

2) 2012年6月、熊本県で発生した原因不明ボツリヌス症について

古川真斗 徳岡英亮*¹ 高本芳寿*² 椎葉加奈*³
濱本愛*³ 木下まり*⁴ 天野朋子*⁴ 原田誠也

要旨

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生した。本研究所で患者血清からのボツリヌス毒素検出及び糞便からのボツリヌス菌分離を実施したところ、患者便からA型及びB型毒素遺伝子を保有したボツリヌス菌が分離され、マウスを用いたボツリヌス毒素中和試験によりA型毒素の産生が確認された。このことから、本症例の原因菌はサイレントのB型毒素遺伝子を保有したA型ボツリヌス菌であることが明らかとなったが、感染源は不明であった。

患者には抗毒素血清が投与され、一時回復の兆しが見られたものの、発症から約1ヵ月後に容態が急変し、心肺停止により死亡した。

キーワード：ボツリヌス症，ボツリヌス毒素中和試験，A型ボツリヌス菌

はじめに

ボツリヌス症は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、又は *Clostridium butyricum*、*Clostridium baratii* などが産生するボツリヌス毒素により発症する神経、筋の麻痺性疾患で、感染経路により食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷ボツリヌス症、及び成人腸管定着ボツリヌス症の4つに分類される。食餌性ボツリヌス症は、ボツリヌス毒素に汚染された食品を摂取することによって発症するボツリヌス菌食中毒で、初期症状として視力の低下や眼瞼下垂などの視覚障害を訴え、吐き気や全身の筋弛緩などの症状を呈する。重症の場合は、呼吸器筋の麻痺による呼吸不全で死亡することもあり、致死率は他の食中毒に比べてかなり高く、10~20%に達する。国内のボツリヌス菌食中毒は1951年から2011年までに118事例報告されており、うち104事例は「いずし」を原因としたE型ボツリヌス菌である。残りの11事例はA型、3事例はB型ボツリヌス菌によるものである。表1に過去5年分のA型ボツリヌス菌食中毒事例についてまとめたが、原因食品が断定される事例は極めて稀である。

本症の主要原因菌であるボツリヌス菌は、グラム陽性の嫌気性有芽胞桿菌で、土壌中に芽胞の形で広く生息している。本菌は非常に強力なボツリヌス毒素を産生し、毒素の抗原性の違いによりA型~G型に分類される。ヒトに対してA、B、E型が主に中毒を起こすと言われているが、稀にF型による中毒も認められる¹⁻³⁾。

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生し、管轄保健所経由で患者の血清及び便が搬入された。本所で検査を実施したところ、便からサイレントのB

表1 過去5年のA型ボツリヌス菌による食餌性ボツリヌス症発生件数

発生年	発生地	患者数	原因食品
2008	栃木県	1	不明
2009年は事例なし			
2010	船橋市	1	不明
2011	広島市	1	不明
2012	鳥取県	2	パック詰めあずきばっとう
2012	熊本県	1	不明

*1 現熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課
*2 県央広域本部宇城地域振興局保健福祉環境部
*3 県南広域本部八代地域振興局保健福祉環境部
*4 健康保険熊本総合病院

型毒素遺伝子を保有する A 型ボツリヌス菌が検出された。国内におけるボツリヌス症の発生件数は少なく、貴重な症例であり、毒素確認試験や生化学的性状の確認等の詳細な細菌学的検討を実施したので報告する。

材料と方法

(1) 症例

患者は 76 歳の男性で、既往歴は特段なく健康であった。ところが、2012 年 6 月 14 日、太極拳練習中に胸のつかえを初期症状として腹痛、嘔気・嘔吐を呈し、近隣の医療機関を受診して、点滴などの治療を受けた。翌 15 日、腹部の症状は改善したものの、両上肢の麻痺や複視、嚥下障害や言語障害が出現した。さらに翌 16 日も神経症状が続いたため、再度近隣の医療機関を受診した。そこで、総合病院を受診を勧められて受診し、すぐに入院となった。総合病院では、複視、構音障害、嚥下障害、左上下肢の失調症状、右上肢の軽度麻痺、及び拮抗障害等が確認されたことから左脳幹部の梗塞が疑われ、入院加療が開始された。その後、嚥下障害や構音障害が徐々に増悪し、18 日には眼瞼下垂も出現した。これらの臨床症状及び 20 日に実施された MRI 検査や髄液検査等の所見から脳梗塞、重症筋無力症及びギランバレー症候群は否定的となった。そのような中、ボツリヌス症の可能性が考えられたため、21 日に本所へ細菌学的検査が依頼された。同日、患者に対し、ボツリヌス抗毒素血清が投与されたが、一時呼吸停止となり人工呼吸器が装着された。また翌 22 日に 2 回目のボツリヌス抗毒素血清が投与され、自発呼吸や動きがみられるなど一時回復傾向にあったが、発症して約 1 ヶ月後に容態が急変し、心肺停止により死亡した。

(2) 検査材料

2012 年 6 月 20 日に採取され、21 日に本所へ搬入された患者検体（血清、便）及び後日搬入された患者の家族の検体（便）を検査材料とした。

(3) 検査方法

まず、血清からのボツリヌス毒素検出と、便からのボツリヌス菌の分離を行った。

1) 患者血清中のボツリヌス毒素検出（マウス試験）

患者血清中のボツリヌス毒素検出するため、患者血清 0.5ml をマウス（ddY, 4 週齢, 雄）の腹腔内に投与し、マウスの症状を 1 週間観察した。

2) 便からのボツリヌス菌分離

便はゼラチン希釈液で 10 倍乳剤とした。その後、60℃・15 分、80℃・30 分で加熱処理したもの、及び未処理のものをそれぞれ卵黄加変法 GAM 寒天培地（日

水製薬）、卵黄加 CW 寒天培地（日水製薬）に画線塗抹し、嫌気培養を行った。また、0.3% グルコースと 0.2% スターチを加えた強化クックドミート培地（Oxoid）に接種し、30℃で 1 週間嫌気培養を行った。

その後、便検体中のボツリヌス菌の有無は以下のようにして確認した。まず、便検体を未処理及び加熱処理後、直接画線塗抹し、一夜嫌気培養した分離培地上のコロニー密集部からスweep PCR 法⁴⁾によりボツリヌス毒素遺伝子（A 型、B 型、C 型、D 型、E 型、F 型）の検査を行った。いずれかの毒素遺伝子が検出された場合、リパーゼ反応陽性のボツリヌス菌様集落を釣菌し、単独コロニーについて、再度 PCR 法により毒素遺伝子の確認を行った。毒素遺伝子が確認されたコロニーを純培養後、タンパク分解性試験、ゼラチン液化試験、及び糖加 GAM 半流動寒天培地を用いた糖分解試験（グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、白糖、トレハロース）等の生化学的性状試験を実施した。なお、糖分解試験の判定には BTB-MR 試薬を使用した。

3) 分離株のボツリヌス毒素産生試験及び中和試験

毒素遺伝子陽性の分離株を強化クックドミート培地で 30℃で 1 週間嫌気培養した。その培養液の遠心上清について、無処理、100℃・10 分処理、A 型及び B 型抗毒素による中和処理を行った。なお中和処理は、遠心上清と等量の各抗毒素血清を加え、37℃で 30 分間反応させた⁵⁾。マウス試験は (3) の 1) と同様に実施した。なお、患者便 1g 中の菌数は、菌分離に用いた 10 倍乳剤を、さらにゼラチン希釈液で段階希釈し、100 倍希釈及び 1000 倍希釈を行った。各希釈段階の液を卵黄加 GAM 寒天培地 2 枚に 100µl ずつ接種し、コンラージ棒で塗抹した。30℃で 48 時間嫌気培養後、各平板の菌数を測定し、その平均値を便 1g 中の菌数とした。

結果

(1) 血清中のボツリヌス毒素確認検査

患者血清を接種したマウスは、ボツリヌス毒素特有の症状（腹部の陥没など）を示さず、1 週間後も生存していた。このことから、ボツリヌス毒素は不検出であった。

(2) 便からのボツリヌス菌分離

患者便及び家族便を直接接種した分離平板からスweep PCR 法でボツリヌス毒素遺伝子の検出を試みたところ、患者便の平板のみから A 型及び B 型のボツリヌス毒素遺伝子が検出された（図 1）。そこで、分離培地上でリパーゼ反応陽性を示すボツリヌス菌様集落を

表2 ボツリヌス菌（分離株，Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ群菌）及び類縁菌の生化学的性状

	分離株	群				<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	<i>butyricum</i>	<i>baratii</i>
毒素型	A(B:サイレント)	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
タンパク分解性	+	+	-	-	+	-	-
ゼラチン液化	+	+	+	+	+	-	-
リパーゼ産生	+	+	+	±	-	-	-
糖分解							
グルコース	+	+	+	+	-	+	+
フルクトース	+	±	+	±	-	+	+
マンノース	-	-	-	-	-	+	+
マルトース	+	±	+	±	-	+	+
白糖	-	-	-	+	-	+	+
トレハロース	-	-	+	-	-	+	-

釣菌し，再度 PCR 検査を行ったところ，A 型及び B 型の毒素遺伝子を保有した株を得ることができた。この株の生化学的性状試験を実施したところ，結果は表 2 のとおりとなった。このことから，本事例の分離株はタンパク分解性のⅠ群菌に分類されることが分かった。なお，家族の便からは，ボツリヌス毒素及びボツリヌス菌ともに検出されなかった。

(3) 分離株のボツリヌス毒素産生試験及び中和試験
強化クックドミート培地で 30℃，1 週間嫌気培養した分離株の培養液を用いてマウスによる毒素産生試験及び中和試験を行ったところ，無処理及び B 型抗毒素処理検体投与マウスはボツリヌス毒素特有の症状を呈して死亡した（図 2）。一方，100℃・10 分処理及び A 型抗毒素処理検体を投与したマウスは生存した。

(4) 便中のボツリヌス菌の菌数測定
患者便中のボツリヌス菌数測定を行ったところ，菌数の平均値は 2.0×10^5 cfu/g であった（図 3）。



図2 毒素産生試験に使用したマウス（無処理群）
ボツリヌス症状に特徴的な腹部の陥没が観察される。

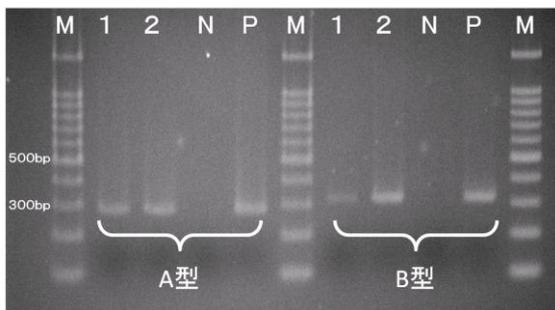


図1 PCR 法による毒素遺伝子検出結果

M: 100bp ladder maker, 1 及び 2: 分離平板上のリパーゼ反応陽性コロニー, N: negative control, P: positive control



図3 ボツリヌス菌測定時の変法 GAM 寒天培地
リパーゼ反応陽性コロニーを推定ボツリヌス菌として便 1g 中の菌数を算定した。

考 察

本県では、1986年に土産用の真空包装の辛子レンコンによるA型ボツリヌス菌食中毒が発生した。この事例では辛子レンコンを食した県外の患者11名の死亡が報告されているが、本県に患者発生はなく、今回のボツリヌス症例は本県初の事例であった。

保健所の疫学調査によると、本事例の患者は日頃から家族と同じ食事を摂っていたが、たまたま患者だけが発症日の2日前に市販のパック詰めカレーを食べたということであった。残念ながら、患者宅に残品が残っておらず、検査はできなかったものの、同時期にボツリヌス症の発生報告がないため、このカレーが原因とは考えにくい。また、A型ボツリヌス菌は、土壌などの環境中から分離されることが知られており⁶⁾、ハウスダストや土壌等からの感染も考えられたが、こちらも調査ができず、原因究明までには至らなかった。なお、家族に症状はなく、便検査でもボツリヌス毒素及び菌ともに検出されなかった。

通常、ボツリヌス菌の分離培養は、30°Cで2~3日嫌気培養を行うことになっている。しかし、今回の事例では、小さいコロニーではあったが、一夜培養で2個だけリパーゼ反応陽性のボツリヌス様コロニーが確認され、PCR法で迅速にA型及びB型毒素遺伝子が検出することができた。このことから、臨床症状からボツリヌス症が疑われる場合、直接分離培養1日目から、発育状況の確認が必要だと思われる。また本事例は、食餌性ボツリヌス症の可能性が高いと思われたが、通常食餌性ボツリヌス症では、患者便から直接培養で菌が分離されることは稀であり、症状の経過が長かったことから、成人腸管定着ボツリヌス症であった可能性も否定できない。

なお、今回の事例はサイレントのB型毒素遺伝子を保有するA型ボツリヌス菌による事例であったが、同年3月に鳥取県で発生した岩手名産の「あずきばっとう」による事例⁷⁾でも、同じタイプのA型ボツリヌス菌が検出されている。事例の発生時期が近いことから分離株の異同が気にかかるところである。

まとめ

2012年6月、本県でボツリヌス症疑いの患者が発生した。患者便を直接塗抹した分離培地からA型及びB型遺伝子を保有したボツリヌス菌が検出され、マウスによる中和試験でサイレントのB型毒素遺伝子を保有するA型ボツリヌス菌であることが判明した。本症例は本県初のボツリヌス症例であった。

文 献

- 1) Sakaguchi G: *Pharmacol. Ther.*, **19**, 165-194 (1982).
- 2) 阪口玄二: 食中毒, 358-408 (1981).
- 3) 武士甲一: 新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 492-513 (2000).
- 4) Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, Sunagawa H, Ohyama T: *Microbiol. Immunol.*, **40**, 5-11 (1996).
- 5) 坂井千三, 伊藤武: 臨床と細菌, **4**, 15-20 (1977).
- 6) 仲西寿男, 丸山務: 食品由来感染症と食品微生物, 456-467 (2009).
- 7) 上田 豊, 花原悠太郎, 坂本智宏, 村松 毅, 北村勝, 百瀬愛佳, 朝倉 宏, 岡田由美子, 五十君静信, 岩城正昭, 加藤はる, 柴山恵吾: 病原微生物検出情報, **33**, 218-219 (2012).