

E型ボツリヌス毒素産生性 *Clostridium butyricum* における芽胞耐熱性の検討

吉野修司 永野喬子¹⁾ 黒木真理子²⁾ 元明秀成

Studies on the Heat Resistance of Type E Botulinum Toxin-Producing *Clostridium butyricum* Spores

Shuji YOSHINO, Kyoko NAGANO, Mariko KUROGI, Hidenari GANMYO

要旨

成人患者便から分離された E 型ボツリヌス毒素産生性 *Clostridium butyricum* の芽胞は II 群菌に分類される E 型毒素産生性 *C. botulinum* と同程度の 80°C, 10 分の耐熱性を有していた. なお, 患者便を 75°C, 20 分加熱したものでは菌が分離されなかったことから, 今回の事例では患者便中の *C. butyricum* は栄養型のみで, 芽胞は存在していなかった可能性が示唆された.

キーワード: *Clostridium butyricum*, E 型ボツリヌス毒素, 芽胞耐熱性

はじめに

2014 年 2 月, 宮崎県で約 30 年ぶりにボツリヌス症例が発生し, 成人患者便 (9 病日) から分離された菌は E 型ボツリヌス毒素産生性 *Clostridium butyricum* であった¹⁾. 本邦における *C. butyricum* によるボツリヌス症は 2004 年に東京都で乳児ボツリヌス症が一例報告されているが²⁾, 世界的にも報告数が少ないことから, 菌の性状も含め不明な部分が多い.

今回の事例では非加熱の患者便からは *C. butyricum* が分離されたが, 75°C, 20 分加熱した患者便では菌が分離されず, E 型毒素および E 型毒素遺伝子も検出されなかったことから, 文献等に記載がない *C. butyricum* の芽胞耐熱性について検討した.

材料と方法

1 芽胞形成確認

患者便から分離された菌株を用いた. 分離株は卵黄加 GAM 寒天培地に画線塗抹し, 特定の条件下で静置後, Schaeffer-Fulton 変法による芽胞染色を行い芽胞形成を確認した.

また, 芽胞形成が確認された場合, 卵黄加 GAM 寒天培地, 10%ゼラチン加卵黄加 GAM 寒天培地へ画線塗抹し, 24 時間嫌気培養後, 栄養型へ再変化するか確認した.

2 加熱処理

芽胞が確認された菌をゼラチン加希釈液 1mL に浮遊させ, PCR 用 0.2mL チューブに 50 μ l ずつ分注した. 分注した菌液はスピンドウン後, PCR サーマルサイクラー (Applied Biosystems Veriti) のグラジエント機能を利用して 60°C から 95°C まで 5°C 間隔でそれぞれ 10 分, 20 分, 30 分間加熱した. 加熱した菌液は卵黄加 GAM 寒天培地に塗抹し, コロニー形成の有無で芽胞の耐熱性を判定した.

3 妥当性確認試験

サーマルサイクラーを用いることの妥当性を確認するため, *Salmonella Enteritidis* を TSB で一夜培養後, 希釈菌液を同様に 55°C, 30 秒間隔で 2 分まで加熱した. 加熱菌液はコンラージ棒で DHL 寒天培地に塗布し, 24 時間培養後コロニー数をカウントして D 値を求めた.

¹⁾現 企画管理課 ²⁾現 日南病院

結果

特定条件下で静置した *C. butyricum* の芽胞形成率は 100%であった。また、芽胞は卵黄加 GAM 寒天培地, 10%ゼラチン加卵黄加 GAM 寒天培地で 24 時間嫌気培養後、速やかに栄養型へと再変化した。なお、卵黄加 GAM 寒天培地に比べ 10%ゼラチン加卵黄加 GAM 寒天培地の方が栄養型へ変化する割合が高かった(図 1)。

芽胞菌は 80°C, 10 分まではコロニー形成が認められ, 80°C, 20 分の加熱ではコロニー形成が認められなかった(図 2)。

サーマルサイクラーを用いた *S. Enteritidis* の D_{55} 値は 4.37 分で, 小沼らの報告³⁾(2.73~5.18 分)とほぼ一致した。

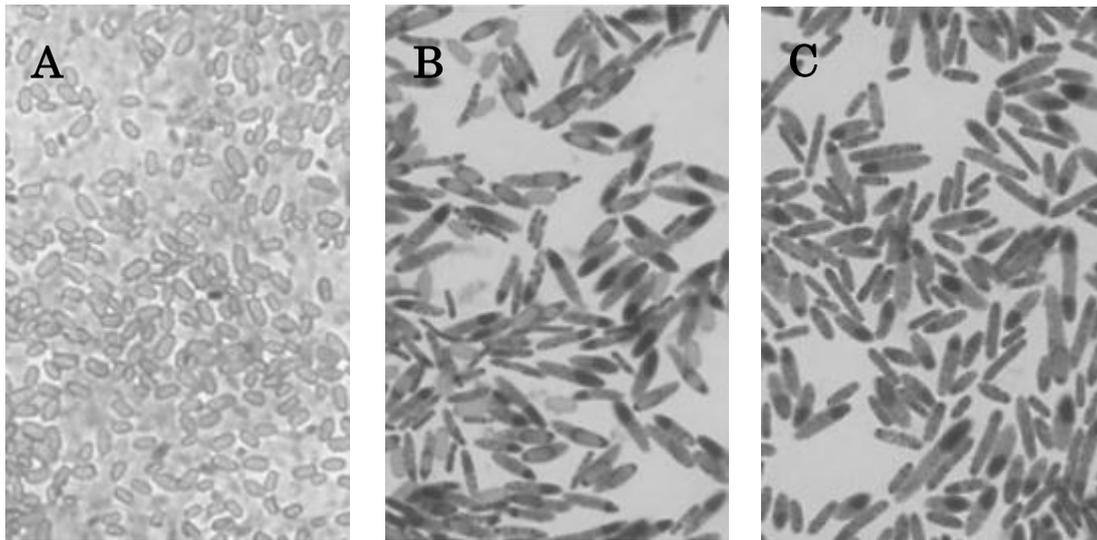


図 1 *C. butyricum* の Schaeffer-Fulton 変法による芽胞染色像
 A: 卵黄加 GAM 寒天培地を特定条件下で静置
 B: 卵黄加 GAM 寒天培地で 24 時間嫌気培養
 C: 10%ゼラチン加卵黄加 GAM 寒天培地で 24 時間嫌気培養

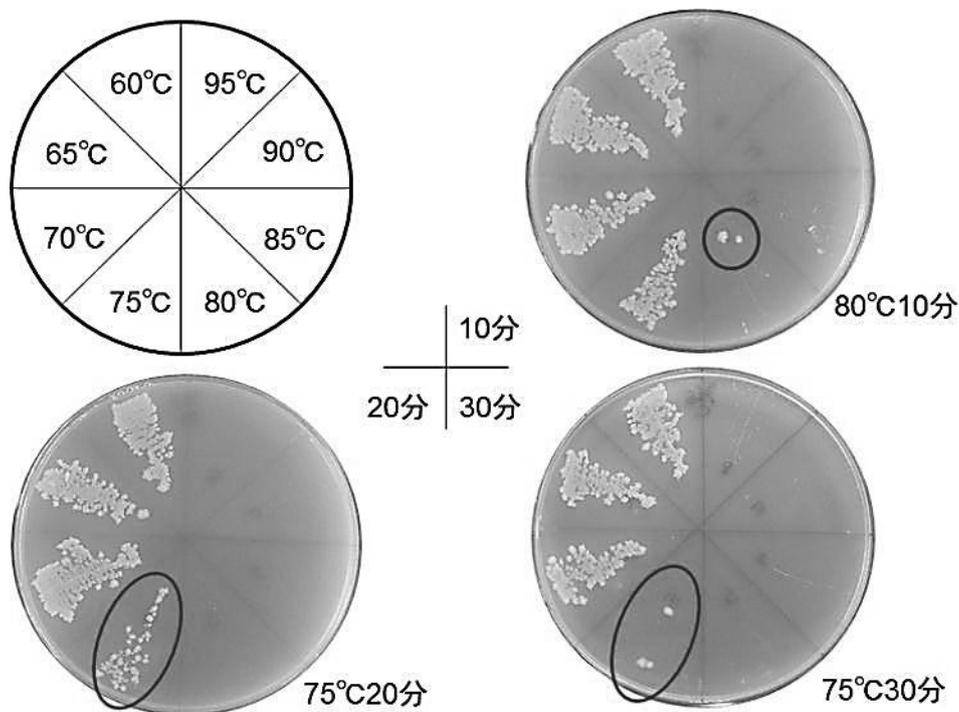


図 2 サーマルサイクラーを用いた分離株の芽胞耐熱性試験

考察

芽胞を含む細菌の熱抵抗性は同じ菌種でも菌株の違いや菌が入った媒質でも異なることが知られているが³⁾、今回検討した条件では分離された *C. butyricum* の芽胞は 80°C、10 分の耐熱性を有していた。これはⅡ群菌に分類される E 型毒素産生性 *C. botulinum* と同程度かやや高い耐熱性で、Ⅰ群菌やⅢ群菌の *C. botulinum*, *Bacillus* 属の芽胞と比較すると熱に対し不活化されやすい芽胞であると考えられた。また、今回の結果から、*C. butyricum* は芽胞を取り巻く環境により速やかに栄養型へ変化すること、形成させた芽胞は 75°C、20 分の加熱で耐熱性を示したことから、患者便中に存在していた *C. butyricum* は栄養型のみで、芽胞は存在していなかった可能性が示唆された。通常、芽胞形成菌による食中毒等が考えられる場合、夾雑菌を除きヒートショックにより発芽を促す目的から、便を加熱することが多いが、加熱便のみを用いた場合には *C. butyricum* を見逃す恐れがあると考えられた。

C. butyricum によるボツリヌス症は事例が少ないことなどから調査・研究が進んでいないのが現状である。今回の事例でも当所に搬入された食品・食材から毒素および毒素遺伝子は検出されず、感染源は特定できなかった。E 型毒素産生性 *C. botulinum* による食餌性ボツリヌス症では、魚肉発酵食品を原因とする報告が多いが、*C. butyricum* によるボツリヌス症では原因食品として大豆と冬瓜の発酵食品⁴⁾、ひよこ豆粉を使ったお菓子⁵⁾など植物性の食品・食材が海外で報告されている。また、食品以外ではペットとして飼われていたカメからの感染も報告⁶⁾されており、疫学調査を実施する場合には食品の種類や患者を取り巻く環境にも注意する必要があるものと思われる。

文献

1) 田代研之ら：宮崎県で発生した

Clostridium butyricum によるボツリヌス症について、病原微生物検出情報. 2014; 35: 159-160.

- 2) 門間千枝ら：*Clostridium butyricum* による本邦初の乳児ボツリヌス症，病原微生物検出情報. 2006; 27: 46-48.
- 3) 小沼博隆ら：サルモネラならびに腸管出血性大腸菌 O157:H7 の D 値に関する研究。病原微生物データ分析実験作業成果報告書。2004
- 4) Meng X, Karasawa T, Zou K, Kuang X, Wang X, *et al.* : Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism, *J Clin Microbiol*, Aug, 35(8), 2160-2162, (1997)
- 5) Chaudhry R, Dhawan B, Kumar D, Bhatia R, Gandhi JC, *et al.* : Outbreak of suspected *Clostridium butyricum* botulism in India, *Emerg Infect Dis*, Jul-Sep, 4(3), 506-507, (1998)
- 6) Shelley EB, O'Rourke D, Grant K, McArdle E, Capra L, *et al.* : Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: a novel environmental association with pet terrapins, *Epidemiol Infect*, Feb, 143(3):461-469, (2015)