

業績ノート

宮城県で過去25年間に分離された*Clostridium perfringens*の毒素型別調査

後藤 庸

宮城県仙台家畜保健衛生所

はじめに

Clostridium perfringens (以下Cp菌)はグラム陽性偏性嫌気性桿菌で、ヒト及び動物の腸管内に常在し、土壌及び河川等の自然界にも広く存在する。最大の特徴は10数種類の毒素を産生し特異的な症状を誘発することである。従来、Cp菌は産生する4種の毒素(α ・ β ・ ϵ ・ ι 毒素)の組み合わせでA型からE型まで5つの毒素型に分類されてきた¹⁾。しかし近年、 α 毒素を産生するA型の中に明らかに異なる毒素(CPE及びNetB毒素)を産生し、固有な症状を引き起こす株が判明した。そこでJulianらは、2018年にCPE及びNetB毒素を産生するA型株をそれぞれ新しくF型及びG型に拡張した7種の毒素型別を提唱した(表1)²⁾。

表1 7種のCp菌毒素型別(2018.Julianら提唱)

型	産生する毒素型					
	α	β	ϵ	ι	CPE	NetB
A	+					
B	+	+	+			
C	+	+			+/-	
D	+		+		+/-	
E	+			+	+/-	
F	+				+	
G	+					+

従来分類: A, B, C, D, E
 新たな型(従来はA型に含む): F, G

本調査は、これまで宮城県で分離されたCp菌の毒素型別状況を明らかにするため、7種の毒素型別による調査を実施した。また、その結果、1株は報告が少なく、未解明のE型と判明したため、その症例について報告する。

材料および方法

1. 供試菌株：平成7年から平成31年に当所の病性鑑定で分離されたCp菌119株(牛64株、豚24株、鶏25株、馬2株、羊1株、うずら1株、鹿1株、野鳥1株)を供した。
2. DNA抽出：培養液1mlからInstaGene DNA精製マトリックス(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules)を用いてDNAを抽出した。
3. 毒素型別PCR：*plc*, *cpb*, *etx*, *iap*, *Cpe*, *netB*の6種の毒素遺伝子について、Multiplex PCR Assay Kit Ver.2(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)により、DNA増幅を実施した。
4. Multilocus sequence typing (MLST) 解析：E型菌1株についてMLST解析を実施した。

成績

1. 毒素型別結果

毒素型別の結果、A型101株(85%)、C型4株(3%)、E型1株(1%)、G型13株(11%)の4種に分類された(図1)。分離した家畜の症状を大きく4項目①消化器症状(下痢・血便)、②神経症状

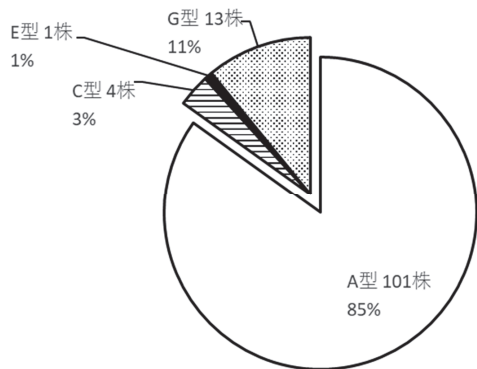


図1 Cp菌毒素型別の結果

(歩様異常), ③突然死及び④その他に分類すると, A型は①消化器症状49株, ②神経症状6株, ③突然死22株及び④その他24株, C型は③突然死3株及び④その他1株, E型は②神経症状1株, G型は全て③突然死由来株であった(表2).

表2 Cp菌毒素型別と症状別の分類結果

型	①消化器症状 (下痢血便)	②神経症状 (歩様異常)	③突然死	④その他	計 (n=119)
A	49	6	22	24	101 (85%)
C			3	1	4 (3%)
E		1			1 (1%)
G			13		13 (11%)
計	49	7	38	25	119

次に分離部位別の毒素型別結果を表3に示した. A型は腸内容物83株, 五大臓器又は脳14株, 尿又は胆汁4株, C型は腸内容物2株, 五大臓器又は脳2株, E型は筋肉1株, G型は腸内容物9株, 五大臓器又は脳4株から分離された(表3).

次に3畜種(牛, 豚, 鶏)における毒素型別の結果を図2に示した. 牛は64株のうちA型が61株(95%), C型が2株(3%), E型が1株(2%), 豚は24株全てA型, 鶏は25株のうちA型が12株(48%), G型が13株(52%)であった(図3).

表3 Cp菌毒素型別と分離部位別の分類結果

型	腸内容物	五大臓器・脳	筋肉	尿・胆汁	計 (n=109)
A	83	14		4	101
C	2	2			4
E			1		1
G	9	4			13
計	94 (79%)	20 (17%)	1 (1%)	4 (3%)	119

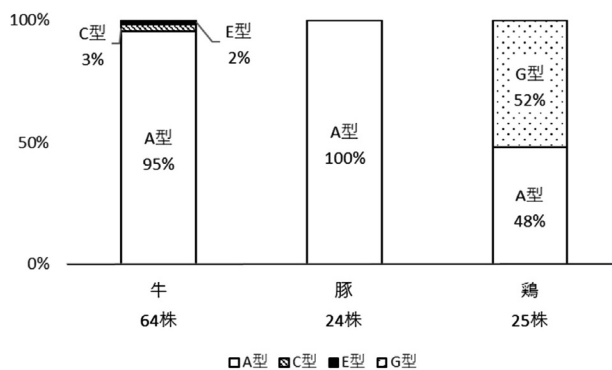


図2 3畜種におけるCp菌毒素型別の結果

2. E型が分離された症例

- 1) 分離年度: 平成24年
- 2) 畜種: 牛, 交雑種, 12日齢, 雄
- 3) 症状: 突然の後躯麻痺及び臀部に気腫.
- 4) 経過: 健常に産出され, 6日齢で突然の後躯麻痺を呈し, 8日齢で発熱が認められた. 治療による改善が見られず12日齢で予後不良と判断され, 原因究明のため病性鑑定を実施した.
- 5) 治療歴: ペニシリン系製剤及びステロイド製剤の投与.
- 6) 血液及び尿検査所見: 白血球の増加 (17,200/ μ l), AST (389U/L), CPK (1308U/L) 及びLDH (1876U/L) の上昇がみられた. また, 尿検査で潜血を認めた.
- 7) 病理検査結果: 剖検所見で臀部骨格筋の膠様浸

潤及び剖面の煮肉様変性を認め（写真1-a）、臀部は切開時に腐敗臭が認められた。組織学的検査は臀部骨格筋線維間への炎症性細胞の浸潤（写真1-b）及び肝細胞の変性並びに中心静脈にグラム陽性桿菌の集塊が認められた。

- 8) 細菌検査結果：臀部骨格筋から大腸菌及びCp菌が分離された。Cp菌は本調査で、 α 毒素と ι 毒素を保有し、E型に分類された。なお、直腸便の定量培養検査ではCp菌は検出されなかった。
- 9) MLST解析：分離Cp菌を既知のE型が属すSTと比較したところ、全8遺伝子が全て異なり新規STに分類された。
- 10) 診断：Cp菌と大腸菌が関与した臀部骨格筋の軟部組織感染症とされた。



写真1-a 臀部骨格筋の膠様浸潤

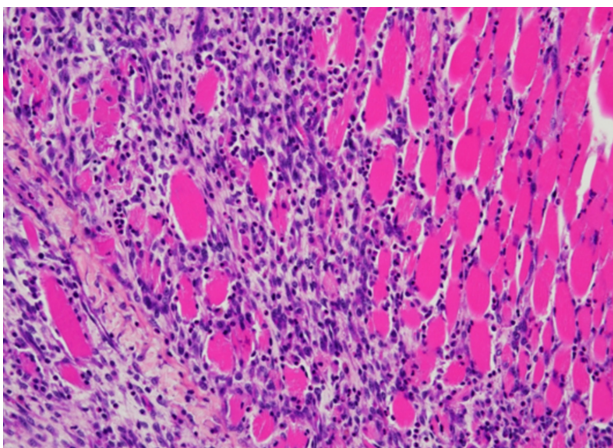


写真1-b 臀部骨格筋線維間への炎症性細胞の浸潤
(強拡大 HE染色)

考 察

本調査では、宮城県で過去25年間に分離されたCp菌の毒素型別調査を初めて実施した。その結果、85%（119株中101株）はA型であり、Songerらの報告³⁾と同様の結果であった。症状別では、クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症の主要な症状と考えられる下痢や血便といった消化器症状は畜種差がなくA型のみが示しており、家畜における主要な毒素型はA型であることが再認識された。

分離部位はCp菌の常在部位である腸内容物からの分離数が多い（94株）一方で、腸管外からも毒素型に関係なく分離され（25株）、そのうち17株が突然死に関与していた。

腸管外由来のCp菌は、傷口からの侵入が一般的であるが、損傷した消化管粘膜から門脈系に侵入し到達した組織内で増殖及び感染を起こす場合もある。発熱などの症状を示した事例では、Cp菌は血中に存在し、毒素による溶血やショック及び多臓器不全を起こし急性に死亡する⁴⁾。家畜においても、腸管外へのCp菌の侵入は極めて急性な経過をたどり死に至ると推察された。

鶏から分離された13株には、 α 毒素の他NetB毒素の保有が判明し、A型からG型に再分類され、県内におけるG型の存在が判明した。新たに提唱されたG型が保有するNetB毒素は、2008年にKeyburnらが鶏の壊死性腸炎の病原因子として発見した⁵⁾。本県においても13株うち10株が壊死性腸炎を呈した鶏から分離され、A型よりも高率に壊死性腸炎を起こすことが考えられた。さらにG型は鶏のみから分離されており、鶏に対する種特異性が示唆された。

以上の調査により、報告が少なく分離が希なE型が分離された事が判明した。分離症例はCp菌が子牛の骨格筋へ局所的に感染し、急速に壊死を引き起こした結果、突然の後躯麻痺の症状を呈したものと考えられた。医学分野におけるガス壊疽の患者から分離されるほとんどはA型との報告があるが⁴⁾、本症例におけるE型が骨格筋から分離され、筋壊死に関与した興味深い症例であった。E型が産生する ι 毒素は致死、皮膚壊死活性及び細胞毒性などを有しており、本症例の筋壊死の病態形成への関与が考えら

れた。また、分離されたE型のMLST解析の結果、子牛の腸管及びめん羊の腸管から分離されたE型とは、比較した全遺伝子が異なり、病態及び分離部位も異なる本菌はE型Cp菌の特徴を調査する上で貴重な株と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、検査にご協力いただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の高松大輔先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 戸田忠雄 武谷健二 1980 戸田新細菌学 南山堂 P401-406
- 2) Julian I. Rood, Expansion of the *Clostridium Perfringens* toxin-based typing scheme, *Anaerobe*, 3, 5-10, 2018
- 3) Songer, J. G. Diagnosis of clostridial infection of domestic animals, 1995, International Conference on the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia.
- 4) 高橋雄大, 「健常成人に発症した劇症型*Clostridium perfringens*の1剖検例」, 日本腹部救急医学会雑誌35(6) 2015 769~772
- 5) Keyburn AL. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*., *PLOS Pathogens*, 2008