

## [症 例]

臨床情報による的確な検体処理で *Clostridium tetani* の分離に  
成功した破傷風の一例

大橋一孝<sup>1)</sup>・河合裕美<sup>1)</sup>・渡邊美菜子<sup>1)</sup>・山本詩子<sup>1)</sup>・岡崎恵美<sup>1)</sup>・高野由喜子<sup>1)</sup>  
 早川希威<sup>1)</sup>・佐藤敏夫<sup>1)</sup>・大花 昇<sup>1)</sup>・山本夏男<sup>2)</sup>・今福裕司<sup>2)</sup>・塚田泰彦<sup>3)</sup>  
 須釜久美子<sup>5)</sup>・小黒祐子<sup>5)</sup>・山本明彦<sup>4)</sup>・高橋元秀<sup>4)</sup>・金光敬二<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 福島県立医科大学附属病院 検査部

<sup>2)</sup> 福島県立医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座

<sup>3)</sup> 福島県立医科大学附属病院 救急科

<sup>4)</sup> 国立感染症研究所 細菌第二部

<sup>5)</sup> 福島県衛生研究所

(平成 22 年 8 月 23 日受付, 平成 22 年 12 月 25 日受理)

破傷風は破傷風菌 (*Clostridium tetani*) が産生する神経毒素により強直性痙攣など重篤な神経症状を引き起こす致死率の高い感染症である。*C. tetani* は土壤中に常在しており, 創傷部位から体内に侵入した菌が毒素を産生することで発症する。原因菌の *C. tetani* は分離培養が難しく, 通常は外傷の既往と破傷風特有の臨床症状などから診断され治療が行われており, 菌が分離同定されることはまれである。今回われわれは創傷部位の組織片より菌を分離し, 細菌学的特徴および毒素の確認により *C. tetani* と同定しえた症例を経験したので報告する。症例は 50 歳女性, 引っ越し作業中に左下腿部を受傷, その後嚥下障害および開口障害から全身硬直となり救急搬送された。搬送直後の微生物検査依頼時に破傷風疑いのコメントがあり, 迅速な検体処理と嫌気培養が行えたことにより菌体の分離に成功した。

**Key words:** tetanus, *Clostridium tetani*, tetanospasmin

破傷風は破傷風菌 (*Clostridium tetani*) が産生する破傷風毒素 (tetanospasmin) により強直性痙攣など重篤な神経症状を引き起こす感染症である。通常, 感染症の診断においては感染部位の特定と起因菌の分離同定が重要となるが, 破傷風菌は極めて微細な創傷部位からも侵入し感染部位の特定ができない場合も多く<sup>1)</sup>, また培養も困難である。しかし, 発症した場合の症状は重篤で致死率も高く早期の診断と治療が必要とされるため, 通常は開口障害や強直性痙攣など破傷風特有の臨床症状および外傷の既往などから診断がなされ, 菌の分離同定を待たずに治療が開始される。破傷風は感染症法の 5 類感染症全数把握疾患に定められ

ており, 診断した医師は 7 日以内に届け出が必要となっているが, その報告基準は「外傷の既往と臨床症状などから破傷風が疑われる場合」であり必ずしも菌の分離同定を必要とはしていない。しかし, 感染部位 (創傷部位) からの破傷風菌の分離同定および分離菌から神経毒素の検出がされれば診断はより確実なものとなる。今回われわれは, 創傷部位の組織片より菌を分離し, 細菌学的特徴および毒素の確認により *C. tetani* と同定しえた症例を経験したので報告する。

## 症 例

患 者: 50 歳 女性

主 訴: 全身硬直

既往歴: 特記事項なし

家族歴: 特記事項なし

現病歴: 2009 年 8 月中旬, 農家の引っ越し作業中に左下腿部を受傷。その後腫脹が激しかったが病院は受診しなかった。8 月 30 日夕食時より嚥下障害およ

著者連絡先: (〒960-1295) 福島県福島市光が丘1番地  
 福島県立医科大学附属病院検査部  
 大橋一孝  
 TEL/FAX: 024-547-1472  
 E-mail: kazu-nol@fmu.ac.jp

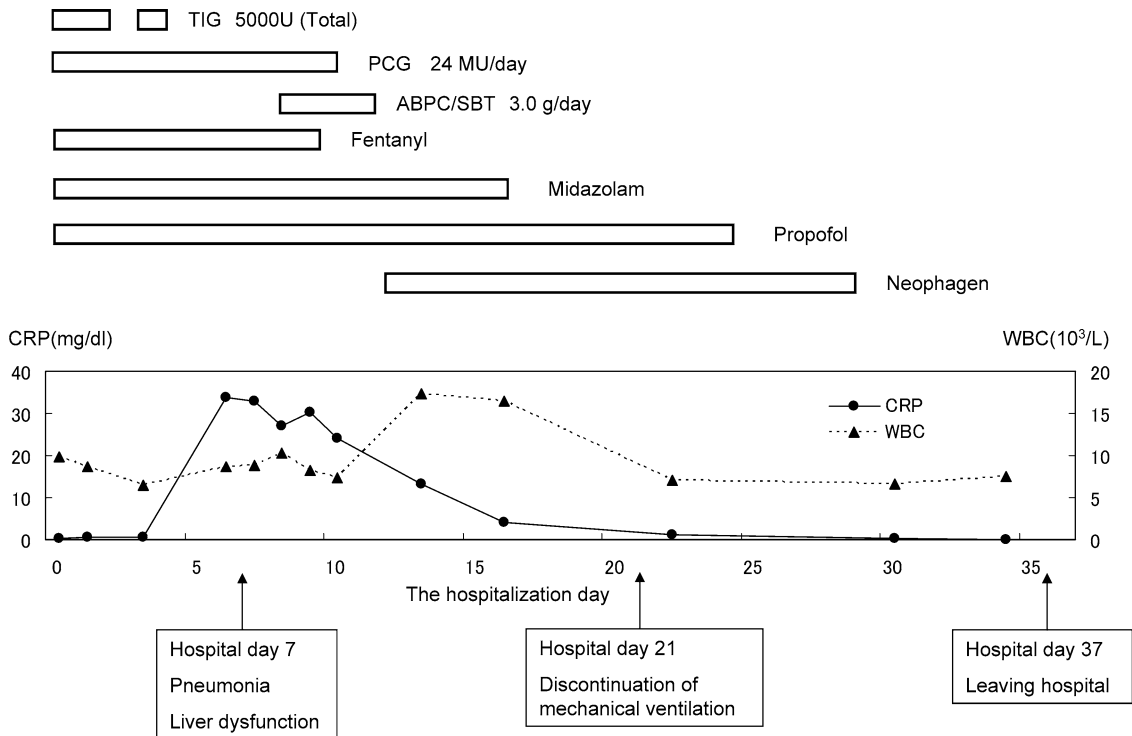


Fig. 1. Clinical course

TIG: Human anti-tetanus immune globulin, PCG: Penicillin G, ABPC/SBT: Ampicillin/Sulbactam, CRP: C-reactive-protein, WBC: White blood cell count

び開口障害が出現，8月31日夜から起き上がれない状態となる。9月1日全身が硬直しているのを家族が発見し救急搬送依頼。当初，近医において脳梗塞疑いで治療が実施されたが，症状および左下腿部の傷から破傷風が疑われ当院へ搬送された。

臨床経過：体温 37.5°C，血圧 194/113 mmHg，心拍数 110/分，呼吸 19回/分，入院時検査所見は CK 847 IU/L と筋逸脱酵素の上昇と，WBC 9,900/ $\mu$ l，CRP 0.33 mg/dl と軽度炎症反応を認めた。全身硬直およびその他の臨床症状より破傷風と診断され，受傷部位のデブリードマンおよび抗破傷風人免疫グロブリン (TIG)，ペニシリン G (PCG) 投与による治療が開始された。7 病日目より CRP の急激な上昇が見られ肺炎の合併が疑われたためアンピシリン/スルバクタムが投与された (Fig. 1)。その後症状は徐々に改善し 37 病日目に破傷風による後遺症のリハビリ目的で他院へ転院となった。

細菌学的検査：当院搬送直後に行われた受傷部位のデブリードマン時に採取された左下腿部の組織が細菌検査目的で提出され，破傷風疑いとの検査依頼情報記

載があったため塗抹鏡検と同時に嫌気培養を実施した。滅菌試験管内で検体組織を破碎し，滅菌生理食塩水を加えて 3,000 rpm 10 分遠心後，遠心沈査を血液寒天培地と GAM 半流動培地に接種し 35°C で一晚嫌気培養および好気培養を行った。嫌気培養には Thermo Forma Anaerobic System (Thermo Fisher Scientific 社製) を使用した。さらに遠心沈査をスライドガラスに塗抹し，グラム染色による鏡検観察を行ったが *C. tetani* を疑う端在性に芽胞を有する太鼓バチ状の桿菌は認められなかった。嫌気培養で *C. tetani* に特徴的な縮毛状に遊走を示すコロニーを認めたためコロニーの辺縁部より菌を採取しグラム染色および芽胞染色 (Wirtz 法) による鏡検を行い，端在性に芽胞を有する桿菌を認めた (Fig. 2)。同時に血液寒天培地と GAM 半流動培地に接種して増菌，純培養を行い，純培養したコロニーを用いて嫌気性菌簡易同定キット (Rap ID ANAII SYSTEM: 株式会社アムコ製) による同定を試みたが，インドール試験陰性で Arginine- $\beta$ -naphthylamid 反応のみ陽性となり，*C. tetani* の同定確率が 67.18%，*C. novyi* A 18.76%，*E.*

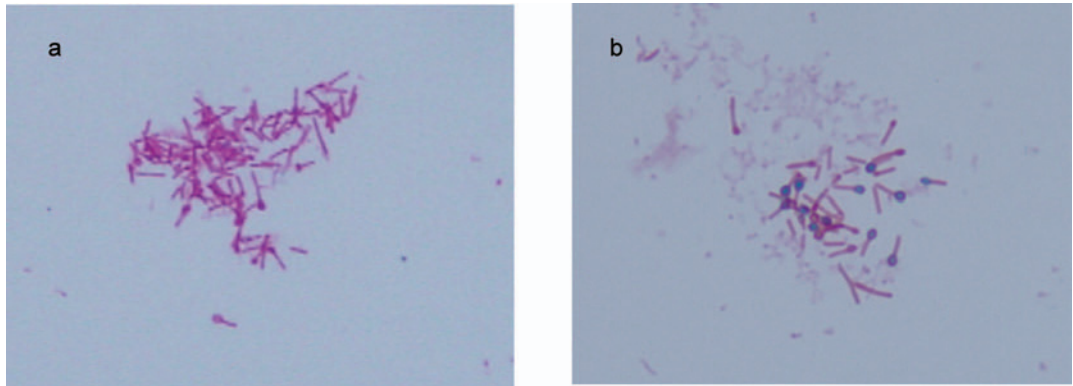


Fig. 2. Spore stain of *Clostridium tetani*  
a: Gram staining, b: Spore staining (Wirtz method)

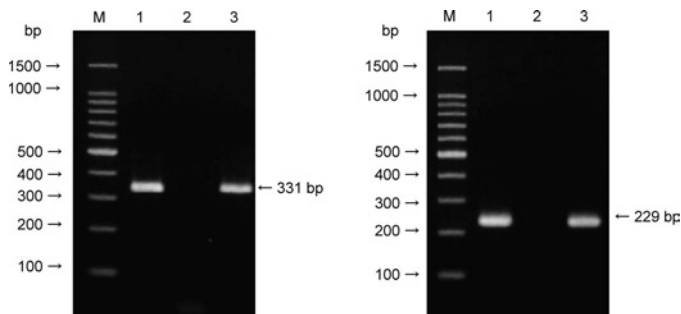


Fig. 3. Detection of tetanospasmin gene by PCR  
a: Primer pairs were GAT1 and GAT2. The expected size for tetanospasmin gene is 331 bp, b: Primer pairs were GAT5 and GAT6. The expected size for tetanospasmin gene is 229 bp. M: size marker, 100 bp ladder; Lane 1: strain of this sample; Lane 2: blank; Lane 3: positive control.

*lentum* 12.18% と菌種を確定するに十分な値が得られなかった。しかし、鏡検による菌の形態およびコロニーの特徴などから *C. tetani* を強く疑い、福島県衛生研究所および国立感染症研究所に依頼し、破傷風毒素産生遺伝子と破傷風毒素の検出を行った。

PCR による破傷風毒素 (tetanospasmin) 産生遺伝子の検出: 福島県衛生研究所微生物課において加藤らの方法<sup>2-4)</sup> に従い PCR による毒素産生遺伝子の検出を行った。純培養した本症例菌株および陽性対象として過去に *C. tetani* と同定され福島県衛生研究所で保存していた臨床分離株より DNA を抽出し、tetanospasmin の L 鎖をコードしている遺伝子上に設定した 2 組のプライマーペア (GAT1: 5'-GATGATACGTATGCCAATAACC-3', GAT2: 5'-TAAGGCTTCACCTGCTACATTG-3') および (GAT5: 5'-CTACATGGTTTATACGGAATGCAGG-3', GAT6: 5'-GATCATTGCAGCTAGTGA

CTTGC-3') を用いて PCR による遺伝子の増幅を行った。2% アガロースゲルで PCR 増幅産物を電気泳動し、エチレンジウムプロマイド染色によりそれぞれ増幅された 331 bp と 229 bp のバンドを確認した (Fig. 3)。

マウスを用いた破傷風毒素の検出: 国立感染症研究所細菌第二部においてマウスを用いた毒素の検出を行った。当該菌株の培養ろ液をマウスに接種したところ破傷風様症状を示し、あらかじめ破傷風抗毒素抗体を接種したマウスには症状が見られなかったことから、本菌株培養ろ液中に *C. tetani* の産生する神経毒素が確認された。

これらの結果により、本菌株は毒素産生性の *C. tetani* と同定された。

## 考 察

*C. tetani* は土壤中に広く存在しており、創傷部位より体内に侵入することで感染する。日本における土壤

からの *C. tetani* の検出率は 30% 前後と報告されており<sup>5)</sup> 日常 *C. tetani* と接触する可能性は避けられない。本邦における患者数は 1950 年頃には年間約 2,000 人が報告されているが、1952 年の破傷風トキソイドワクチンの導入と 1968 年のジフテリア・百日咳・破傷風混合ワクチン (DPT) 接種の開始以降急激に減少している。しかし、1990 年代以降は毎年 100 人前後と横ばいとなっている<sup>6)</sup>。患者の約 95% は、小児に対する DPT 接種が開始される以前に生まれた 35 歳以上の成人であり、破傷風抗毒素抗体の保有率が 11% 未満である<sup>5)</sup>。高齢者が増加している現在、臨床の検査室において破傷風の症例と遭遇する可能性は十分考えられる。偏性嫌気性菌である *C. tetani* の培養には非常に厳しい嫌気状態が要求されるため患者から本菌が分離同定されるのは非常にまれである。国立感染症研究所感染情報センターの報告によれば 1999 年から 2000 年に報告のあった破傷風症例 157 例中臨床材料から菌が分離されたのはわずかに 1 例となっている<sup>7)</sup>。本症例は当初前医において脳梗塞疑いで治療されており当院搬送直後のデブリードマン時に TIG および PCG 投与前の患部組織が採取できたことと、担当医から破傷風疑いであることの連絡が検査依頼情報として検査担当者に伝えられていたことにより迅速に検体を処理できたことが菌の検出につながったと考える。嫌気性菌簡易同定キットではインドール試験陰性であったことから菌種の確定には至らなかったが、菌の形態およびコロニーの特徴から *C. tetani* を強く疑い、PCR 法およびマウスを用いた毒素の確認により *C. tetani* と同定することができた。*C. tetani* 以外の遊走性のある *Clostridium* 属が混在している可能性は否定できないが、すでに報告されている症例で同様の結果が示されているものもあり<sup>8), 9)</sup>、培養と表現型の判定を基とする従来の同定法のもつ問題点と限界を示すものといえる。分子生物学的手法は従来の方法や簡易の同定キットなどで菌種同定が困難な場合の判断材料の一つとして有用な手段<sup>10), 11)</sup> であろう。今回、検査依頼時における的確な検体採取と臨床からの情報提供による迅速な検体処理によって *C. tetani* の分離に成功した。臨床と検査室間の円滑なコミュニケーションによる情報共有の重要性を再認識した症例であった。

## 謝 辞

最後に神経毒素の検出確認に協力をいただいた国立感染症研究所細菌第 2 部, 山本明彦先生, 高橋元秀先生, および福島県衛生研究所微生物課に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 本庄綾子, 加藤達夫. 2007. 破傷風の現状と問題点. 小児内科 39: 1685-1687.
- 2) 加藤直樹, 加藤はる, 渡辺邦友, 他. 1993. PCR による神経毒素産生性 *Clostridium tetani* と *Clostridium botulinum* の神経毒素遺伝子の同定. 日臨徴誌. 3: 104-109.
- 3) Eisel, U., W. Jarausch, K. Goretzki, et al. 1986. Tetanus toxin: Primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. EMBO J. 5: 2495-2502.
- 4) Nagao, K., K. Mori, C. Sawada, C. et al. 2007. Detection of the tetanus toxin gene by polymerase chain reaction: A case study. Jpn. J. Infect. Dis. 60: 149-150.
- 5) 羽根田 淳, 塩原康正, 乾 真美, 他. 2006. 相模原周辺地域における *Clostridium tetani* の分布調査. 感染症誌. 80: 690-693.
- 6) 小黒正榮. 2007. 破傷風 p. 217-224, 日常診療に役立つ小児感染症マニュアル 2007 (日本小児感染症学会編集). 東京医学社, 東京.
- 7) 福田 靖, 岩城正昭, 高橋元秀. 2002. “感染症の話. 破傷風” 感染症発生動向調査週報. 国立感染症研究所感染情報センター. [http://idsc.nih.gov/jp/idwr/kansen/k02\\_g1/k02\\_15/k02\\_15.html](http://idsc.nih.gov/jp/idwr/kansen/k02_g1/k02_15/k02_15.html) (参照 2009-09-03).
- 8) 前田順子, 畑中博子, 服部由美, 他. 2005. *Clostridium tetani* が分離された 1 症例. 医学検査 54: 52-57.
- 9) 木田兼以, 橋口 篤, 中尾登志栄, 他. 2009. 破傷風の病原体診断に至った一症例. 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所感染情報センター. <http://idsc.nih.gov/jp/iasr/30/349/dj3493.html> (参照 2009-09-09).
- 10) Kato, N., C. Y. Ou, H. Kato, et al. 1993. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 167: 455-458.
- 11) Akbulut, D., K. A. Grant, J. McLauchlin. 2005. Improvement in laboratory diagnosis of wound botulism and tetanus among injecting illicit-drug users by use of real-time PCR assays for neurotoxin gene fragments. J. Clin. Microbiol. 43: 4342-4348.

A Case of Tetanus with Successful Isolation of *Clostridium tetani*  
after Obtaining Appropriate Samples According to  
the Clinical Information

Kazutaka Ohashi<sup>1)</sup>, Hiromi Kawai<sup>1)</sup>, Minako Watanabe<sup>1)</sup>, Utako Yamamoto<sup>1)</sup>,  
Emi Okazaki<sup>1)</sup>, Yukiko Takano<sup>1)</sup>, Kii Hayakawa<sup>1)</sup>, Toshio Sato<sup>1)</sup>,  
Noboru Ohana<sup>1)</sup>, Natsuo Yamamoto<sup>2)</sup>, Yuji Imafuku<sup>2)</sup>, Yasuhiko Tsukada<sup>3)</sup>,  
Kumiko Sugama<sup>5)</sup>, Yuuko Oguro<sup>5)</sup>, Akihiko Yamamoto<sup>4)</sup>,  
Motohide Takahashi<sup>4)</sup>, Keiji Kanemitsu<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Clinical Laboratory Medicine, Fukushima Medical University Hospital

<sup>2)</sup> Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Fukushima Medical University

<sup>3)</sup> Department of Emergency, Fukushima Medical University Hospital

<sup>4)</sup> Laboratory of Bacterial Toxins, Toxoids, and Antitoxins Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

<sup>5)</sup> Fukushima Institute of Public Health

Tetanus is an infectious disease caused by the obligate anaerobic bacterium *Clostridium tetani*. It has severe symptoms such as tonic convulsions, and a high mortality rate. *C. tetani* can be found in the soil around the world, and the bacteria enter the body through a wound site, and subsequently induce infection. It grows at the site of infection, and produces tetanospasmin, which is a neurotoxin. Approximately 100 cases of this disease are reported every year in Japan. However, it is difficult to culture *C. tetani* and the identification of this bacterium is also rare. Therefore, tetanus is usually diagnosed based on the specific clinical symptoms of this disease and a history of wound infection. This report describes a case with bacteria that were isolated from the infected area, and were thereafter identified to be *C. tetani*. The tetanus toxin from this strain was determined and bacteriological features were elucidated. A 50-year-old female injured her left leg while working with farming equipment. She was transported to the hospital due to rigid body symptoms. Tissue specimens were submitted to microbiology laboratory with a suspicion of tetanus. Rapid sample processing and anaerobic culturing successfully isolated the bacteria.