞外経路があることがわかり、いずれも毒素のシアル酸への結合によって起こること、シアル酸の添加によりいずれの経路による毒素の吸収も抑制できることが明らかとなった。

(2) 考察と展望

本研究により、1) C および D 型ボツリヌス毒素は、神経毒素も毒素複合体も小腸上皮細胞のシアル酸に結合して吸収されること、2) ボツリヌス毒素の小腸からの吸収は、シアル酸を毒素と共存させることで抑制しうることを示された。この結果は、飼料中にシアル酸あるいは類似の物質を添加することで、ボツリヌス毒素の吸収を抑制し、ボツリヌス症を予防しうることを強く示唆するものである。

当初の研究計画では、マウスを用いて腸管からのボツリヌス毒素の吸収がシアル酸の添加によって抑制されるか調べる予定であった。しかし予備実験において毒素の投与量と同時添加する糖の最良の比率設定を見出すことが出来ず、In Vivo の結果は得ること

ができなかった。

代わりとして確実な結果を出すために、培養細胞を用いて細胞間隙の拡張に対するシアル酸の効果を検討した。この検討では一定の結果は得られたが（論文作製中）、In Vivo での毒素吸収抑制を証明することが今後の最大の検討課題である。ウシのボツリヌス症はいまだに国内外で散発しており、本年（平成 24 年）2 月には韓国でウシの集団感染が報告され、3 月には国内でヒトのボツリヌス食中毒が発生した。ウシではワクチンも開発され実用化されているが、小腸からの毒素吸収機構は未だ不明であり、それを防ぐ効果的で簡便な方法も今後研究してゆく必要があるだろう。

本研究課題の遂行中に、欧文で 4 本の論文を発表した。これらの雑誌の Impact factor は 0.72~3.1 であり、目標としていたレベルの成果は得られたものと考えている。

最後に本研究の機会を与えてくださった日本学術振興会に深く感謝します。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

Matsuo, T., Miyata, K., Inui, K., Ito, H., Horiuchi, R., Suzuki, T., Yoneyama, T., Oguma, K., Niwa, K., Watanabe, T. and Ohyama, T. Characterization of sugar recognition by the toxin complex produced by the *Clostridium botulinum* serotype C variant strain Yoichi. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 63:35-43 (2011) 査読有り

DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00825.x

Ito, H., Sagane, Y., Miyata, K., Inui, K., Matsuo, T., Horiuchi, R., Ikeda, T., Suzuki, T., Hasegawa, K., Kouguchi, H., Oguma, K., Niwa, K., Ohyama, T. and Watanabe, T. HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 61:323-331 (2011) 査読有り

DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00779.x

Inui, K., Ito, H., Miyata, K., Matsuo, T., Horiuchi, R., Ikeda, T., Watanabe, T., Ohyama, T. and Niwa, K. Involvement of sialic acid in transport of serotype C1 botulinum toxins through rat intestinal cells. J. Vet. Med. Sci. 72:1251-1255 (2010) 査読有り

DOI: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0090>

Niwa, K., Yoneyama, T., Ito, H., Taira, M., Chikai, T., Kouguchi, H., Suzuki, T., Hasegawa, K., Miyata, K., Inui, K., Ikeda, T., Watanabe, T. and Ohyama, T. Sialic acid-dependent binding and transcytosis of serotype D botulinum neurotoxin and toxin complex in rat intestinal epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 141:312-320 (2010) 査読有り
DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.00

〔学会発表〕(計 10 件)

吉田 悠真、D 型ボツリヌス毒素複合体の小腸上皮細胞層透過経路に関する研究、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、京都。

犬井 健、C 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞からの侵入機構の解析、第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 8 日、神戸。

丹羽 光一、C 型および D 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞の透過におけるシアル酸の役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 17 日、帯広。

犬井 健、*Clostridium botulinum* の産生する C 型ボツリヌス毒素の小腸上皮細胞透過機構の解析、第 78 回日本細菌学会北海道支部会総会、2010 年 9 月 4 日、江別。

伊藤博章、Role of HA components of botulinum toxin complex in absorption from intestinal epithelial cells、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、横浜。

伊藤博章、ボツリヌス毒素複合体の腸管上皮細胞への結合と透過における血球凝集素成分の役割、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸。

伊藤博章、D 型ボツリヌス毒素複合体の腸管上皮細胞への結合および透過における HA-33 の役割、第 77 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2009 年 9 月 18 日、札幌。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioindustry.nodai.ac.jp/~seika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 光一 (NIWA KOICHI)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：20301012

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大山 徹 (OHYAMA TOHRU)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：60318178

渡部 俊弘 (WATANABE TOSHIHIRO)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：80175695

小栗 秀 (OGURI SUGURU)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：70277250