広島県で発生したボツリヌス毒素遺伝子 A・B 型 保有株による乳児ボツリヌス症

竹田 義弘^{*1}・東久保 靖^{*1}・井上 佳織^{*1}・小川 博美^{*1}
岡田 賢^{*2}・佐藤 貴^{*2}

(^{*1}広島県保健環境センター, ^{*2}広島大学医学部小児科)

(受付 平成 12 年 3 月 31 日)

(受理 平成 12 年 6 月 28 日)

Infant Botulism by *Clostridium botulinum* Possessing the Type A and B Botulism Neurotoxin Genes in Hiroshima Prefecture

Yoshihiro TAKEDA^{*1}, Yasushi TOUKUBO^{*1}, Kaori INOUE^{*1},
Hiromi OGAWA^{*1}, Satoshi OKADA^{*2} and Takashi SATO^{*2}

(^{*1}Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment,
1-6-29 Minamimachi, Minami-ku, Hiroshima-shi 734-0007)

(^{*2}Department of Pediatrics, Hiroshima University, School of Medicine,
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi 734-8551)

はじめに

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は芽胞を有するグラム陽性の嫌気性菌で、強力な神経毒素を産生してボツリヌス中毒を起こす。ボツリヌス中毒には食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症および創傷ボツリヌス症がある⁶⁾。このうち乳児ボツリヌス症は、通常、生後 2 週以上 1 歳未満の乳児に発症する疾病⁷⁾で、1976 年に米国で Pickett ら⁸⁾によって最初に報告された比較的新しい感染症である。その発症機序は、食餌性ボツリヌス症のように食品中に産生された毒素を摂取することで発症するのではなく、摂取されたボツリヌス菌の芽胞が、腸管内で発芽、増殖して毒素を産生し、吸収されることによって弛緩性麻痺を起こす、いわゆる intestinal toxemia という特異的な機序で発症すると考えられている⁴⁾。わが国においては 1986 年に千葉県で最初の 1 例が報告⁵⁾されてから、1996 年 4 月までに少なくとも 16 例が本症と診断されている¹¹⁾。広島県においてはこれまで乳児ボツリヌス症は確認されていなかったが、1999 年 3 月に A 型ボツリヌス菌による本症が発生した。患児糞便からの分離株は A 型毒素を産生したが、PCR 法では A 型毒素遺伝子とともに B 型毒素遺伝子も検出された稀な菌株であったので、その概要を報告する。

症 例

1. 患児

生後 7 カ月の男児

2. 現病歴

1999 年 3 月 24 日哺乳量が半分くらいに減少し、便秘気味で元気がなくなった。3 月 27 日便秘を主訴に近くの医院を受診し、浣腸を受けるがほとんど排便はなく、排便で少し便を得た。眼瞼下垂があり、帰宅後不機嫌となり哺乳しなくなった。3 月 29 日同医から H 総合病院へ紹介入院となった。全身ぐったりの状態、何とか首を保持できる状態であった。入院後、筋力低下が進行(全身性)、啼泣微弱、呼吸運動減弱となった。4 月 2 日広島大学医学部付属病院に転院となった。なお、蜂蜜の摂取歴はなかった。

3. 入院時所見

身長 71.5 cm, 体重 9,030 g, 意識は清明, 脈拍数 140/分, 呼吸は弱く, 腹部は少し膨満, 腸雑音減弱, 顔面は眼瞼下垂があり, 表情は少なく, 対光反射は左右とも鈍かった。

4. 入院時検査所見

入院時(4 月 2 日)の主な臨床検査成績を Table 1 に示した。白血球数, P, Mg および髄液総蛋白が高値を示したが, 筋疾患などで増加する CK, CKMB 値には異常はなく, 本症に特異的な検査所見は認められなかった。

^{*1} ☎734-0007 広島市南区皆実町 1-6-29

^{*2} ☎734-8551 広島市南区霞 1-2-3

Table 1. 入院時検査成績

WBC	15,500/ μ l $\uparrow$	Alb	4.1 g/dl
RBC	4.61×10^4 / μ l	T-Cho	157 mg/dl
Hb	12.2 g/dl	TG	122 mg/dl
Plate	41.0×10^4 / μ l	Na	138 mEq/L
GOT	35 IU/L	K	4.0 mEq/L
GPT	17 IU/L	Cl	105 mEq/L
LDH	395 IU/L	Ca	5 mEq/L
Ch-E	450 IU/L	P	5.5 mg/L $\uparrow$
ALPH	378 IU/L	Mg	2.5 mg/L $\uparrow$
CK	39 IU/L	髄液検査	
CKMB	6 IU/L	総蛋白	76 mg/dl $\uparrow$
CRE	0.21 mg/dl	糖	75 mg/dl
UA	3.1 mg/dl	血液ガス	
BUN	4 mg/dl	pH	7.428
乳酸	13.3 mg/dl	pCO ₂	36.2 mmHg
ビルビン酸	1.09 mg/dl	pO ₂	77.7 mmHg
TP	5.9 g/dl $\downarrow$	HCO ₃	23.5 mmol/L

$\uparrow$: 高値, $\downarrow$: 低値

材料および方法

1. 材料

発症後, 7, 10, 63, 79, 94 および 115 病日目に採取された糞便 6 検体, 離乳食に使われていた市販品のベビーフード 2 検体 (開封済み 1 検体, 未開封 1 検体) および食材の泥の付着したサツマイモ 1 検体, 計 9 検体を被検材料とした. 被検材料にはゼラチン希釈液 (0.2% ゼラチン加 0.03 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)) を等量加えて懸濁し乳剤とした. なお, 患児には 79 病日目の糞便検査後, 抗生物質のエリスロマイシンが投与されている. また, 岡山大学医学部から分与された A 型株 (A: A-NIH), B 型株 (Bp: B-Lamanna) および当センターで保有していた E 型株を対照株として使用した.

2. 方法

1) ボツリヌス毒素の検出

乳剤は 4°C に 1 晩静置後, 12,000 rpm, 10 分間遠心処理して上清を採り, 毒素試料液とした (直接法). 乳剤の沈査は 0.3% ブドウ糖と 0.5% 可溶性デンプンを加えたクックドミート培地 (Difco) (以下, CMGS 培地)²⁾ に接種して 30°C, 3~7 日間嫌気条件で増菌培養した. 次いで, 培養液を乳剤と同様に遠心処理して上清を採り, ゼラチン希釈液で 5 倍希釈して毒素試料液とした (培養法). その毒素試料液は, 常法⁹⁾ に従ってマウス (23~25 g の ddY 系) 腹腔内に 0.5 ml 注射し, 4 日以内に呼吸困難や腹部の陥没などボツリヌス特有の麻痺症状を呈して斃死するか毒性試験を実施した. 対照には上清を 100°C, 10 分間加熱したものを用いた. 毒素が検出された上清については, 抗毒素血清 (千葉県血清研究所) と 37°C, 1 時間反応させて毒素中和試験を実施し, 毒素型を決定した.

2) PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子の検出

被検材料を滅菌生理食塩水で 2 回洗浄した後, 沈査を等量の滅菌蒸留水に浮遊させた. これを 100°C, 10 分間

加熱した後, 12,000 rpm, 5 分間遠心処理し, 上清をテンプレート DNA として使用した (直接法). また, CMGS 培地の培養液も滅菌生理食塩水で 2 回洗浄した後, 沈査を 200 μ l の滅菌蒸留水に浮遊させた. これを直接法と同様に加熱して遠心処理した上清をテンプレート DNA として使用した (培養法). プライマーには BAS-1/2 (A 型毒素), BBS-1/2 (B 型), BCS-1/2 (C 型), BDS-1/2 (D 型), BES-1/2 (E 型), BFS-1/2 (F 型) および BGS-1/2 (G 型) (TaKaRa) を用いた. 反応液組成および PCR 条件は取り扱い説明書に従った. サーマルサイクラーには ASTEC-PC700 を使用した. 反応後, 10 μ l を TAE Buffer で調整した 2% アガロースゲルを用いて電気泳動した. 泳動後, エチジウムブロマ이드染色により増幅 DNA を検出し, 写真撮影した.

3) ボツリヌス菌の分離と同定

ボツリヌス菌の分離には常法⁹⁾ に従い卵黄を加えた分離培地を使用した. 毒素が検出された培養液を, 抗生物質 (サイクロセリン 250 μ g/ml, スルファメトキサゾール 76 μ g/ml, トリメトプリム 4 μ g/ml)¹⁾ と卵黄液を加えた変法 GAM 寒天培地 (ニッスイ) に画線塗抹し 30°C, 2 日間嫌気条件で培養した. リパーゼ反応がみられた集落を釣菌しグラム染色, メラーの芽胞染色, ゼラチンの液化試験, グルコースおよびマンノースの分解試験を実施した. また, 嫌気性菌同定キット API20A (日本バイオメリュー) を使用してボツリヌス菌を同定した. 分離株は CMGS 培地で 30°C, 3 日間嫌気条件で培養し, 毒素産生の確認および毒素型を決定した. また, PCR 法で毒素遺伝子を検出した.

4) 薬剤感受性試験

Sensi-Disk (BBL) を用い, 一濃度ディスク法によって実施した. 培地には変法 GAM 寒天培地を使用し, 30°C, 24 時間嫌気条件で培養後判定した. 使用薬剤にはゲンタマイシン (GM), テトラサイクリン (TC), ペニシリン (PCG), バンコマイシン (VCM), ホスホマイシン (FOM), エリスロマイシン (EM), クロラムフェニコール (CP), ナリジクス酸 (NA) の 8 種類を使用した.

結果および考察

1. 毒素の検出

毒性試験の結果を Table 2 に示した. 直接法では 7, 10 病日目の糞便から毒素が検出された. マウスは各々約 9 時間後, 約 24 時間後に斃死した. 培養法では 7, 10, 63 および 79 病日目の糞便から毒素が検出された. マウスはそれぞれ約 2 時間後に斃死した. 一方, エリスロマイシンが投与された後の 94, 115 病日目の糞便, ベビーフードおよびサツマイモからは, 培養法においても毒素は検出されなかった. また, 加熱処理した上清からはいずれも毒素は検出されず, 毒素が易熱性で無毒化されたことが確認された. 毒素型はすべて A 型であった.

Table 2. マウスによる毒性試験結果

被検材料 毒素試料液	糞 便						離乳食・食材		
	7 病日目	10 病日目	63 病日目	79 病日目	94 病日目	115 病日目	ベビーフード ド(開封済み)	ベビーフード ド(未開封)	サツマイモ
乳剤上清* ¹	斃死(約 9 時間後)	斃死(約 24 時間後)	生存	生存	生存	生存	生存	未検査	生存
培養上清* ²	斃死(約 2 時間後)	斃死(約 2 時間後)	斃死(約 2 時間後)	斃死(約 2 時間後)	生存	生存	生存	生存	生存
培養上清 (加熱処理)* ³	生存	生存	生存	生存					

毒素試料液をマウス腹腔内に 0.5 ml 注射後, 4 日間観察

*¹ 被検材料をゼラチン希釈液で乳剤とし 4℃ に 1 晩静置した上清

*² 培養上清をゼラチン希釈液で 5 倍希釈したもの

*³ 培養上清を 100℃, 10 分間加熱処理したもの

Table 3. PCR 法で検出されたボツリヌス毒素遺伝子

被検材料 テンプレート DNA	糞 便						離乳食・食材		
	7 病日目	10 病日目	63 病日目	79 病日目	94 病日目	115 病日目	ベビーフード (開封済み)	ベビーフード (未開封)	サツマイモ
乳 剤* ¹	A, B* ³	A, B	—	—	—	—	—	未検査	—
培養液* ²	A, B	A, B	A, B	A, B	—	—	—	—	—

*¹ 被検材料の乳剤を 100℃, 10 分間加熱処理したもの

*² 培養液を 100℃, 10 分間加熱処理したもの

*³ A 型および B 型の両毒素遺伝子を検出したもの

—: 不検出

Fig. 1. 糞便, ベビーフードおよびサツマイモの増菌培養液から PCR 法で検出されたボツリヌス毒素遺伝子

Lane A: A 型毒素プライマー
Lane B: B 型毒素プライマー
Lane C: C 型毒素プライマー
Lane D: D 型毒素プライマー

Lane E: E 型毒素プライマー
Lane F: F 型毒素プライマー
Lane G: G 型毒素プライマー
Lane M: 100 Base-Pair Ladder

2. 毒素遺伝子の検出

Table 3 に PCR 法による毒素遺伝子の検出状況を示した。直接法では 7, 10 病日目の糞便からそれぞれ A 型 (増幅 DNA 284bp) および B 型 (314bp) の両毒素遺伝子が検出された。培養法では 7, 10, 63 および 79 病日目の糞便からそれぞれ A 型および B 型の両毒素遺伝子が検出された。Fig. 1, 2 に 7 病日目の糞便についての毒素遺伝子を示した。エリスロマイシンが投与された後の 94, 115 病日目の糞便, ベビーフードおよびサツマ

イモからは, 培養法においても毒素遺伝子は検出されなかった。この結果, 63 病日目には腸管内のボツリヌス菌はかなり減少しているが, まだ完全には陰性化しておらず, 長期にわたって保菌していることが推察された。しかし, 94 病日目には投与されたエリスロマイシンによって菌陰性化したものと思われた。

3. ボツリヌス菌の分離

ボツリヌス菌は 7, 10 病日目の糞便から分離された。63, 79 病日目の糞便からは, 培養法において毒素および

Fig. 2. 糞便, 分離株および対照株から PCR 法で検出されたボツリヌス毒素遺伝子

Lane 便: 7 病日目の糞便
株: 分離株
A: A 型株 (A: A-NIH)

Lane B: B 型株 (Bp: B-Lamanna)
E: E 型株
M: 100 Base-Pair Ladder

毒素遺伝子が検出されたにもかかわらず菌分離はできなかった。これは少なくなったボツリヌス菌の増殖を他の嫌気性菌が抑制したためではないかと考えられた。分離株からも Fig. 2 に示すように A 型および B 型の両毒素遺伝子が検出されたが、毒素は A 型の産生性しか認められなかった。そのため毒素が検出された培養上清をトリプシン処理 (1% トリプシン (Difco 1:250) 加 0.2 M リン酸緩衝液を等量加えて 37°C, 1 時間反応)⁶⁾ して毒素中和試験を実施した。その結果、B 型毒素の活性化は認められず、分離株が保有している B 型毒素遺伝子は、生物活性を有する B 型毒素を産生できない silent gene と思われた。また、ボツリヌス菌は生化学的性状によって 4 群に分類されている⁹⁾ が、分離株はリパーゼ反応 (+), ゼラチン液化 (+), グルコース分解 (+) およびマンノース分解 (-) であったことから第 I 群に群別された。

4. 分離菌株の薬剤感受性

分離株はテトラサイクリン, バンコマイシン, エリスロマイシン, クロラムフェニコールおよびナリジクス酸に感受性を示した。ゲンタマイシン, ペニシリンおよびホスホマイシンには耐性であった。特に、テトラサイクリン, エリスロマイシンおよびクロラムフェニコールの 3 剤には感受性が高かった。

5. 感染源

乳児ボツリヌス症の感染源として蜂蜜がボツリヌス菌の媒介物であることは知られている¹⁰⁾ が、今回発症した患児には蜂蜜の投与はされていなかった。また、離乳食のベビーフードや食材のサツマイモからは毒素やボツリヌス菌は検出されず、感染源の特定はできなかった。

これまでにわが国で発生した乳児ボツリヌス症のうち 1989 年 10 月までの 12 例にはすべて蜂蜜の摂取歴があり、そのうち 7 例の蜂蜜からはボツリヌス菌が検出され

ている¹¹⁾。しかし、それ以後に発生している 4 例の乳児ボツリヌス症には、不明の 1 例を除き蜂蜜の摂取歴はなく、野菜スープが原因として推定されたものなど、蜂蜜以外の食品などが感染経路として疑われている⁹⁾。そのため、今回は実施できなかったが、感染源の究明においては、土壌や塵埃など、患児周辺の環境調査も必要と考えられた。

ま と め

1999 年 3 月に広島県で初めての乳児ボツリヌス症が発生した。患児糞便から分離された A 型ボツリヌス菌は、PCR 法による検査で A 型および B 型の両毒素遺伝子を保有していることが確認された。しかし、毒素中和試験の結果から、B 型毒素遺伝子は生物活性のある B 型毒素を産生できない silent gene と思われた。ボツリヌス菌は 79 病日目においても菌数の減少傾向はみられたが陰性化せず、長期間保菌することが明らかとなった。しかし、その後のエリスロマイシンの投与によって 94 病日目には完全に陰性化した。本症例では蜂蜜の摂取歴はなく、離乳食などからもボツリヌス菌は検出されなかったことから、感染源の特定には至らなかった。

謝 辞

終わりに、貴重な菌株の分与をしていただいた、岡山大学医学部細菌学教室の小熊恵二教授に深謝致します。

文 献

- 1) Dezfulian, M., McCroskey, L. M., Hatheway, C. L. and Dowell, V. R.: Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human faces. J. Clin. Microbiol., 13, 526-531 (1981).

- 2) 伊藤 武, 五十嵐英夫, 柳川義勢, 松下 秀, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 工藤泰雄: 腸管感染症・食中毒. 国立公衆衛生院平成9年度特別課程細菌コース教材(1998).
- 3) 門間千枝, 柳川義勢, 五十嵐英夫, 伊藤 武, 金原博子, 麻生誠二郎, 大川澄男: 自家製野菜スープが原因と推定される乳児ボツリヌス症—東京都. 病原微生物検出情報月報, **17**, 241 (1996).
- 4) 野田弘昌: 乳児ボツリヌス症について. メディヤサークル, **33**, 125-132 (1988).
- 5) 野田弘昌, 杉田克生, 小池明美, 那須 武, 高橋元秀, 清水朋子, 大井 清: 本邦初の乳児ボツリヌス症の1例. 感染症誌, **61**, 1005 (1987).
- 6) 小熊恵二, 井上 薫, 藤永由佳子, 武士甲一: ボツリヌス菌. 臨床検査, **41**, 646-654 (1997).
- 7) 小熊恵二, 中嶋 洋, 武士甲一: 乳児ボツリヌス症. 臨床と微生物, **25**, 179-187 (1998).
- 8) Pickett, j., Berg, E., Chaplin, E. and Brustetter, M.: Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. N. Engl. J. Med., **295**, 770-772 (1976).
- 9) 阪口玄二: *Clostridium botulinum*. 食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編集, p. 360-383, 中央法規出版, 東京 (1991).
- 10) 阪口玄二: 蜂蜜による乳児ボツリヌス症. モダンメディア, **34**, 123-132 (1988).
- 11) 特集ボツリヌス症. 病原微生物検出情報月報, **21**, 49-50 (2000).