

[症 例]

同定に苦慮した *Clostridium botulinum* による乳児ボツリヌス症の1症例木部泰志¹⁾・諸熊由子¹⁾・清祐麻紀子¹⁾・實藤雅文²⁾持丸朋美¹⁾・栢森裕三¹⁾・原 寿郎²⁾・康 東天^{1),3)}¹⁾九州大学病院検査部²⁾九州大学病院小児科³⁾九州大学大学院医学研究院臨床検査医学

(平成24年3月22日受付, 平成24年6月2日受理)

患者は9カ月の女児。哺乳不良で近医を受診され、意識障害があるとして急性脳症として治療されたが症状は改善せず、当院へ転院となった。転院時の検査で炎症所見やその他の異常は認めなかったが、呼吸状態の悪化や脳神経と四肢の麻痺が出現し、乳児ボツリヌス症が疑われ便培養が提出された。塗抹検査で亜端在性有芽胞グラム陽性桿菌が優位であり、嫌気培養で遊走を示すコロニーが分離された。同定キットで *Clostridium difficile* と同定されたが、コロニーの特徴は *C. difficile* と大きく異なり、臨床症状からも *Clostridium botulinum* が強く疑われた。その後、外部機関で *C. botulinum* と同定され、A型毒素が証明されたことより乳児ボツリヌス症の診断に至った。本菌の分離には臨床との情報交換が不可欠であった。また現行キットでの菌種確定は困難で誤同定されることもあるため、疑わしい菌が分離された場合は直ちに外部機関に精査を依頼すべきである。

Key words: 乳児ボツリヌス症, *Clostridium botulinum*, 有芽胞グラム陽性桿菌, 遊走, 同定キット

序 文

Clostridium botulinum は亜端在性芽胞を有する偏性嫌気性グラム陽性桿菌で、主に土壌に存在し、A~G型7種の神経毒素を産生するボツリヌス症の原因菌である¹⁾。ボツリヌス症は大きく四つに分けられ、食餌性ボツリヌス症、創傷ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、成人腸管感染毒素型ボツリヌス症がある¹⁾。乳児ボツリヌス症は、生後1歳未満の乳児が主に食物中(ハチミツなど)の芽胞を経口的に摂取し、消化管で発芽、増殖した菌が産生する毒素によって発症する疾患である。7種の毒素のうち、A, B, E, F型がヒトに有害であるとされているが、乳児ボツリヌス症は主にA, B型菌によって引き起こされる²⁾。症状としては、便秘、嚥下障害、泣き声の低下、首が据わらない、無

表情などがあり、進行すると呼吸麻痺や気道閉塞を起こして死に至ることがある^{1),3)}。乳児ボツリヌス症の治療は主に呼吸管理で、抗血清や抗菌薬を使用することは少ない。死亡率は一般的に2~5%とされ、重大な合併症などが無い限り、後遺症なく回復する⁴⁾。今回われわれは、初回同定検査で *Clostridium difficile* と誤同定された乳児ボツリヌス症を経験したので報告する。

症 例

患 者：9カ月, 女児

主 訴：哺乳不良, 発熱

既往歴：特記事項なし

現病歴：哺乳不良が持続し、第5病日に前医に入院した。入院後に意識障害があると判断され、急性脳症が疑われた。ステロイドパルス療法が施行されたが症状が改善せず、精査・加療目的で当院へ転院となった。当院転院時の検査では、体温36.7℃、白血球3,080/μl (Neu 44.4%)、CRP 0.08 mg/dlと炎症所見は見られず、脳波、頭部MRI、筋電図、髄液検査などが

著者連絡先：(〒812-8582) 福岡市東区馬出3-1-1

九州大学病院検査部

木部泰志

TEL: 092-642-5757

FAX: 092-642-5755

E-mail: yasu1206@med.kyushu-u.ac.jp

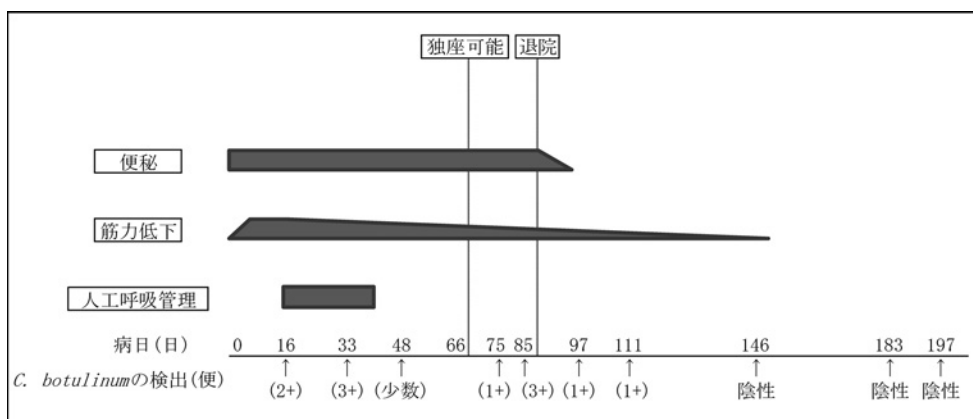


図1 臨床経過

施行されたがいずれも異常は認められなかった。当院でもステロイドパルス療法が継続され、大量ガンマグロブリン療法が追加されたが、改善は見られなかった。その後、急激な呼吸状態の悪化、四肢の麻痺を認め、乳児ボツリヌス症を疑い第16病日に便培養が提出された。提出された便培養から、*C. botulinum* が分離され、A, B型毒素遺伝子とA型毒素産生が確認されたため、乳児ボツリヌス症と診断された。

抗毒素血清などによる治療は行われず、対症療法として人工呼吸管理のみが行われた。また、治療過程で便秘があると判断され、長期間排便がない場合は浣腸が施行された。便の処理の際には、手袋とガウンを着用し、オムツをビニール袋に入れて廃棄する感染対策がとられた。第18病日頃から麻痺症状は改善傾向となり、第40病日に抜管された。第66病日には独座可能となり、経口摂取が確立した第86病日に退院となった。診断以降、約2週間ごとに便培養が提出され、継続して*C. botulinum* が検出されていたが、第146病日に本菌の消失が確認された(図1)。

細菌学的検査

提出された便の性状は軟便で、その直接塗抹標本のグラム染色(フェイバー法)では、亜端在性芽胞を有するグラム陽性桿菌が優位であった。プルセラHK寒天培地(極東製薬)で35℃嫌気培養を48時間行ったところ、遊走を示す半透明の悪臭のあるコロニー(図2)が分離された。グラム染色で太い亜端在性有芽胞グラム陽性桿菌(図3)であり、芽胞染色(Wirtz法)で青緑色に染色された芽胞が確認された(図4)。同定には嫌気性菌同定キットであるRapID ANA II(アムコ)を用い、*Clostridium difficile*(コード:000010,

99.11%)と同定された。しかし、コロニーの特徴は*C. difficile*と大きく異なり、臨床症状などから*C. botulinum*の可能性を否定できなかった。そこで保健所に精査を依頼したところApi20A(シスメックス・ピオメリュー)で*C. botulinum*と同定され、PCRでA型およびB型毒素遺伝子が検出された。さらに国立感染症研究所にて、マウス試験でA型毒素が検出された(表1)。

考 察

乳児ボツリヌス症は1976年に米国で初めて報告され、現在までに2,000例以上の報告がある。しかし、本邦では1986年に初めて報告されて以来2007年までにわずか24例しか報告されていない非常にまれな疾患である⁵⁾。当検査室でも初めての分離例であったため、検査に苦慮した。本邦で初めて報告された当時はハチミツ摂取が原因で発症する例がほとんどであったが、1987年にハチミツを乳児に与えないよう勧告が出され、その後は原因が特定できない症例が多くなっている⁶⁾。本症例でも患者にハチミツ摂取歴はなく、感染源は特定できていない。遺伝学的解析によって海外分離株と過去の本邦分離株の一致も報告されており、海外からの輸入食品の関与も示唆されている^{2),7)}。*C. botulinum*とその毒素は2種病原体に、ボツリヌス症は4類感染症に指定されており、同定・診断後は直ちに最寄の保健所へ届け出る義務がある。所持は施設基準を満たしている一部の施設のみ可能であり、所持しない場合は3日以内に滅菌、譲渡などして菌を廃棄しなければならない。輸送する場合にも申請が必要となるので、菌の扱いには注意を要することを知っておかねばならない。

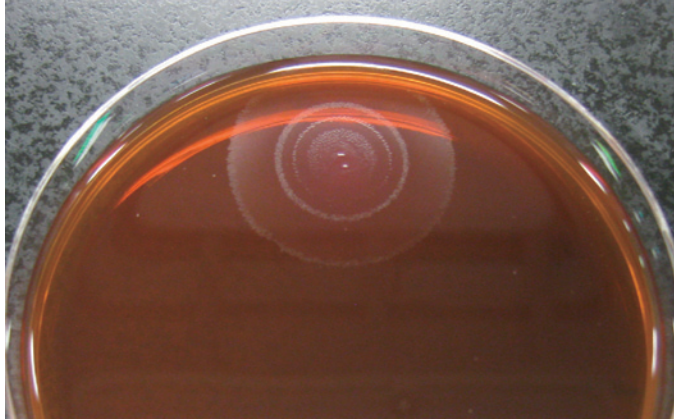


図2 ブルセラHK寒天培地に遊走した *C. botulinum* のコロニー (18時間培養)

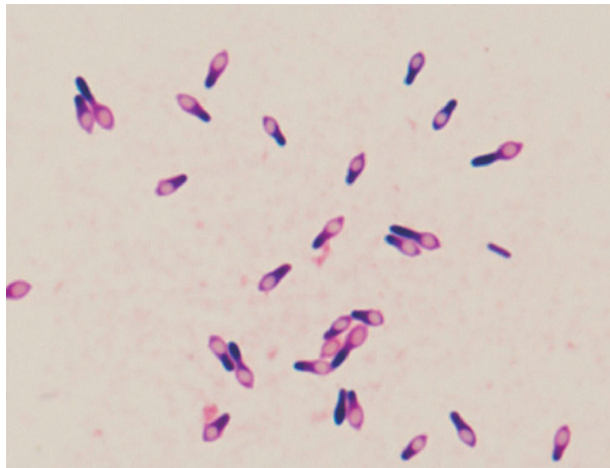


図3 *C. botulinum* コロニーのグラム染色像 ×1,000

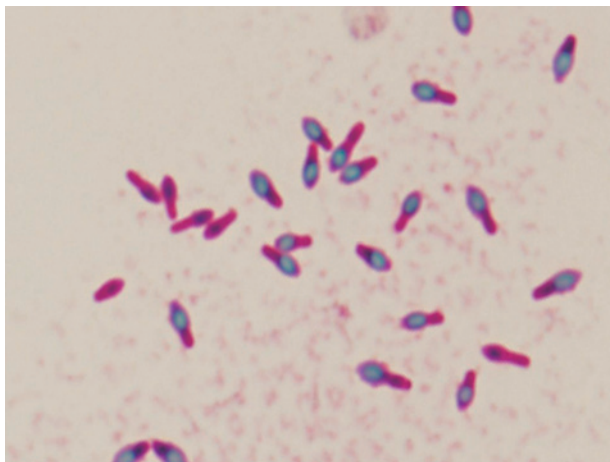


図4 *C. botulinum* コロニーの芽胞染色像 (Wirtz法) ×1,000

ボツリヌス症の確定診断には、患者検体からの毒素の検出と菌の分離が必要となる。毒素検出においては、乳児ボツリヌス症では血清検出率は低いとされ、便からの検出が有用である。PCRで毒素遺伝子を検出する方法もあるが、一部silent geneが存在するという報告もあり²⁾、PCR(+)の場合でも実際の毒素産生の有無まではわからないため、マウスと抗毒素血清を用いた毒素産生能試験が最も信頼性の高い検査法とされている。本症例ではPCRでA型およびB型毒素遺伝子が証明されたが、マウス試験ではA型毒素のみを産生していることが示された(表1)。よって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であると考えられた。このような事例については、79例のA型毒素産生菌のうち、43例にA型、B型双方の遺伝子を検出したという報告もあり、本邦でも1999年に同様の症例が広島県で報告されている⁸⁾。

*C. botulinum*の分離において最も重要なのは臨床からの情報提供であり、これにより通常は行わない便の嫌気培養を追加し、菌の存在を疑いながら検査を進めることができる。当検査室では検査オーダー時に、医師に、目的とする菌種、主訴、基礎疾患、体温・

CRP・白血球などの炎症所見、検査の目的などを任意で入力してもらシステムを採用しており、その情報がとても有用であった。本症例では、目的菌「ボツリヌス菌」、症状「神経症状」という情報があり、また医師よりボツリヌス症を強く疑っていると直接連絡を受けていたため注意して検査を進めることができた。これらの情報がなければ、本菌は分離不可能であり、臨床情報の重要性を改めて認識できる症例であった。*C. botulinum*の分離では、リパーゼ反応を示すコロニーをターゲットとするのが一般的で卵黄加GAM寒天培地や卵黄加CW寒天培地などが用いられるが、本症例では遊走を示す株であったため、それをターゲットに容易に分離できた。*Clostridium*属で遊走を示す代表的な菌種としては*C. tetani*、*C. septicum*などが挙げられるが、*C. botulinum*が遊走を示したという報告は少なく、本来ならば卵黄を含む培地を追加して培養すべきであった。

当検査室において菌種同定を試みた際、本菌はRapID ANA IIで*C. difficile*と同定されたが、遊走が見られ、コロニーの特徴が*C. difficile*のものとは異なっていたため保健所に精査を依頼した。保健所ではApi20Aで*C. botulinum*と同定された。当検査室ではVITEK2 ANCカード(シスメックス・ビオメリュー)でも同定を試みたが、*C. botulinum*は同定可能菌種に含まれておらず同定不可能であった。今回、RapID ANA IIでは*C. botulinum*で陽性となるべき項目で陽性反応が見られず、また当検査室にて後日Api20Aを用いて同定を試みた際にも、添付文書どおりの24時間培養では各項目の反応性が悪く、48時間まで延長培養しなければ判定困難であった(コード:40160023, 99.9%, *C. botulinum/sporogenes*, 48時間培養)(表2)。これらのことより、本菌の産生する酵素活性が低く、

表1. マウスを用いた毒素産生能試験結果

培養液接種量 (0.1 ml)	抗血清	マウスの症状		
		2時間後	5時間後	1日後
原液	なし	d		
1/10 希釈液	なし	+		
1/10 希釈液	抗A	-	-	-
1/10 希釈液	抗B	+	d	
1/10 希釈液	抗E	+	d	
1/10 希釈液	抗F	+	d	

- : 症状なし, + : 症状発生, d : 死亡

表2. *C. botulinum* Iの一般的性状と各同定キットの試験結果

	グ ル コ ロ ー ス	マ ル ト ー ス	ソ ル ビ ト ー ル	ス ト レ ハ ロ ー ス	ス ト ー ト ー ス	フ ル ク ト ー ン	ア ル キ ニ ン	セ リ ン	エ ス ク リ ン	ゼ ラ チ ン	リ パ ー ゼ	運 動 性
<i>C. botulinum</i> I	+	-w	-w	-/+	-w	+	+	+	+	+	+	±
Api20A	+	+	-	+	NT	NT	NT	NT	+	+	NT	NT
RapID ANA II	-	NT	NT	NT	-	+	-	-	NT	NT	NT	NT

C. botulinum I⁹⁾: + ; 90~100%の株で陽性, ± ; 61~89%の株で陽性, -/+ ; 11~39%の株で陽性, - ; 90~100%の株で陰性, w ; 弱陽性, -w ; 60~90%は陰性で, まれに弱陽性

Api20A, RapID ANA II : NT ; キットに含まれていない項目

それが誤同定につながったと考えた。RapID ANA II の培養時間が4~6時間であるのに対し、Api20Aでは24~48時間と比較的長く、本菌の同定に適していると考えられたが、類似菌である*C. sporogenes*との鑑別のためにはProA（プロリル-ジクロロアミノフェノール）などの追加試験が必要であり、現行の同定キットや自動機器では菌種確定が困難であるといえる。よって、リパーゼ反応陽性、また遊走を示す太い亜端在性有芽胞グラム陽性桿菌が認められた場合、直ちに外部機関と連携して遺伝子検査や毒素検査等による精査を依頼すべきである。本症例でも、検査室で菌種同定を試みると同時に保健所へ精査を依頼すれば、より迅速に診断できたと考えられ反省すべき点であった。

以上のように、*C. botulinum*の分離は、臨床からの情報がなければ困難で見逃されてしまうため、臨床とのコミュニケーションが不可欠である。臨床から情報を得るためのシステム上の工夫が重要であるし、情報が不足している場合には検査室から医師へ直接問い合わせることも必要となる。また菌種同定に関しては、現行キットでの菌種確定は難しく誤同定されることがあるため、疑わしい菌が分離された場合は直ちに外部機関に遺伝子検査や毒素検査を依頼し、迅速な診断をすべきである。

文 献

- 1) 小熊恵二, 門間千枝, 堀川和美. 2008. ボツリヌス菌 毒素と食中毒. 臨床と微生物 35: 353-358.
- 2) 梅田 薫. 2010. わが国で発生した乳児ボツリヌス症起因菌の遺伝子学的解析. 生活衛生 54: 106-115.
- 3) 高橋元秀. 2003. 乳児ボツリヌス症の細菌学的診断とその予防. 臨床検査 47: 505-511.
- 4) 塩田光隆, 西田 仁, 中川権史, 他. 2007. 短期間で便中から毒素及び菌が検出されなくなったB型ボツリヌス症の1乳児例. 日本小児科学会雑誌 111: 682-687.
- 5) 赤坂真奈美, 亀井 淳, 曾我菜海, 他. 2011. 乳児ボツリヌス症の2例. 日本小児救急医学会雑誌 10: 71-75.
- 6) 感染研感染症情報センター. 2008. ボツリヌス症 2008年1月現在. 病原微生物検出情報 29: 35-36.
- 7) Umeda, K., Y. Seto, T. Kohda, et al. 2009. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. J. Clinical. Microbiol. 47: 2720-2728.
- 8) 岡田 賢, 佐藤 貴, 藤田直人, 他. 2001. 乳児ボツリヌス症の1例. 小児科診療 64: 942-945.
- 9) Rainey, F. A, B. J. Hollen, A. Small. 2009. Genus I. *Clostridium* Prazmowski 1880, 23. p. 738-828. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3, 2nd ed. (Vos. P. D, G. M. Garrity, D. Jones, et al. ed), Springer, New York.
- 10) 竹田義弘, 東久保 靖, 井上佳織, 他. 2000. 広島県で発生したボツリヌス毒素遺伝子A・B保有株による乳児ボツリヌス症. 日本食品微生物学会雑誌 17: 143-147.
- 11) Hall, J. D., L. M. McCroskey, B. J. Pincomb, et al. 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. J. Clin. Microbiol. 21: 654-655.
- 12) Goonetilleke, A., J. B. Harris. 2004. Clostridial neurotoxins. J. Neurosurg. Psychiatry 75: 35-39.
- 13) 高橋元秀, 岩城正昭, 荒川宜親. 2002. 「感染症の診断・治療ガイドライン」追補-ボツリヌス症. 日医雑誌 128: 97-100.

A Case of Infant Botulism by *Clostridium botulinum* Type A

Yasushi Kibe,¹⁾ Yuiko Morokuma,¹⁾ Makiko Kiyosuke,¹⁾
Masafumi Sanefuji,²⁾ Tomomi Mochimaru,¹⁾ Yuzo Kayamori,¹⁾
Toshiro Hara,²⁾ Dongchon Kang^{1),3)}

¹⁾ Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

²⁾ Department of Pediatrics, Kyushu University Hospital

³⁾ Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

Infant botulism is a neuromuscular paralysis caused by *Clostridium botulinum*. In Japan, only 24 cases have been reported so far. Here we report a case of infant botulism by *C. botulinum* type A which was difficult to be correctly diagnosed. A 9-month-old girl was admitted to a local hospital with a fever, poor sucking, and occasional events of unconsciousness. She was initially diagnosed acute encephalopathy and treated with steroid pulse therapy without improvement. After transferred to our hospital, her respiratory status and limb palsy got worse, the symptoms of which suggested infant botulism. Then, we cultured the patient feces in anaerobic conditions to isolate *C. botulinum*. Two days later, gram positive spore-forming bacilli were detected but identified as *C. difficile* with a RapID ANA kit. Because the colony morphology and the clinical symptoms were atypical as *C. difficile*, the bacteria were referred to a specialized agency and were revealed to be *C. botulinum*. Generally, isolation and identification of *C. botulinum* is very difficult with commercially available kits. Clinical information from physicians was critically important for us to suspect *C. botulinum* and diagnose promptly and accurately.