

百日咳レファレンスセンター

1. 活動報告と計画
2. 百日咳菌のMALDI-TOF MS同定
3. マクロライド耐性百日咳菌

国立感染症研究所 細菌第二部 第一室
小出健太郎、後藤雅貴、大塚菜緒

1. 活動報告と計画

百日咳レファレンスセンター

計 10施設



令和4年度の活動報告

● レファレンス関係の分与実績

| レファレンス | 地方衛生研究所 | |
|-------------------------------------|------------|-----|
| | レファレンスセンター | その他 |
| <i>Bordetella holmesii</i> -LAMPキット | 0 | 0 |
| 4PlexリアルタイムPCRキット | 0 | 0 |
| マクロライド耐性菌遺伝子検出キット | 0 | 0 |
| 計 | 0 | 0 |

● 百日咳に関する情報還元

論文発表

- Koide K, Yamaguchi T, Katsukawa C, Otsuka N, Kenri T, Kamachi K. Complete Genome Sequence of a Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Isolated in Japan. *Microbiol Resour Announc*. 2022 Oct 20;11(10):e0071822.
- Koide K, Yao S, Chiang CS, Thuy PTB, Nga DTT, Huong DT, Dien TM, Vichit O, Vutthikol Y, Sovannara S, Samnang C, Takayama I, Ainai A, Nakajima N, Otsuka N, Kamachi K, Saitoh A. Genotyping and macrolide-resistant mutation of *Bordetella pertussis* in East and South-East Asia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Dec;31:263-269.

令和5年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

※ マクロライド耐性菌遺伝子検出キットはレファレンスセンター以外の地研にも配布しています



2) 百日咳病原体サーベイランス

- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌

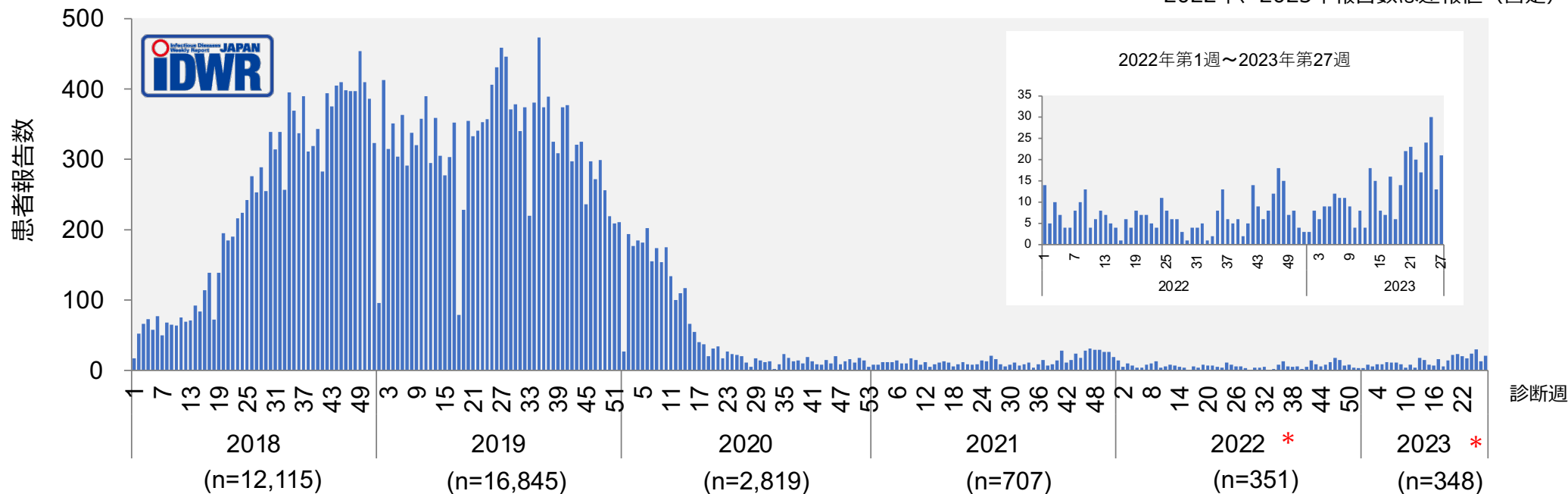


参考

国内百日咳の発生状況

2018年第1週～2023年第27週*

* 2022年、2023年報告数は速報値（暫定）



- 新型コロナウイルス感染症流行の影響で2020年以降報告数が激減している
→ 今後は人流の再開とともに患者増加が懸念される
外国人旅行者からの持ち込みにも要注意

2. 百日咳菌のMALDI-TOF MS同定

MALDI-TOF MS微生物分類同定分析装置

める

- コロニーを滅菌つまようじなどでターゲットプレートに塗布
- マトリックス溶液を添加



解析

- 試料をイオン化する
- イオンを分離する
- マスマスペクトルを取得



MALDI Biotyper microflex-NID1
(Bruker Daltonics, Germany)

同定

- スペクトルパターンをデータベースと照合
- 同定

| Rank (Quality) | Matched Pattern | Score Value | NCBI Identifier |
|----------------|--|-------------|-----------------|
| 1 (++) | Bordetella pertussis BORD_487_UZB | 2.23 | 520 |
| 2 (++) | Bordetella pertussis BORD_246_UZB | 2.206 | 520 |
| 3 (++) | Bordetella pertussis BORD_631_UZB | 2.201 | 520 |
| 4 (++) | Bordetella pertussis BORD_653_UZB | 2.211 | 520 |
| 5 (++) | Bordetella pertussis DSM_4926_DSM | 2.208 | 520 |
| 6 (++) | Bordetella pertussis DSM_4925_DSM | 2.201 | 520 |
| 7 (++) | Bordetella pertussis REF_029_ATCC_9340_UZB | 2.207 | 520 |
| 8 (+) | Bordetella pertussis DSM_5571T_DSM | 1.871 | 520 |
| 9 (+) | Bordetella pertussis DSM_4923_DSM | 1.776 | 520 |
| 10 (+) | Bordetella pertussis DSM_4927_DSM | 1.751 | 520 |

<同定結果の信頼度>

① Score value

0.0 一致なし 1.6

1.7 Probable 1.9
属レベル

2.0 Probable 2.2
種レベル

2.3 Highly probable 3.0
種レベル

② Consistency categories (CC): Rank-1とRank-2の菌種の一貫度。High (A), Low (B), No (C) consistency

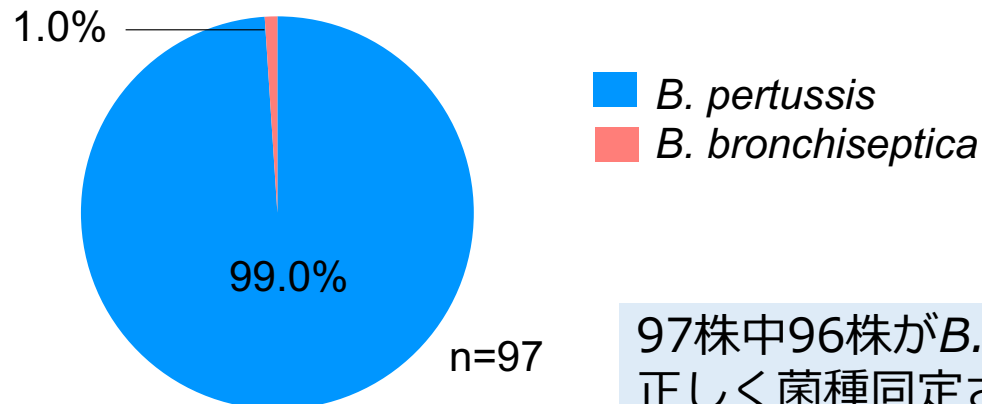
百日咳菌の菌種同定は難しい？

臨床微生物質量分析計検査法ハンドブック (2017) p. 24

「MSスペクトルのパターンが極めて類似しているために同定が困難なケース」
百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、パラ百日咳菌(*B. parapertussis*)、気管支敗血症菌(*B. bronchiseptica*)



PT, FHAを産生する一般的な臨床分離百日咳菌の同定結果 (Rank-1)



n=97

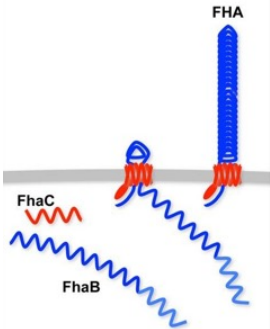
同定スコア平均 : 2.28

97株中96株が*B. pertussis*と正しく菌種同定された

百日咳菌FHA欠損株の菌種同定

繊維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin, FHA)

240 kDaの巨大な菌表層タンパク質。ヒト呼吸器への百日咳菌の接着に寄与する。PTとともに百日せきワクチンの主要なワクチン抗原でもあるが、FHA産生を欠損した百日咳菌が臨床分離されることがある



Melvin JA et al.
PMID: 24608338



- FHA欠損株では*B. bronchiseptica*と誤同定される確率が上がる
- Rank-1とRank-2の菌種的一致率 (CC) も低下する

百日咳菌 FHA欠損株 とサンプル調製方法

■ *B. pertussis*
■ *B. bronchiseptica*

スメア法

オンプレートギ酸法

エタノール・ギ酸抽出法



エタノール・ギ酸抽出法により菌種同定の精度が有意に上昇した

百日咳菌のMALDI-TOF MS同定

- ① 一般的な百日咳菌であれば、MALDI-TOF MSによる菌種同定は可能
- ② 百日咳菌抗原欠損株（FHA欠損株）は、*B. bronchiseptica*と誤同定される確率が上がる
※*B. bronchiseptica*のヒト感染は非常に稀である

→エタノール・ギ酸抽出法により同定精度が上昇した
- ③ 菌種同定に難渋した場合は、遺伝子検査（BP-LAMP法、4Plex RT-PCR法など）も有用である
※抗血清を用いたスライド凝集法は同定精度が低いので注意

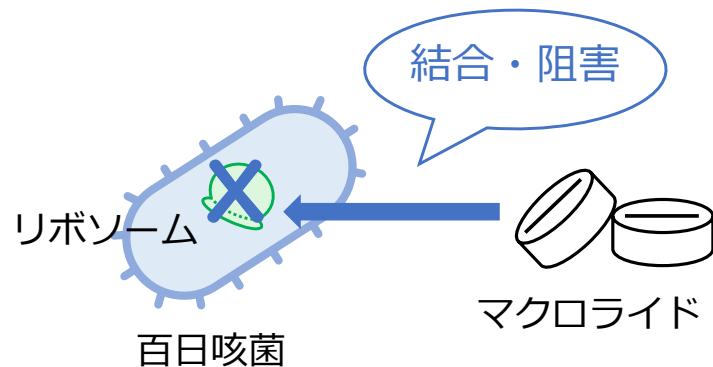
3. マクロライド耐性百日咳菌の流行状況

マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) とは？

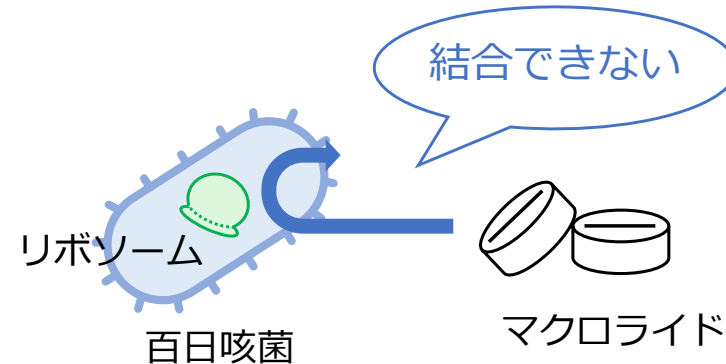
- 百日咳の治療薬であるマクロライド系抗菌薬（エリスロマイシンやアジスロマイシンなど）に対して耐性を示す百日咳菌
- リボソームを構成する23S rRNAの配列の2047番目の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)に置換することで耐性化 (検出キットの標的)
- 治療薬が効かないことで治療期間の延長や重症化等につながるため、耐性菌の出現は公衆衛生上重要な問題のひとつ

☆ 百日咳菌のマクロライド耐性機序

マクロライド感受性百日咳菌 (MSBP)

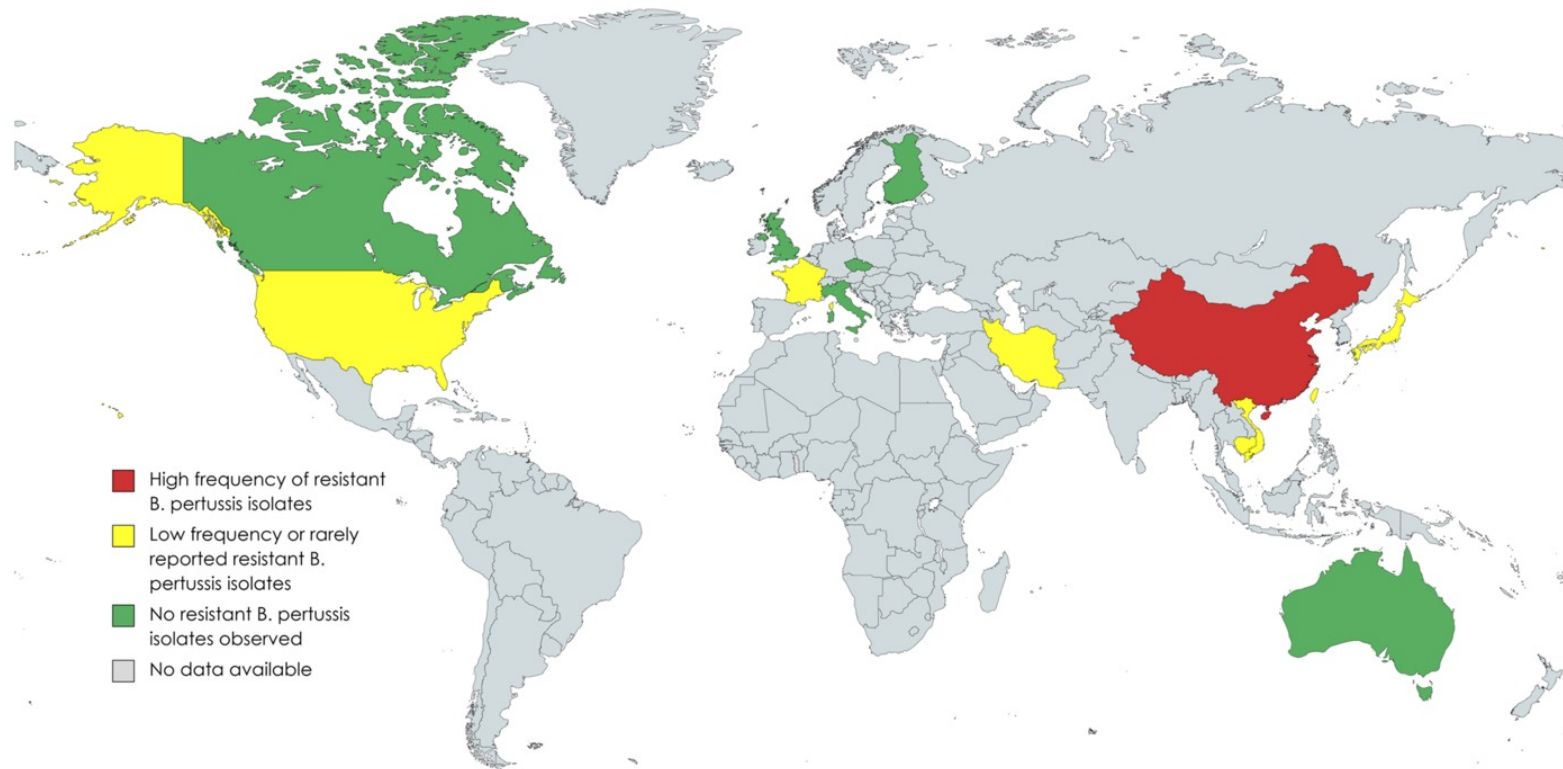


マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP)



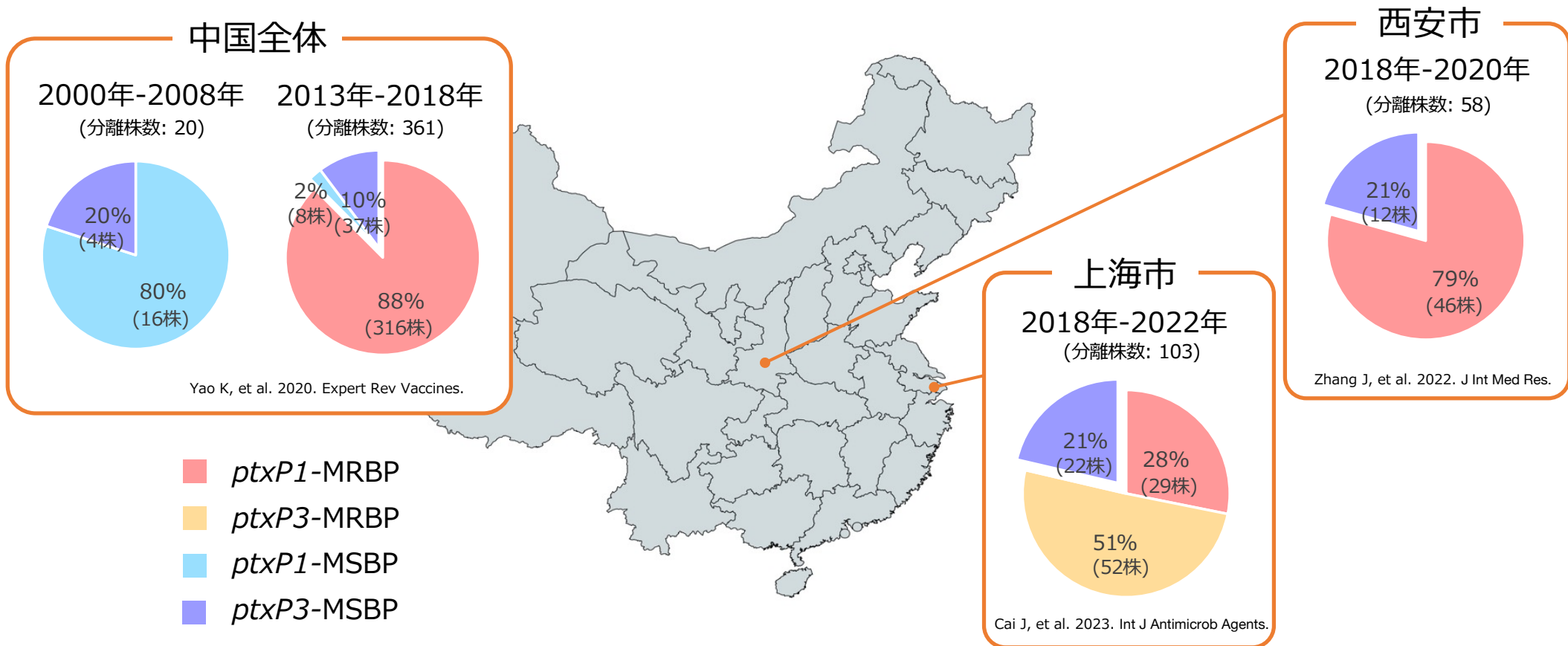
MRBPの分離状況

- MRBPは中国において高頻度で分離されている
- 日本では2018年にMRBPが2株分離された



中国国内におけるMRBPの分離状況

- 2011年に中国で最初のMRBPが分離された
- 2018年以降 *ptxP3*を持つMRBP株が上海市で増加している



日本国内で分離されたMRBP

日本で分離されたMRBP株の比較



| | BP616 | BP625 |
|-----------------------|--|--|
| 分離地域 | 大阪府 | 東京都 |
| 分離時期 | 2018年7月 | 2018年6月下旬 |
| 患者 | 男児 2か月齢 | 男児 1か月齢 |
| エリスロマイシンの 最小発育阻止濃度 | >256 µg/mL | >256 µg/mL |
| MLVAタイプ | MT195 | MT195 |
| 遺伝子型 | <i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i> | <i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i> |

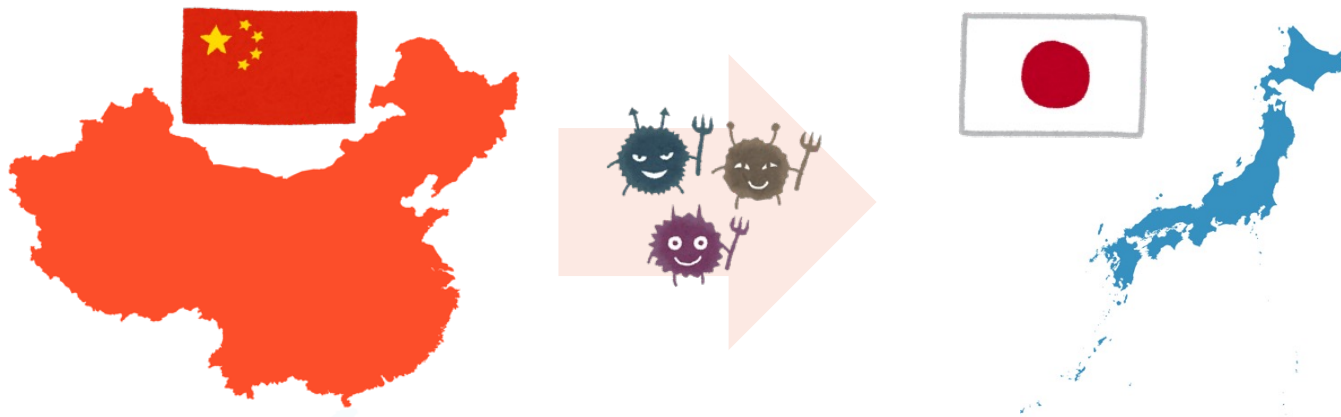
Yamaguchi T, et al. 2020. Jpn J Infect Dis.

全ゲノム解析の結果、これらの株は遺伝的に大きく異なるが、
どちらも中国MRBPと近縁であった

MRBPの流行状況 (まとめ)

- 中国を中心にMRBPが広がっている
- 中国では $ptxP3$ を持つMRBPが出現した
- 日本では2018年にMRBPが2株見つかった
- 中国から日本へMRBPが侵入したと考えられる

⇒ 今後、日本でも $ptxP3$ を持つMRBPが分離される可能性がある



百日咳担当室からのお願い

マクロライド耐性百日咳菌検査体制の強化・拡充

- 百日咳菌の収集およびマクロライド耐性菌遺伝子検出キットによるA2047G変異調査のご協力をお願いいたします。
- マクロライド耐性菌遺伝子検出キットをレファレンスセンター以外の地研にも配布します。
- 新規分離株だけでなく、過去に分離・保存されている菌株も検査対象です。
- 検体（ボイル法によって抽出した細菌DNAや菌株等）をご送付いただければ、感染研で検査致します。



マクロライド耐性百日咳に関する問い合わせは下記まで
お願いいたします。

国立感染症研究所 細菌第二部・第一室
小出 健太郎 (kkoide@niid.go.jp)

百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議

2023.7.27

ボツリヌス症レファレンスセンター

**北海道立衛生研究所
千葉県衛生研究所
三重県保健環境研究所
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所**

**福島県衛生研究所
神奈川県衛生研究所
岡山県環境保健センター
福岡県保健環境研究所
国立医薬品食品衛生研究所**

**東京都健康安全研究センター
大阪健康安全基盤研究所
山口県環境保健センター
熊本県保健環境科学研究所
国立感染症研究所**

ボツリヌス症：**ボツリヌス神経毒素**によって起こる全身の神経麻痺を生じる神経中毒疾患である。

原因菌：*Clostridium botulinum*（A-F型毒素）
Clostridium argentinense（G型毒素）
Clostridium butyricum（E型類似毒素）
Clostridium baratii（F型類似毒素）

症状：**ボツリヌス神経毒素**はコリン作動性神経末端からのアセチルコリンの放出を抑制し、その結果、神経から筋肉への伝達が障害され、麻痺に至る。典型的な臨床症状は、**眼瞼下垂、複視、嚥下障害、構音障害、口内乾燥**等がある。意識は鮮明であり、感覚障害はなく、**通常発熱はない**。嘔吐、腹痛、下痢等があってもすぐに**便秘**になる。

病型：
1) **食餌性ボツリヌス症**
2) **乳児ボツリヌス症**
3) **創傷ボツリヌス症**
4) **成人腸管定着ボツリヌス症**
5) その他（医療行為による感染、実験室内感染、バイオテロによる感染）

治療：**乾燥ボツリヌスウマ抗毒素**の投与。ただし、**乳児ボツリヌス症**の場合は対症療法を行い、**乾燥ボツリヌスウマ抗毒素**は使用しない。

ヒトでボツリヌス症を引き起こすボツリヌス神経毒素は、主に**A型、B型、E型**、まれに**F型**である。

食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）

ボツリヌス食中毒は、食品内に混入したボツリヌス菌芽胞が、嫌気状態の食品内で発芽、増殖し、産生された**ボツリヌス毒素を食品とともに摂取**することにより発症する。ボツリヌス菌芽胞は、土壌、湖沼などに広く分布し、果物、野菜、肉、魚が汚染され得る。

原因食品：**真空パック詰め食品、缶詰、瓶詰、発酵食品**

| 発生年 | 発生場所 | 患者数 | 原因食品 | 毒素型 |
|------|-------|-----|----------------|-----|
| 1984 | 14都府県 | 36 | カラシレンコン（真空パック） | A |
| 1984 | 青森県 | 1 | 鯛のいずし | E |
| 1984 | 足利市 | 1 | 不明 | B |
| 1984 | 釧路市 | 6 | ハタハタ・鮭のいずし | E |
| 1985 | 函館市 | 1 | 鯛のいずし | E |
| 1988 | 備前市 | 1 | 不明 | A |
| 1988 | 札幌市 | 3 | 自家製鮭の調味乾燥品 | E |
| 1989 | 釧路市 | 1 | ニシンのいずし | E |
| 1989 | 滋賀県 | 3 | ハスずし | E |
| 1989 | 名寄市 | 2 | カレーのいずし | E |
| 1991 | 青森県 | 1 | ウグイのいずし | E |
| 1991 | 広島市 | 1 | 不明 | A |
| 1991 | 青森県 | 1 | アユのいずし | E |
| 1993 | 秋田県 | 4 | 里芋（缶詰） | A |
| 1993 | 高槻市 | 1 | 不明 | 不明 |
| 1995 | 青森県 | 1 | コハダのいずし | E |
| 1995 | 青森県 | 3 | ウグイのいずし | E |

| 発生年 | 発生場所 | 患者数 | 原因食品 | 毒素型 |
|------|------|-----|-----------------|-----|
| 1995 | 北海道 | 6 | 鮭のいずし | E |
| 1996 | 茂原市 | 1 | 不明 | A |
| 1997 | 福島県 | 3 | ハヤのいずし | E |
| 1997 | 福島県 | 1 | イワナのいずし | E |
| 1998 | 東京都 | 18 | グリーンオリーブ（瓶詰） | B |
| 1999 | 大阪市 | 1 | 不明 | A |
| 1999 | 柏市 | 1 | ハヤシライスの具（真空パック） | A |
| 1999 | 東京都 | 1 | 不明 | A |
| 2007 | 岩手県 | 1 | アユのいずし | E |
| 2012 | 鳥取県 | 2 | あずきぱっとう（真空パック） | A |
| 2016 | 奈良市 | 1 | 不明 | A |
| 2017 | 福山市 | 1 | 不明 | B |
| 2019 | 埼玉県 | 1 | 不明 | A |
| 2021 | 東京都 | 1 | 不明（真空パック食品） | F* |
| 2021 | 熊本県 | 3 | 不明（白米もしくは市販の惣菜） | C |
| 2022 | 東京都 | 1 | アユのいずし | E |

*F型毒素産生性 *Clostridium baratii* による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：蜂蜜の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

| 発生年 | 患者数 | 蜂蜜摂取歴 | | | 毒素型 | | | |
|------|-----|-------|----|----|-----|---|----|----|
| | | あり | なし | 不明 | A | B | E | 不明 |
| 1986 | 1 | 1 | | | 1 | | | |
| 1987 | 9 | 9 | | | 6 | | | 3 |
| 1989 | 2 | 2 | | | 2 | | | |
| 1990 | 1 | | | 1 | | | | 1 |
| 1992 | 1 | | | 1 | 1 | | | |
| 1995 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 1996 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 1999 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2004 | 1 | | 1 | | | | 1* | |
| 2005 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | |
| 2006 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | |
| 2007 | 2 | | 2 | | | | | |
| 2008 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2010 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2011 | 5 | | 5 | | 3 | 2 | | |
| 2015 | 1 | | 1 | | | | | 1* |
| 2016 | 3 | | 2 | 1 | 1 | 2 | | |
| 2017 | 3 | 1 | 2 | | 3 | | | |
| 2018 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 2019 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 2020 | 2 | | 2 | | | 2 | | |
| 2021 | 1 | | 1 | | 1 | | | |

* 2例ともE型毒素産生性 *Clostridium butyricum* による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：母乳の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

成人腸管定着ボツリヌス症

成人や1歳以上の小児において、乳児ボツリヌス症と同様の病態で、ボツリヌス毒素産生菌が消化管内で増殖し産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。消化管に器質的あるいは機能的異常がある場合や、抗生薬使用等による消化管で腸内細菌叢の攪乱が認められる場合が多い。

日本では、2016年から2020年までに計2例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、1例は5歳の基礎疾患を持つ小児で、もう1例は臓器移植歴のある成人であった。2例ともA型ボツリヌス菌による感染であった。

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|--|---|--|---|---|----|--|------|---|---|---|--|---|---|--|
| 1996 | 1 | | 1 | | 1 | | | | 2017 | 3 | 1 | 2 | | 3 | | |
| 1999 | 1 | | 1 | | 1 | | | | 2018 | 1 | | 1 | | | 1 | |
| 2004 | 1 | | 1 | | | | 1* | | 2019 | 1 | | 1 | | | 1 | |
| 2005 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | | 2020 | 2 | | 2 | | | 2 | |
| 2006 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | | 2021 | 1 | | 1 | | 1 | | |

* 2例ともE型毒素産生性 *Clostridium butyricum* による感染

ボツリヌスといえば**蜂蜜**ではない！

- 食餌性ボツリヌス症の原因に蜂蜜は含まれない。蜂蜜は乳児ボツリヌス症の明らかな原因食品であるが、蜂蜜を食べていない症例の方が多数のため、**蜂蜜を食べていない=ボツリヌス症ではない**、とはならない。また、蜂蜜からボツリヌス菌が分離されても、その蜂蜜を市場から回収する必要はない。

患者が**1歳以上**の場合、まず**食中毒**を疑う！

- 第二、第三の症例を出さないため、食歴調査を行い、原因食品を突き止める必要がある。患者が食べた**食品の残りを廃棄せず、保管することが大事！**

乳児ボツリヌス症の患児は**回復後の排泄ケア**に注意！

- 乳児ボツリヌス症では、乳児の腸内でボツリヌス菌が増殖するため、乳児が回復したあとも、数週間から数ヶ月間、便とともにボツリヌス菌が排泄される。そのため、保育園など他に1歳未満の乳児がいる場では、**オムツ交換時に周囲の環境を便で汚さない**ようにする。ボツリヌス菌は、芽胞を作るため、アルコールなどの消毒薬が無効のため、石けんと流水での手洗いが必須。

「細菌学的検査」

検体： **血清（抗毒素投与前）**
糞便（便秘のため取り難いが、わずかでもいいのでなんとか取ってもらう）

試験：

＜マウス試験法＞

- ①処理した検体（血清、糞便）について、診断用抗毒素と混合したサンプル（中和サンプル）と混合していないサンプル（非中和サンプル）を調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。
- ②糞便を培地に播種し、30℃（もしくは37℃）で5日間静置培養した培養上清について中和サンプルと非中和サンプルを調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。



＜リパーゼ産性能の確認＞

糞便を培養した培地をブルセラHK卵黄寒天培地に播種し、嫌気的条件下で30℃（もしくは37℃）、48時間培養し、リパーゼ産性能を確認する。

＜毒素遺伝子の検出＞

ブルセラHK卵黄寒天培地上のコロニーのDNAを抽出し、毒素遺伝子の有無をPCRにて確認する。



ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

- 稀少感染症であること、動物実験を必要とすることから、検査の技術継承が難しい
- 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。
- 2018年度より、参加者によるマウス接種実施開始。
- 参加をご希望の場合は、細菌第二部第三室 妹尾 (senoh@niid.go.jp)
油谷 (yutanim@niid.go.jp)

第9回講習会

2023年11月15日～17日

参加者募集中（残3、実験室の都合上4名まで）

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

- **A、B、E、F型の診断用抗毒素**は、ご要望に応じて配布していますので、ご連絡ください。
- **C、D、G型の診断用抗毒素**は国立感染症研究所に保存してあります。**C、D、G型毒素産生性ボツリヌス症を疑う**場合はご連絡ください。
- ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRのための、**陽性コントロール**が必要な場合はご連絡ください。

問い合わせ先：細菌第二部第三室 妹尾 (senoh@niid.go.jp)
油谷 (yutanim@niid.go.jp)

230727

ボツリヌス毒素の *in vitro* 検出系の開発状況

ボツリヌス症

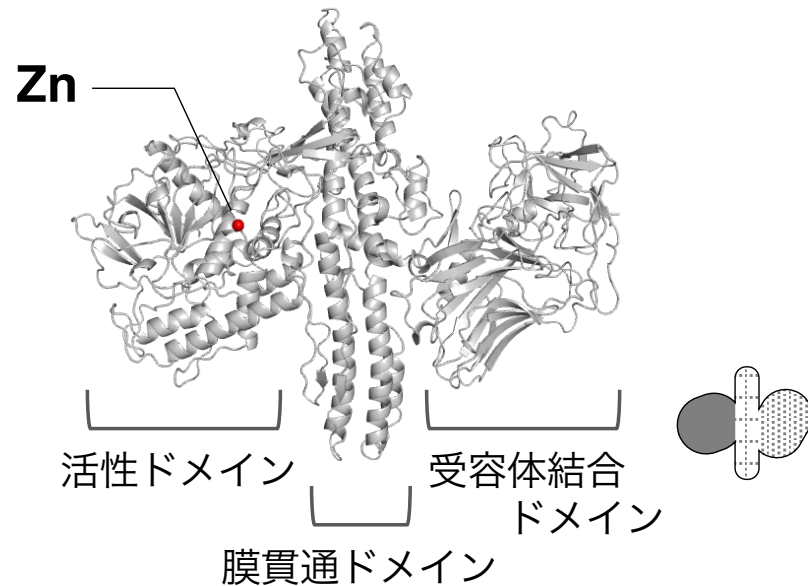
- ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)など※が産生するボツリヌス神経毒素によって惹起される。
- 弛緩性麻痺 → 呼吸困難により致死。

※ ボツリヌス (様) 毒素産生性
C. butyricum, *C. baratii*

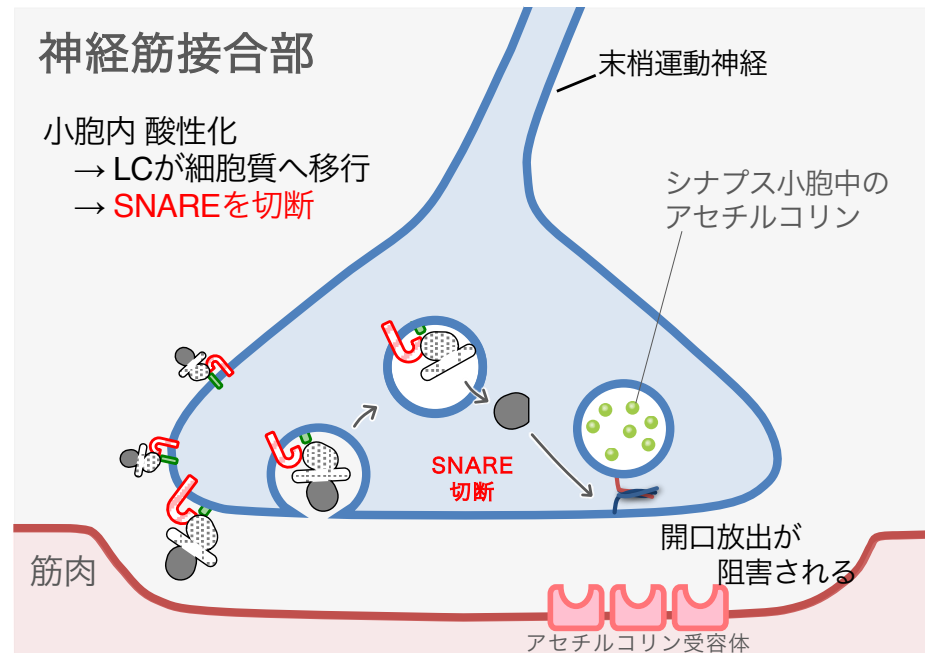
ボツリヌス神経毒素

botulinum neurotoxin (BoNT)

Zn依存性メタロプロテアーゼ (分子量 約15万)



毒素活性：SNAREタンパク質を切断



BoNT 血清型別、基質と切断部位

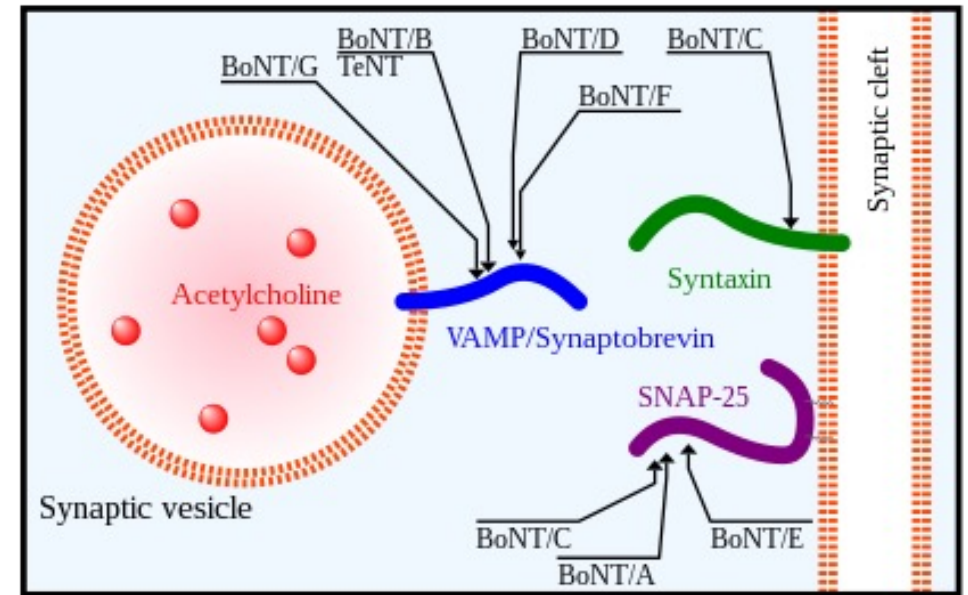
血清型

A ~ G の 7 血清型に分けられる。

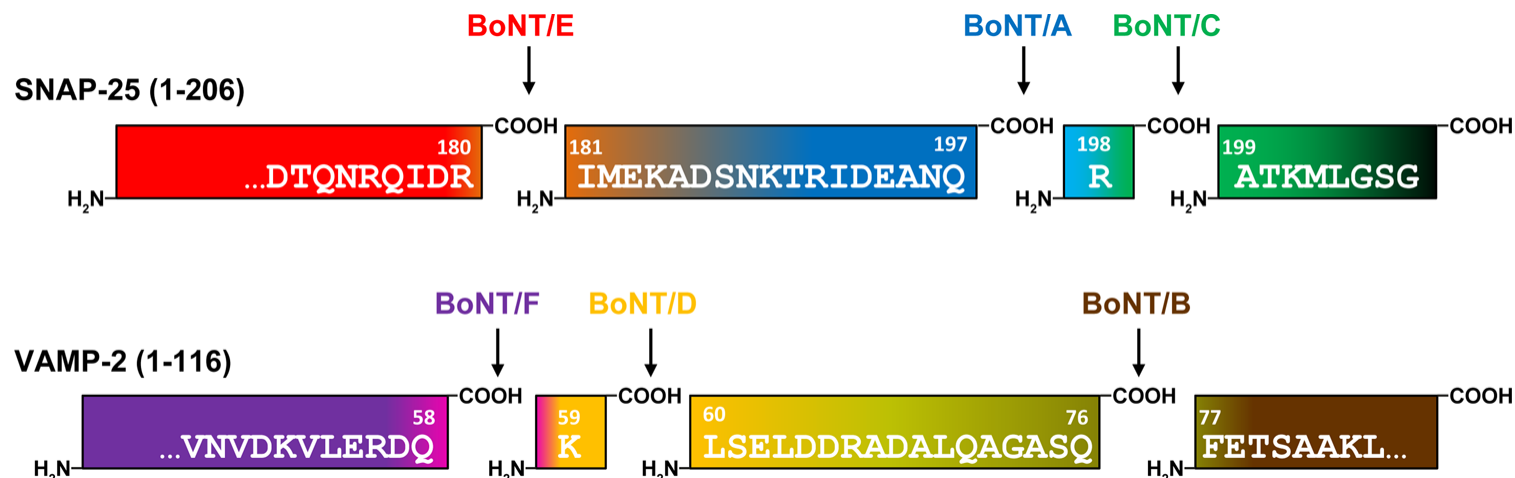
ターゲット (基質)

A, E, C → SNAP25

B, D, F, G → VAMP2



wikipedia



Laura von Berg et al. *Scientific Reports*, (2019)

血清中・糞便中・被疑食品中からボツリヌス毒素が検出される → 確定診断
(ボツリヌス毒素産生菌の分離)

検査法

- ・ マウス法がゴールドスタンダード。
検体をマウスの腹腔に投与し、症状の有無・生死で判定。
感度、特異性ともに良い。

- ・ 検出感度：1 mouse i.p.LD₅₀ (精製A型毒素 10 pg前後)
- ・ 所要時間：数時間～1日程度
- ・ 試験（検査）機関によっては実施が困難。
- ・ 一度に多くの検体を調べるのは困難。
(ボツリヌス毒素はバイオテロでの使用が懸念されている)



腹部陥凹
うずくまり
毛並みの悪さ
筋弛緩
致死

※ 3Rsの観点から、*in vitro*の代替試験法の開発が望まれる。

開発が進められている *in vitro* 検出系の例

| Method Principles | Analysis Time | BoNT Toxinotype | Sensitivity | Benefits/Limitations | References |
|---|---------------|-----------------|-----------------------------------|--|---------------------------|
| Immunological methods: sandwich ELISA, electro-chemiluminescent assay | 6–7 h | A–F | 2–176 pg/mL | Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs, detection hampered by neurotoxin associated proteins | [25–31] |
| Immunological methods: lateral flow assay, | 30 min | A–B | 10–50 ng/mL (10,000–50,000 pg/mL) | Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs, detection hampered by neurotoxin associated proteins | [25,34,37] |
| Mass spectrometry | 5–8 h | A–F | 0.1–1 pg/mL pg/mL | Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs | [39–44] |
| Endopeptidase ELISA based or MS based | 7–8 h | A–G | 0.1–1000 pg/mL | Rapid detection/detection of cleavage only | [44–56] |
| Immunosensors and FRET assays | 2–5 h | A | 0.1–20 pg/mL | Rapid detection/detection of active and inactive BoNTs | [60–65] |
| In vivo mouse bioassay | 4 days | A–F | 1–10 pg/mL | Sensitive method detecting functional toxin but ethical concern, variability and duration | [23,68,69] |
| Ex vivo methods hemidiaphragm test | 9–5 h | A–F | 1–10 pg/mL | Sensitive method detecting functional toxin but ethical concern and technically demanding | [70–72] |
| Cell-based assays human neurons from induced pluripotent cells and monitoring of SNAP-25 cleavage by Western blot | 3–5 days | A–E | 0.003 pM–10 pM (0.55–1500 pg/mL) | Sensitive method detecting functional toxin but technically demanding | [73–76,80,81,89,90,95–98] |
| Cell-based assays using differentiated cell lines | 3–5 days | A–E | 5.5 pM–10 nM (825–150,000 pg/mL) | Sensitive method detecting functional toxin but technically demanding | [77,82–88,94,99,105,106] |
| Electrical conductance assays | 1–3 days | A | 25,000 pg/mL | Method detecting functional toxin but long and technically demanding | [86,87] |

原理・手法

- ELISA
- FRET
- MS
- 分化誘導した細胞

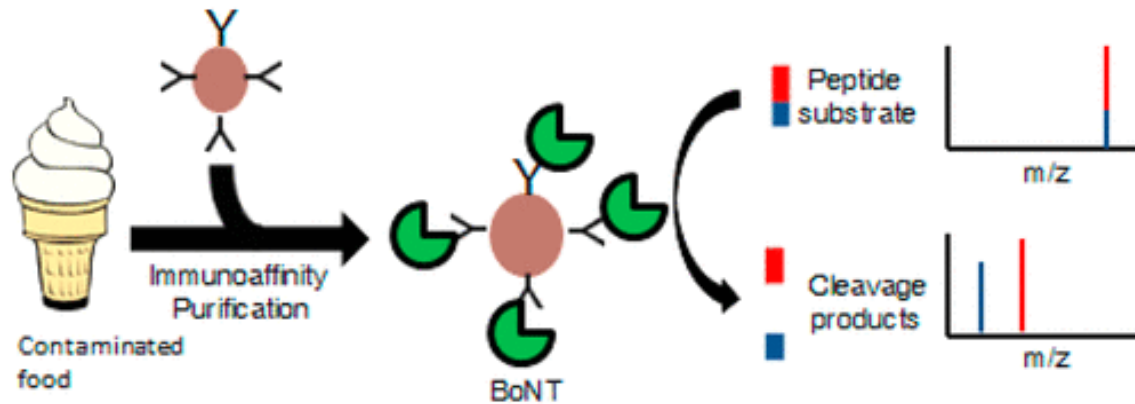
Rasetti-Escargueil, C. & Popoff, M. R. Recent Developments in Botulinum Neurotoxins Detection. *Microorg* 10, 1001 (2022).

開発例1

Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS

Kalb SR et al., *J. Agric. Food Chem.* 2015

(Barr JR et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2005から始まる)



特異的に切断されたりコンビナントSNAREタンパク質のフラグメントをTOF-MSで検出

(抗体固相化ビーズで精製)
各血清型に対するモノクロー抗体

Table 2. Limit of Detection of BoNT/A, /B, /E, and /F Spiked into 10 Selected Food Matrices

| food | food state | BoNT/A | BoNT/B | BoNT/E | BoNT/F |
|---------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| milk | liquid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| infant formula | liquid | 0.5 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| green bean liquid | liquid | 0.5 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| orange juice ^a | liquid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.5 mLD ₅₀ /mL | 0.025 mLD ₅₀ /mL |
| tomato juice ^a | liquid | 0.5 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.025 mLD ₅₀ /mL |
| liquid egg | liquid | 0.75 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.5 mLD ₅₀ /mL | 0.05 mLD ₅₀ /mL |
| yogurt | semisolid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| broccoli | solid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| salami | solid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |
| salmon | solid | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.1 mLD ₅₀ /mL | 0.25 mLD ₅₀ /mL | 0.01 mLD ₅₀ /mL |

^aRequires pH adjustment.

開発例2

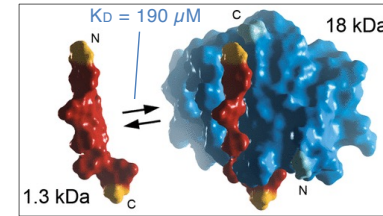
Split luciferase-based assay to detect botulinum neurotoxins using hiPSC-derived motor neurons

Laurent Cotter¹, Feifan Yu^{2,3,4}, Sylvain Roqueviere¹, Juliette Duchesne de Lamotte¹, Johannes Krupp⁵,
Min Dong^{1,2,3} & Camille Nicoleau¹

Commun Biology 6, 122 (2023).

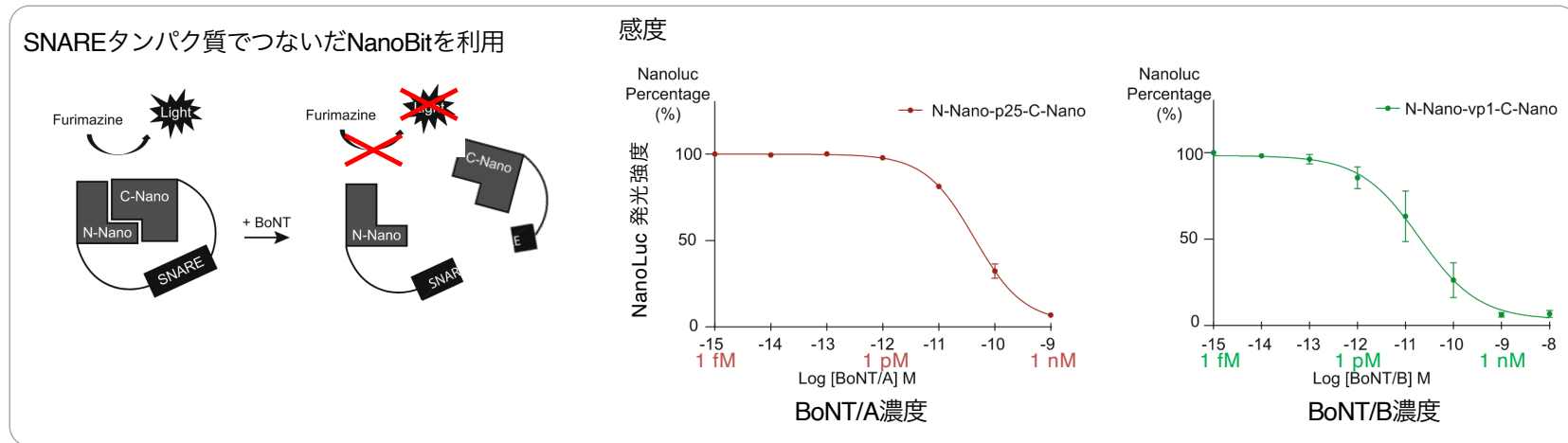
←この論文で採用されている技術

NanoLuc binary technology (NanoBit)



Dixon, A. S. et al.
ACS Chem. Biol. 11, 400–408 (2016).

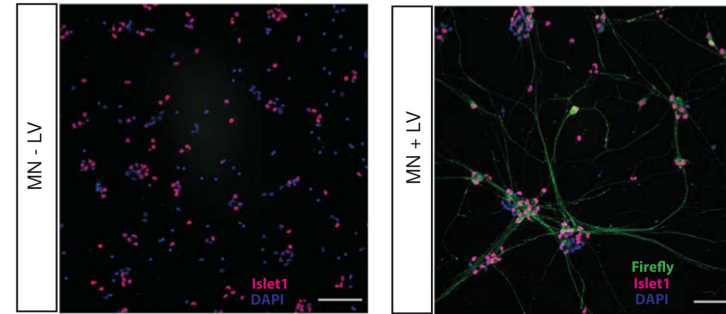
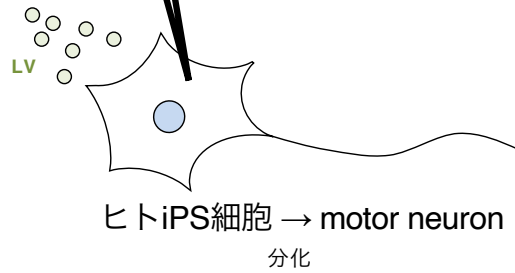
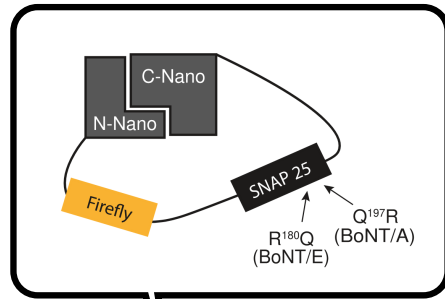
深海エビ由来ルシフェラーゼを元に作製された



開発例2

ヒトiPS細胞をmotor neuronに分化、かつ、NanoBit-SNAP25を発現

(N末) N-Nano -hLuc- SNAP25 -C-Nano (C末)



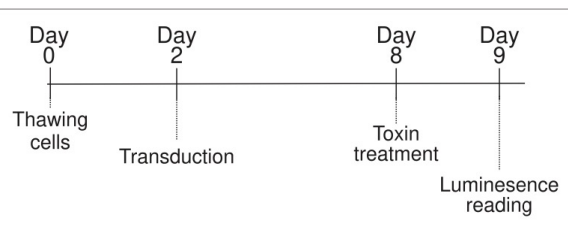
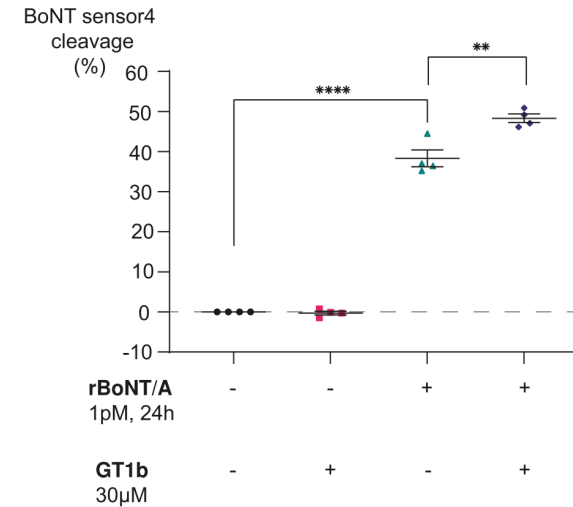
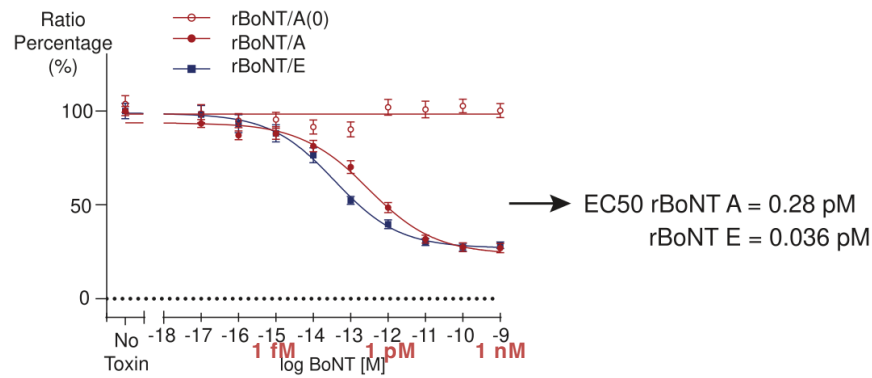
LV : Lentiviral vector

Islet1 : nuclear motoneuronal marker

ホタルLuc

ガングリオシド添加で (ちょっとだけ) 強化
Receptor binding modulation

感度



- 感度良好 (精製毒素を使用したデータ) 受容体結合と基質切断の両方をクリア

- 準備に数日かかる

上市されているin vitroボツリヌス毒素検出試薬

・ 蛍光タンパク質間のFRETを利用

Biosentinel社 (米国) 日本ではフナコシが取り扱っている

- ・ BoTest A/E BoNT Detection Kit (for academic) A1004 (200 test) 20万円 (税込)
- ・ BoTest B/D/F/G BoNT Detection Kit (for academic) A1009 (200 test) 20万円 (税込)

2000 test 容量もある (フナコシのサイトには掲載されていない)

・ 蛍光基 (ドナー) – 発色基 (クエンチャー) 間のFRETを利用

List Biological Laboratories社 (米国) 日本ではフナコシが取り扱っている

- ・ SNAPtide (A型用として販売)
- ・ VAMPtide (B型用として販売)
- ・ SNAP Etide (E型用として販売)
- ・ SYNTAXtide (C型用として販売)



基質となるSNAREタンパク質の配列をもつペプチド

切断箇所を挟むように2箇所のアミノ酸残基を蛍光基と発色基で修飾している

(未切断 FRETによりクエンチ状態 → 切断 クエンチ解除・蛍光を発する)

市販されている *in vitro* ボツリヌス毒素検出キット (BoTest) について

Biosentinel社 (米国) 日本ではフナコシが取り扱っている

- BoTest A/E BoNT Detection Kit (for academic) A1004 (200 test) 20万円 (税込)
- BoTest B/D/F/G BoNT Detection Kit (for academic) A1009 (200 test) 20万円 (税込)

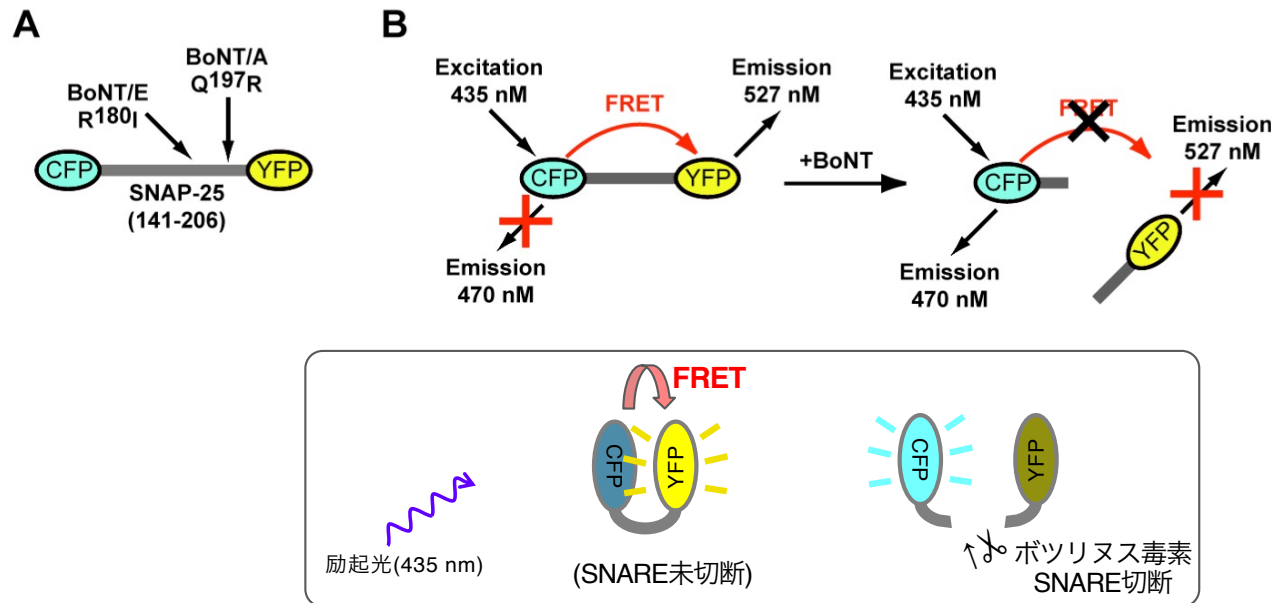
2000 test 容量もある (フナコシのサイトには掲載されていない)

【概要】

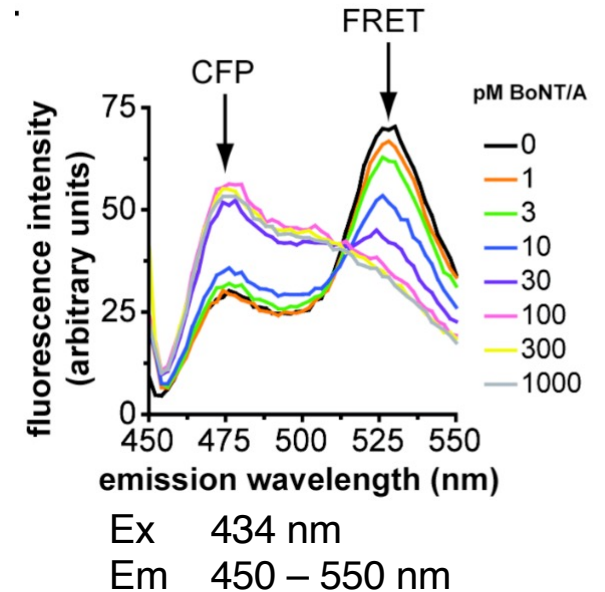
- FRETを利用した BoNT 検出キット (リコンビナント **CFP - SNAREタンパク質 - YFP** の切断)。
- BoNTの基質切断活性を検出する系。
- クルードサンプル 中のBoNTも測定できる。(実施例に "糞便サンプル" はない)
(milk, carrot juice)

BoTest A/Eの説明書より (一部加筆)

検出原理 (FRETを利用)



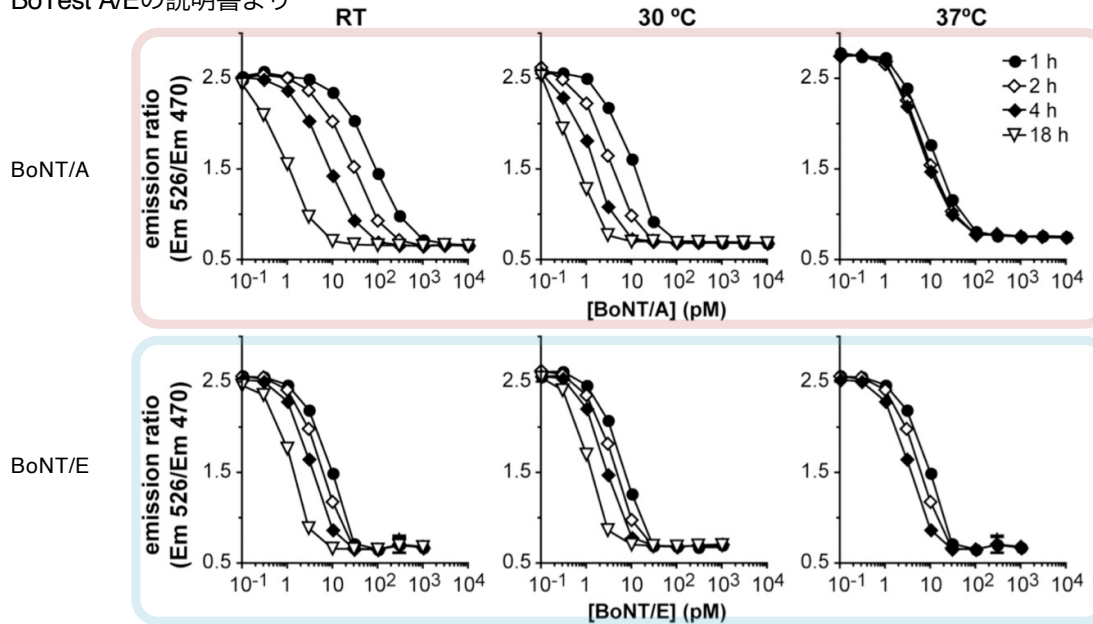
BoNT/A濃度依存的な FRETの消失



市販されている *in vitro* ボツリヌス毒素検出キット (BoTest) について

反応温度と感度

BoTest A/Eの説明書より



検出限界

| temp. | time (h) | EC ₅₀ (pM) | | LOD (pM) | |
|-------|----------|-----------------------|--------|----------|--------|
| | | BoNT/A | BoNT/E | BoNT/A | BoNT/E |
| RT | 1 | 76 | 8.2 | <10 | <3 |
| | 2 | 25 | 5.1 | <3 | <1 |
| | 4 | 7.4 | 3.2 | <1 | <1 |
| | 18 | 0.88 | 1.2 | <0.3 | <1 |
| 30 °C | 1 | 9.0 | 5.6 | <3 | <1 |
| | 2 | 2.9 | 3.6 | <0.3 | <1 |
| | 4 | 1.7 | 2.4 | <0.3 | <1 |
| | 18 | 0.4 | 1.1 | <0.3 | <0.3 |
| 37 °C | 1 | 9.9 | 4.6 | <3 | <1 |
| | 2 | 7.1 | 3.1 | <3 | <1 |
| | 4 | 6.3 | 2.3 | <3 | <1 |
| | 18 | 8.5 | 2.2 | ND | ND |

ex 434 nm → Em 526 / Em 470 の比

BoNTで切断されると YFP (FRET, 526 nm) ↓、CFP (470 nm) ↑ ⇒ 比の値が小さくなる

- 室温、18時間反応条件では、精製毒素 1 pM前後から検出できる (サブタイプによる差は不明)
- 長くインキュベーションする場合、低温 (室温程度) でインキュベートする方がよりstableなBoNTの活性を見ることができるとしている。
- A型毒素の場合、感度は30°C条件で最も高くなる。

BoTest A/Eを用いた実際のデータ

製品を購入し、A型試験毒素を用いて試験を行なった。

反応液組成 (100 μ L/well)

1x Buffer (製品に付属)
 5x cOmplete(プロテアーゼインヒビターカクテル, EDTAフリー)
 5 mM DTT
A型試験毒素 (none, 0.53, 2.68 i.p.LD50/well)
 BoTest reporter (基質)
 20% v/v 【0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4)】

| | none | 0.53 ipLD50/well | 2.68 ipLD50/well |
|-------------------------------|------|------------------|--------------------------|
| 10x Buffer | 9.5 | 9.5 | 9.5 |
| 50x cOmplete ^{EDTA-} | 10 | 10 | 10 |
| 50 mM DTT | 10 | 10 | 10 |
| A型試験毒素 (1 or 4 TD/mL) | 0 | 10 | 10 |
| 0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4) | 20 | 10 | 10 |
| BoTest reporter | 5 | 5 | 5 |
| H ₂ O | 45.5 | 45.5 | 45.5 |
| | | | total 100 μ L (well) |

ウェルプレート：パーキンエルマー OptiPlate 96-F Black 低吸着処理 (# 6055260)

反応温度：室温 ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) 遮光して静置

蛍光測定：0 (mix直後)、1、2、4、8、16 h

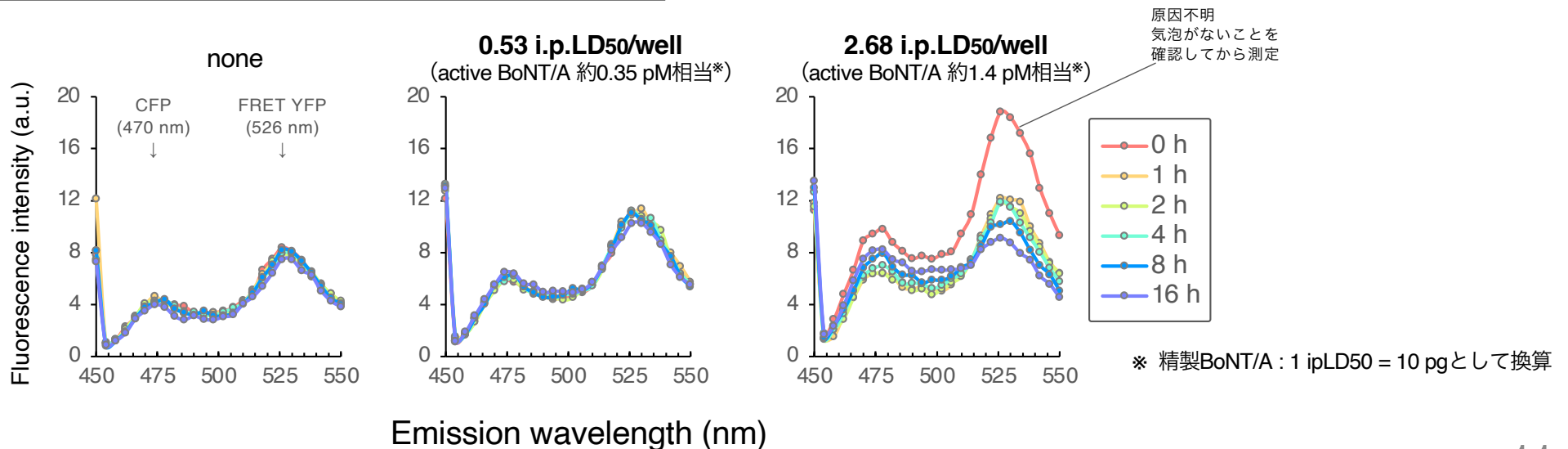
励起波長：434 nm

蛍光波長：450 – 550 nm (4 nm刻み)

(それぞれ1 wellだけで検討)

¥ 1,000/test

蛍光スキャンニング結果 (測定値をそのままプロットしたもの)



BoTest A/Eを用いた実際のデータ

470 nm (CFP) と 526 nm (FRET (YFP)) の蛍光強度、およびratio (Em 526/Em 470) の経時的変化

YFP / CFP

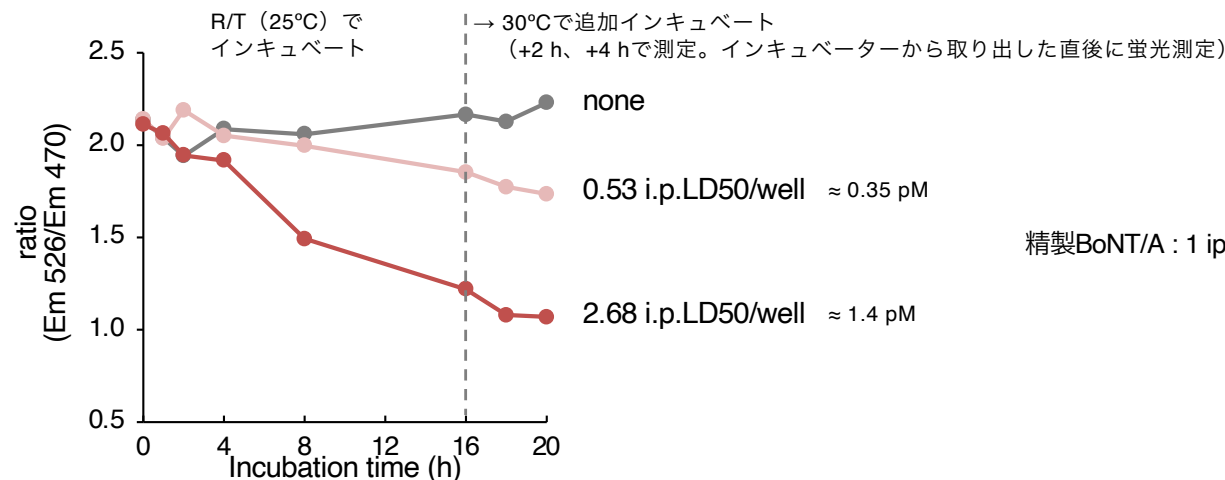
A型試験毒素
none

Em 526 / Em 470 の比

| | 0.53 i.p.LD50/well | | | 2.68 i.p.LD50/well | | | | | | | |
|----------|--------------------|------|-------------|--------------------|------|-------|-------------|--------|------|-------|-------------|
| | CFP | FRET | ratio | CFP | FRET | ratio | | | | | |
| 0 h | 3.92 | 8.36 | 2.14 | 0 h | 5.22 | 11.16 | 2.14 | 0 h | 8.91 | 18.82 | 2.11 |
| 1 h | 3.99 | 8.14 | 2.04 | 1 h | 5.34 | 10.88 | 2.04 | 1 h | 5.89 | 12.16 | 2.06 |
| 2 h | 4.08 | 7.93 | 1.94 | 2 h | 5.06 | 11.09 | 2.19 | 2 h | 6.08 | 11.83 | 1.95 |
| 4 h | 3.80 | 7.94 | 2.09 | 4 h | 5.46 | 11.19 | 2.05 | 4 h | 6.21 | 11.91 | 1.92 |
| 8 h | 3.87 | 7.97 | 2.06 | 8 h | 5.54 | 11.06 | 2.00 | 8 h | 6.80 | 10.14 | 1.49 |
| 16 h | 3.79 | 8.20 | 2.17 | 16 h | 5.53 | 10.24 | 1.85 | 16 h | 7.48 | 9.13 | 1.22 |
| * 16+2 h | 3.51 | 7.47 | 2.13 | 16+2 h | 5.31 | 9.42 | 1.77 | 16+2 h | 7.28 | 7.86 | 1.08 |
| * 16+4 h | 3.40 | 7.57 | 2.23 | 16+4 h | 5.58 | 9.69 | 1.74 | 16+4 h | 7.61 | 8.14 | 1.07 |

* 室温 (25°C) で16時間インキュベートしたあと、30°Cで追加インキュベーションを行なった。

ratio (Em526/Em470) の経時的変化



・25°C・16 h条件では、A型試験毒素 2.68 i.p.LD₅₀/well (約 1.4 pM相当) が検出可能だった。(概ね説明書どおり)

BoTest A/Eを用いた実際のデータ

条件検討いろいろ ・プロテアーゼインヒビター(ロシュ cOmplete EDTA-free) の影響
 ・抗体で中和されるか

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 基質 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| A型毒素 | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - |
| cOmplete | - | - | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - |
| 抗毒素 | - | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + | - |

1 wellあたり

規定量

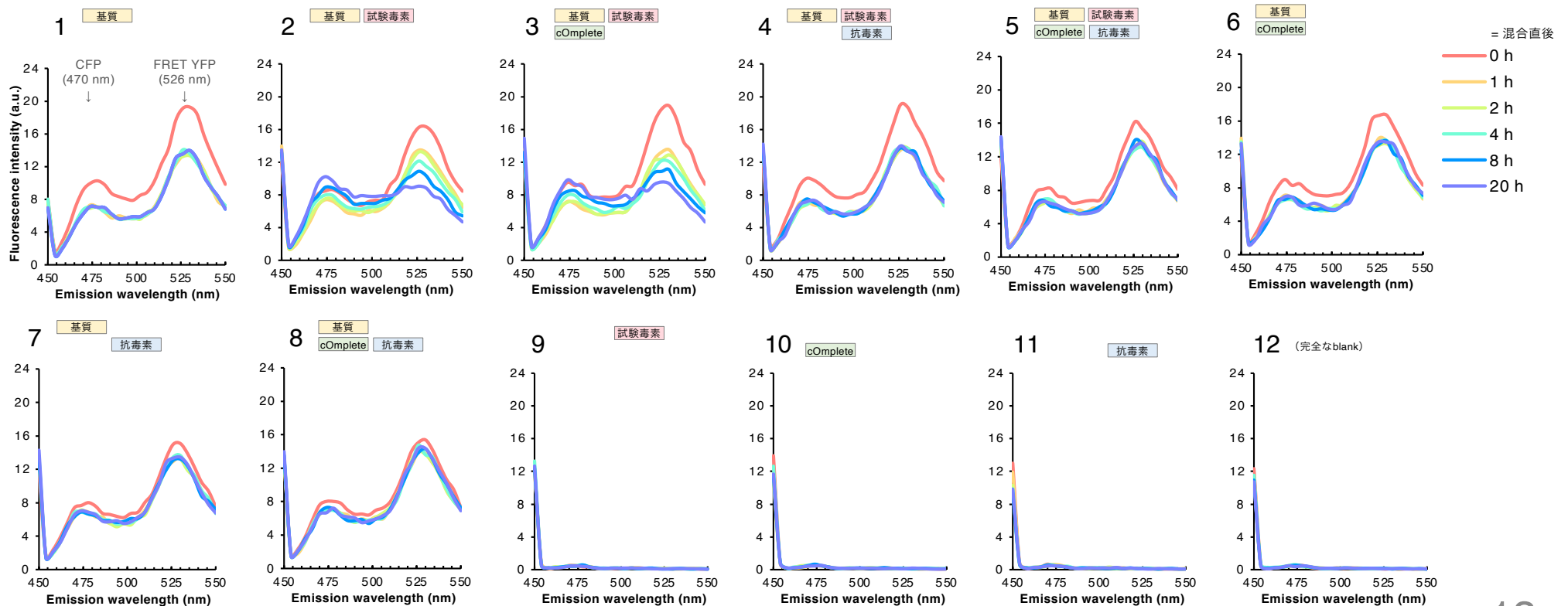
2.68 i.p.LD50

x5濃度

0.01 IU

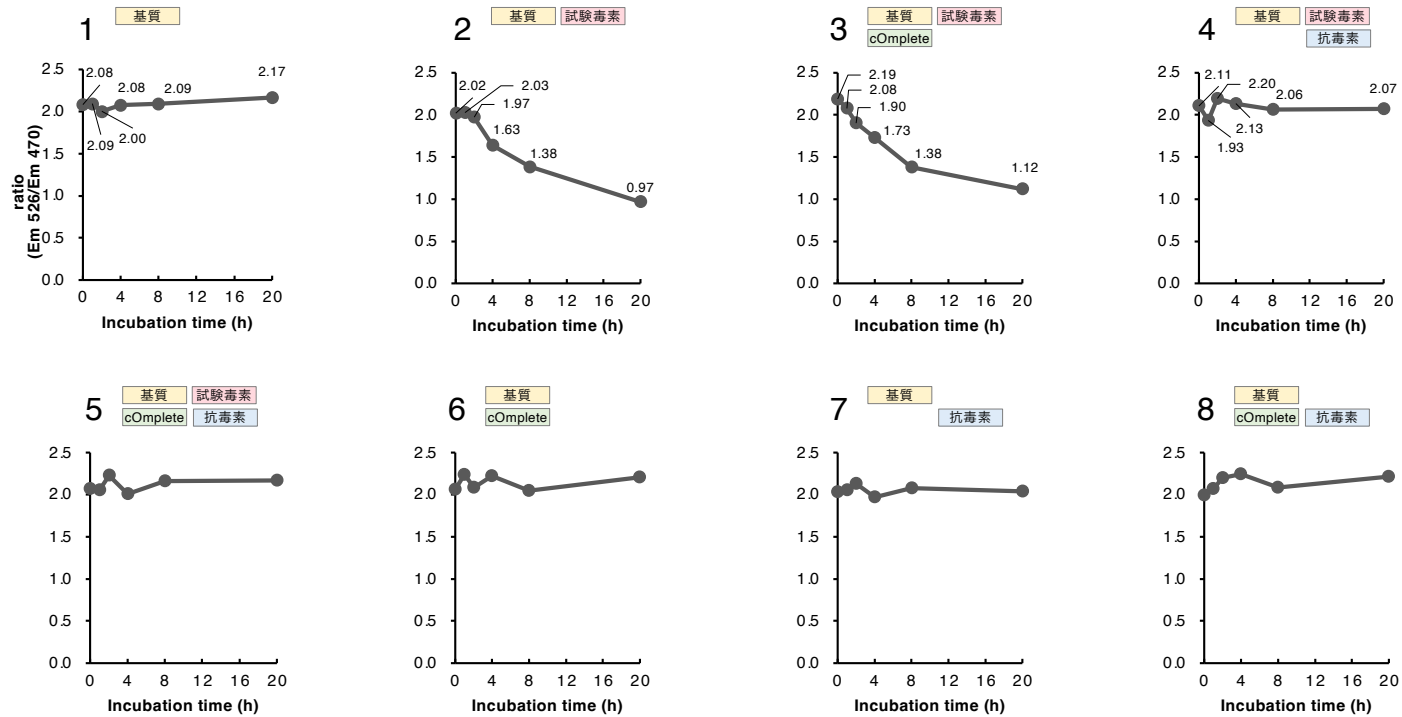
☐ 毒素 + 抗毒素はあらかじめ室温で1 h
インキュベートしたものを加えた

↓ 30°Cでインキュベート
 ↓ 経時的に蛍光測定 (Ex. 434nm, Em 450-550)



BoTest A/Eを用いた実際のデータ

ratio (Em526/Em470) の経時的変化



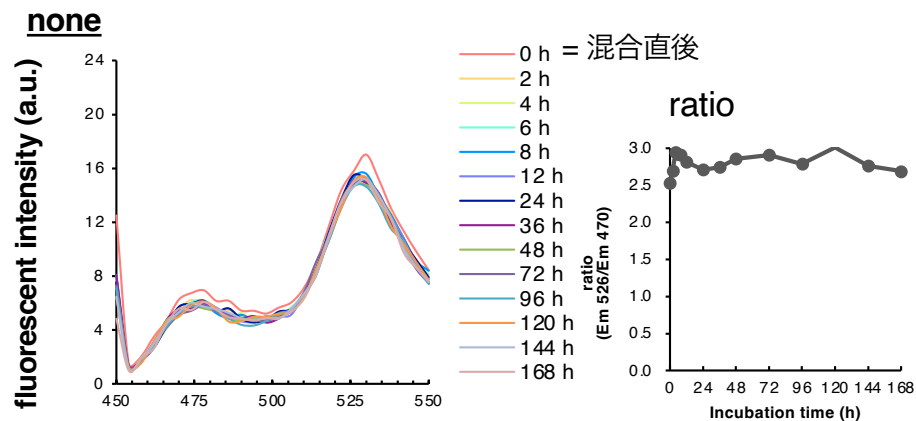
- ・ A型試験毒素 2.68 ipLD50/wellを30°C・8～20 hで検出可能であった。
- ・ A型標準抗毒素による中和も確認できた。

BoTest B/D/F/G を用いた実際のデータ

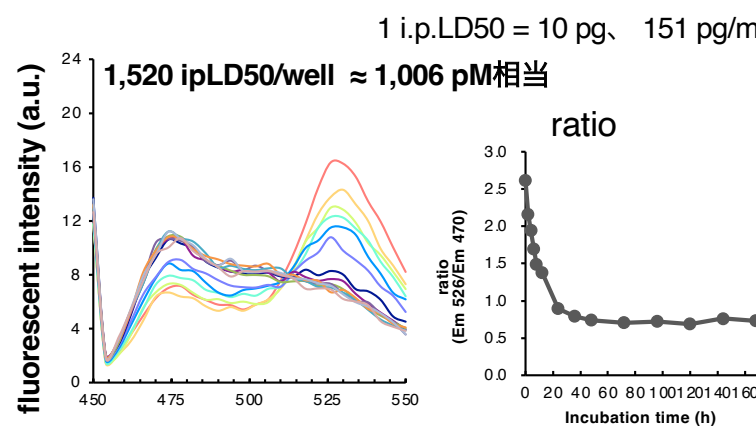
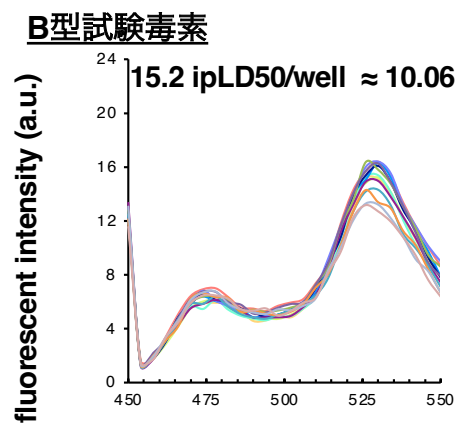
反応液組成 (100 μ L/well)

- 1x Buffer (製品に付属)
- 5x cOmplete(プロテアーゼインヒビターカクテル, EDTAフリー)
- 5 mM DTT
- B型試験毒素 (none, 15.2, 1,520 i.p.LD50/well)**
- BoTest reporter (基質)
- 20% v/v 【0.2%ゼラチン加PBS (pH 7.4)】

- ↓ 30°C インキュベート
- ↓ 経時的に蛍光測定 (~1週間)



感度 — BoTest A/E : A型試験毒素より
やや劣る



1 i.p.LD50 = 10 pg、151 pg/mL = 1 pMとして計算

まとめ

- ・ 開発が進められているボツリヌス毒素 *in vitro* 検出系について紹介した。
- ・ 上市されている検出試薬（BoTest）を使用したデータを紹介した。

今回試験を行った範囲では、

BoTest A/E = 2.68 ipLD50 のA型試験毒素

BoTest B/D/F/G = 1,520 ipLD50のB型試験毒素

が30°C条件下、~20 hで検出可能であった。