 aptara <small>THE JAPANESE SOCIETY FOR TOXICOLOGY</small>	MIM	mim 213	Dispatch: March 17, 2010	CE:
	Journal	MSP No.	No. of pages: 5	PE: Helen

Microbiol Immunol 2010; 00: 1–5
doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00213.x

NOTE

A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A gene cluster typing

Kaoru Umeda^{1,2}, Yoshiyuki Seto², Tomoko Kohda², Masafumi Mukamoto² and Shunji Kozaki²

¹Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026 and

²Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-Orai-Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-8531, Japan

ABSTRACT

A rapid, simple and sensitive multiplex PCR method for *boNT/A* gene cluster typing was developed by combining the results of *BoNT/A* subtype (*boNT/A1* or *A2*) gene detection with *ha33* and/or *p47* gene detection. Ten isolates associated with infant botulism in Japan were examined and divided into *boNT/A* gene cluster types 2 and 3 by origin (honey feeding or not) and period (1986–1987 or 1999–2007). It is suggested that this multiplex PCR method will be useful for epidemiological studies of botulism.

Key words *boNT/A* gene cluster typing, infant botulism, multiplex PCR, PFGE.

Clostridium botulinum is an anaerobic spore-forming bacterium producing BoNT, which is the cause of botulism in humans and animals (1) and is divided into seven serotypes (A to G) (2). Some strains harbor two different serotypes of *BoNT* genes in their genome (3). *BoNT* is encoded by an approximately 3.8 kb gene, which is preceded by several nontoxic component genes (4). *BoNT* together with the nontoxic component genes are defined as the *boNT* gene cluster (5). Recently, *BoNT* was subclassified by *BoNT* gene sequence analysis, *BoNT/A* being divided into four subtypes (*A1*, *A2*, *A3* and *A4*) (3). There are two types of nontoxic components of gene organization (the HA and Orfx clusters), and *C. botulinum* type A strains were classified according to their harboring of these clusters (4–6). The HA cluster consists of *ha17*, *ha33*, *ha70*, *botR* and *ntnh* genes, and the Orfx cluster consists of *orfx3*, *orfx2*, *orfx1*, *botR*, *p47* (unknown function) and *ntnh* genes (6). Franciosa *et al.* have reported that type A strains possess *boNT/A1* and HA cluster genes to *boNT/A* gene cluster type 1; *boNT/A2* and Orfx cluster genes to *boNT/A* gene cluster type 2; and *boNT/A1* with

unexpressed or expressed *boNT/B*, HA cluster and Orfx cluster genes to *boNT/A* gene cluster type 3 (5). *BoNT/A* gene cluster typing has recently been applied for molecular characterization of type A strains (5).

In Japan, 24 cases of infant botulism have been reported: 16 of type A, 3 of type B, 1 of type C and 1 of *C. butyricum* producing *BoNT/E*. The types of toxin in the other three cases were not described (7–9). During 1986 to 1989, nine cases occurred; all were type A and gave a history of feeding with honey before the onset of symptoms. Since 1990, seven cases of type A have occurred, but none had a history of feeding with honey and the origin was not identified in five cases.

In this study, we developed the multiplex PCR method to easily detect *boNT/A* gene cluster types. In order to better understand the background of infant botulism cases in Japan, we then genotyped *C. botulinum* type A isolates by *boNT/A* gene cluster and PFGE types.

Twenty-seven *C. botulinum* type A strains, including 10 isolates associated with infant botulism in Japan, were cultured in 10 ml cooked meat medium (Difco, Becton

Correspondence

Shunji Kozaki, Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-Orai-Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-8531, Japan. Tel: +81 72 463 5683; fax: +81 72 463 5691; email: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp

Received 10 November 2009; revised 31 January 2010; accepted 9 February 2010

List of Abbreviations: *boNT*, botulinum neurotoxin; *boNT/A*, botulinum neurotoxin A; *botR*, botulinum neurotoxin regulatory; *C. Clostridium*; *ha*, hemagglutinin; *ntnh*, nontoxic-nonhemagglutinin; *orf*, open reading frame; *orfx* unknown function open reading frame gene; PCR-RFLP, PCR restriction fragment length polymorphism; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

Table 1. Summary of molecular typing of *C. botulinum* type A strains

Source and strain	Description† (Reference)	<i>boNT</i> gene‡	Multiplex PCR		<i>boNT/A</i> gene cluster type§	PFGE type
			<i>boNT/A1, A2</i>	<i>ha33, p47</i>		
Infant botulism in Japan						
Chiba H	Chiba, 1986, honey feeding (7, 8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S1
Kyoto F	Kyoto, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S2
KZ1828	Ishikawa, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S1
7103 H	Osaka, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S2
7105 F	Ehime, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S3
7105 H	Ehime, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S4
Y8036	Kanagawa, 1987, honey feeding (8)	A	A2	<i>p47</i>	2	S5
Hiroshima1	Hiroshima, 1999, unidentified (8, 16)	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S6
Miyagi2006	Miyagi, 2006, well water (9)	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S6
Iwate2007	Iwate, 2007, unidentified (9)	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S7
Food-borne botulism in Japan						
Renkon	Kumamoto, 1984, karashi renkon (8)	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S8
CB111	Tokyo, 1999, unidentified	A	A1	<i>ha33</i>	1	S9
CB121	Chiba, 1999, vacuum-packed hashed beef (17)	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S6
Osaka99	Osaka, 1999, unidentified	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S10
Infant botulism in the USA						
89E00033-1	California, 1989	A	A1	<i>ha33</i>	1	S11
89E00035-1	California, 1989	A	A1	<i>ha33</i>	1	S12
89E00064-3	California, 1989	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S13
89E00086-1	California, 1989	A, B	A1	<i>ha33, p47</i>	3	S14
83E00080	California, 1990	A	A1	<i>ha33</i>	1	S15
2137-1-77	California, 1990	A	A1	<i>ha33</i>	1	S16
Others						
802-1	Germany, 1988, red pepper	A	A1	<i>ha33</i>	1	S17
804-1H	Brazil, 1988, honey	A	A2	<i>p47</i>	2	S18
Denken	Stocked strain	A	A1	<i>ha33</i>	1	S19
97A	Stocked strain	A	A1	<i>ha33</i>	1	S20
62A	Stocked strain	A	A1	<i>ha33</i>	1	S21
33A	Stocked strain	A	A1	<i>ha33</i>	1	S17
36A	Stocked strain	A	A1	<i>ha33</i>	1	S22

†, Location, year, cause of botulism or origin; ‡, detected by PCR assay for *boNT/A* to *boNT/G* genes (11); §, determined by multiplex PCR assay.

Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 0.3% glucose and 0.2% soluble starch under anaerobic conditions for 18 hr at 30°C (Table 1). Bacterial DNA was extracted according to our previous report (10). Multiplex PCR assay was performed using two sets of

primers: “*boNT/A1, A2*” contained three primers to identify *boNT/A1* or *boNT/A2* genes; and “*ha33, p47*” contained four primers to detect the *ha33* gene, which is specific for the HA cluster, and the *p47* gene, which is specific for the Orfx cluster (Table 2). PCR was performed with

Table 2. Primers for multiplex PCR assays for classification of the *boNT/A* gene cluster type

Primer set	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Location on gene (coding region)
<i>boNT/A1, A2</i>	A1-forward	GACTTTACAGGATACTCAGGAAATA	665	2955–2979
	A2-forward	TAGAGATCCACGTAGATACATCAT	440	3180–3203
	A-reverse	TTAGTATTTTTTCTACGCCTGC		3619–3598
<i>ha33, p47</i>	<i>ha33</i> -forward	TGGTAACAATTCATTATTATTCG	534	303–326
	<i>ha33</i> -reverse	TAAATACTTGAATAGCAGTTCCGT		836–812
	<i>p47</i> -forward	ACTTATGGTTGGGATATTGTTA	344	7–29
	<i>p47</i> -reverse	TCATCATTAGACTCAGATCCAA		350–329

Multiplex PCR for *boNT/A* gene cluster typing

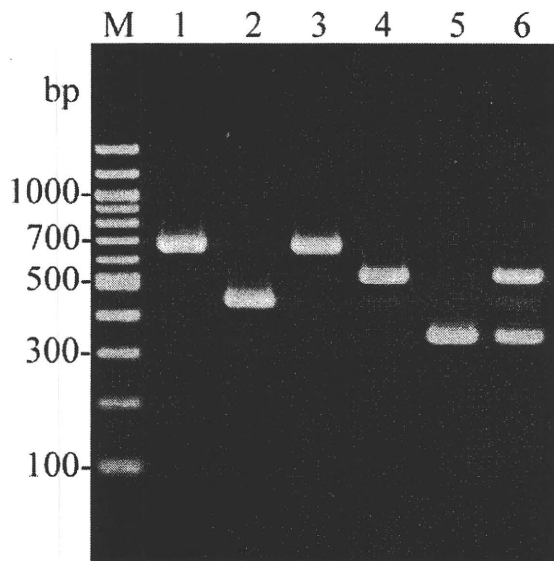


Fig. 1. Multiplex PCR assay for *boNT/A* gene cluster typing. The results of PCR with primer sets "*boNT/A1*, *A2*" (lanes 1 to 3) and "*ha33*, *p47*" (lanes 4 to 6) using strain 62A (lanes 1 and 4), Kyoto F (lanes 2 and 5) and Renkon (lane 3 and 6) were visualized on 3% agarose gels stained with ethidium bromide. Lane M: 100-bp ladder.

a 25 μ l reaction mixture containing 0.1–1 ng template DNA, 0.25 μ M of each primer, 1.25 U Ex *Taq* (TaKaRa Shuzo, Kyoto, Japan), 2.5 μ l Ex *Taq* buffer and 200 μ M deoxynucleotide-triphosphate. Each PCR cycle consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, and was repeated 30 times. Unexpressed *boNT/B* gene was detected by another PCR assay for *boNT/A* to *boNT/G* genes (11). *Sma* I digested PFGE was carried out as described in our previous report (10). Dendrogram analysis of the band patterns was generated with FPQuest software ver.4.5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Another PFGE type was defined where there was more than one fragment difference in the PFGE band pattern.

The results of multiplex PCRs of 27 type A strains are summarized in Table 1 and representative results are depicted in Figure 1. The *boNT/A1* (665 bp) and *ha33* amplicons (543 bp) were detected in 11 strains (CB111, 89E00033-1, 89E00035-1, 83E00080, 2137-1-77, 802-1, Denken, 97A, 62A, 33A and 36A), which were accordingly classified as *boNT/A* gene cluster type 1. The *boNT/A2* (440 bp) and *p47* amplicons (344 bp) were detected in eight strains (Chiba H, Kyoto F, KZ1828, 7103 H, 7105 F, 7105 H, Y 8036 and 804-1H), which were accordingly classified as *boNT/A* gene cluster type 2. The *boNT/A1*, *ha33* and *p47* amplicons were detected in eight strains (Hiroshima1, Miyagi2006, Iwate2007, Renkon, CB121, Os-

aka99, 89E00064-3 and 89E00086-1). These also harbored the unexpressed *boNT/B* gene (Table 1), and were therefore classified into *boNT/A* gene cluster type 3. No amplicon was detected in the 12 control strains, which were as follows: three type B (Okra, 111 and Osaka05), one type C (CB-19), one type D (1873), one type E (Iwanai), one type F (Langeland), one BoNT/E producing *C. butyricum* (5262), one *C. sporogenes* (ATCC19404), one *C. bifementas* (ATCC638), one *C. perfringens* (ATCC13124) and one *C. difficile* (ATCC43593) by "*boNT/A1*, *A2*" PCR. The *ha33* amplicon was detected in the three type B strains and the *p47* amplicon in the type F strain by "*ha33*, *p47*" PCR (data not shown).

The PFGE patterns of *Sma* I digested DNA from 27 type A strains and a dendrogram based on the similarities between normalized PFGE patterns are presented in Figure 2, and PFGE types are listed in Table 1. The 27 strains were divided into 22 PFGE types (S1-S22) and their similarity ranged from 29.6% to 100%. The seven isolates associated with infant botulism in Japan during 1986–1987 were divided into five PFGE types with 78.6–100% similarity, and 81.5% to 89.7% similarity to strain 804-1H, isolated from Brazil honey. The three isolates associated with infant botulism in Japan during 1999–2007 were divided into two PFGE types with 62.1% similarity. Strains Hiroshima1 and Miyagi2006 showed identical PFGE types to strain CB121, which was associated with food-borne botulism in Japan in 1999.

The new multiplex PCR method for *boNT/A* gene cluster typing established in this study is able to classify reference strains (62A and Kyoto-F) into their previously described cluster types (1 and 2, respectively) (5). The detection limit of "*boNT/A1*, *A2*" PCR was from 5.5×10 to 2.8×10^2 cells/ml, and of "*ha33*, *p47*" PCR from 2.1×10^2 to 2.1×10^3 cells/ml of culture dilutions (data not shown). The PCR-based *boNT/A* gene cluster typing method reported is a combination of BoNT/A subtyping by PCR-RFLP and *ha33* and *p47* gene detection by separate PCR (5); however, our PCR method has the advantages of simplicity, rapidity, specificity and sensitivity, so it would be applicable not only for molecular typing, but also the diagnosis of botulism.

A correlation between *boNT/A* gene cluster types and geographical distribution has been reported (5). Cluster type 1 and 3 strains are predominant in the USA, while cluster type 2 strains are predominant in Europe. Isolates associated with infant botulism in Japan were clearly divided into cluster type 2 and 3 by their time periods, and shown to be related to isolates from honey of South American origin and food-borne botulism, respectively. This is the first report of the genetic relationship between isolates associated with infant botulism and food-borne botulism in Japan. *C. botulinum* type A is rarely found in Japanese

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

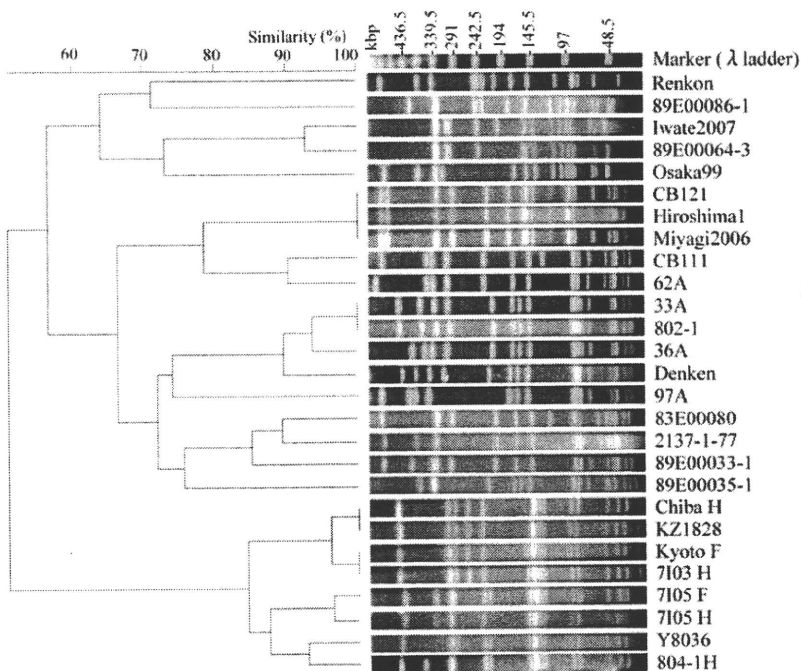


Fig. 2. PFGE genotyping. The dendrogram and PFGE patterns of *Sma* I digested DNA from 27 *C. botulinum* type A strains are shown. Similarity analysis was performed using the Dice coefficient, and clustering was examined by the unweighted pair group method with arithmetic averages.

soil, while type C and E are widely distributed (12). There is a possibility that imported goods are related to botulism cases. In other countries, in addition to honey, powdered infant formula (13), baby food (14) and house dust (15) have been reported as causes of infant botulism. Further risk assessment of several food and environmental samples to prevent infant botulism are warranted.

While *boNT/A* gene cluster typing is less discriminating than PFGE genotyping, it is excellent for genetic comparison among different laboratories or countries. The application of multiplex PCR assays will contribute to understanding the local and geographic epidemiology of *C. botulinum*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Takeda (Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment), Division of Bacteriology at Chiba Prefectural Institute of Public Health, and C. Monma (Tokyo Metropolitan Institute of Public Health) for gifts of *C. botulinum* strains. This work was partially supported by a grant for research on food safety from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

REFERENCES

1. Cai S., Singh B.R., Sharma S. (2007) Botulism diagnostics: from clinical symptoms to *in vitro* assays. *Crit Rev Microbiol* 33: 109–25.
2. Lindstrom M., Korkeala H. (2006) Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 19: 298–314.
3. Hill K.K., Smith T.J., Helma C.H., Ticknor L.O., Foley B.T., Svensson R.T., Brown J.L., Johnson E.A., Smith L.A., Okinaka R.T., Jackson P.J., Marks J.D. (2007) Genetic diversity among botulinum neurotoxin producing Clostridial strains. *J Bacteriol* 189: 818–32.
4. Oguma K., Fujinaga Y., Inoue K. (1995) Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. *Microbiol Immunol* 39: 161–8.
5. Franciosa G., Floridi F., Maugliani A., Aureli P. (2004) Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl Environ Microbiol* 70: 7192–9.
6. Jacobson M.J., Lin G., Raphael B., Andreadis J., Johnson E.A. (2008) Analysis of neurotoxin cluster genes in *Clostridium botulinum* strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. *Appl Environ Microbiol* 74: 2778–86.
7. Noda H., Sugita K., Koike A., Nasu T., Takahashi M., Shimizu T., Ooi K., Sakaguchi G. (1988) Infant botulism in Asia. *Am J Dis Child* 142: 125–6.
8. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases. (2000) Botulism, Japan. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 21: 49–50. (in Japanese).
9. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases. (2008) Botulism in Japan as of January 2008. *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)* 29: 35–36. (in Japanese).

Multiplex PCR for *boNT/A* gene cluster typing

10. Umeda K., Seto Y., Kohda T., Mukamoto M., Kozaki S. (2009) Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J Clin Microbiol* 47: 2720–8.
11. Takeshi K., Fujinaga Y., Inoue K., Nakajima H., Oguma K., Ueno T., Sunagawa H., Ohyama T. (1996) Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 40: 5–11.
12. Yamakawa K., Kamiya S., Nishida S., Yoshimura K., Yu H., Lu D.Y., Nakamura S. (1988) Distribution of *Clostridium botulinum* in Japan and in Shinkiang district of China. *Microbiol Immunol* 32: 579–87.
13. Brett M.M., McLauchlin J., Harris A., O'Brien S., Black N., Forsyth R.J., Roberts D., Bolton F.J. (2005) A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *J Med Microbiol* 54: 769–76.
14. Paerregaard A., Angen O., Lisby M., Molbak K., Clausen M.E., Christensen J.J. (2008) Denmark: botulism in an infant or infant botulism? *Euro Surveill* 13: pii:19072.
15. Nevas M., Lindstrom M., Virtanen A., Hiemi S., Kuusi M., Arnon S.S., Vuori E., Korkeala H. (2005) Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome. *J Clin Microbiol* 43: 511–3.
16. Takeda Y., Toukubo Y., Inoue K., Ogawa H., Okada S., Sato T. (2000) Infant botulism by *Clostridium botulinum* possessing the type A and B botulism neurotoxin genes in Hiroshima prefecture. *Jpn J Food Microbiol* 17: 143–7. (in Japanese).
17. Kobayashi H., Fujisawa K., Saito Y., Kamijo M., Oshima S., Kubo M., Eto Y., Monma C., Kitamura M. (2003) A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of *Clostridium botulinum* type Ab. *Jpn J Infect Dis* 56: 73–4.

UNCORRECTED

Clostridium perfringens 感染患者に対する治療用ウマ抗毒素製剤の存在を知っていますか？

一二三 亨*1 高橋 元秀*2 諸熊 一則*3 吉岡 早戸*1
 原口 義座*1 加藤 宏*1 小井土雄一*1 本間 正人*4

要約：非外傷性の *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) 感染症により血管内溶血や代謝性アシドーシスが急速に進行し、短時間の経過で死亡した劇症型の報告例がここ数年散見される。これは、*C. perfringens* の α 毒素により血管内溶血が進行し、貧血、腎不全から播種性血管内凝固症候群、多臓器不全へと急激に進行し、死に至ると考えられている。治療法は、必要であれば外科的処置がまず考慮され、それと並行してペニシリン系抗菌薬の大量投与や高圧酸素療法のほか、持続血液濾過透析、エンドトキシン吸着、そして血漿交換などの血液浄化法も、可能性のある治療法として挙げられているが、未だに治療法は確立されていない。*C. perfringens* の α 毒素に対する抗毒素製剤の使用は古い歴史をもつ治療法であるが、臨床医には馴染みが薄く、学会発表や論文で治療法として取り上げられていないことが多いため、今回、啓蒙的意義も踏まえて紹介する。

Key words: ① *Clostridium perfringens*, ② antitoxins, ③ gas gangrene antitoxin

I. はじめに

非外傷性の *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) 感染症による死亡報告例が、ここ数年散見される^{1),2)}。しかも、そのほとんどが血管内溶血や代謝性アシドーシスが急速に進行し、短時間の経過で死亡した劇症型である。これは、*C. perfringens* の α 毒素により血管内溶血が進行し、貧血、腎不全から播種性血管内凝固症候群、多臓器不全へと急激に進行し、いわゆるガス壊疽症状を呈して死に至ると考えられている³⁾。

治療法は、必要であれば外科的処置がまず考慮され、それと並行して早期に集中治療を展開しなければならない。ペニシリン系抗菌薬の大量投与や高圧酸素療法のほか、持続血液濾過透析、エンドトキシン吸着、そ

して血漿交換などの血液浄化法も、可能性のある治療法として挙げられているが^{2),4)}、未だに治療法は確立されていない。

C. perfringens の α 毒素に対する抗毒素製剤の使用は古い歴史をもつ治療法であるが⁵⁾、臨床医には馴染みが薄く、学会発表や論文で治療法として取り上げられていないことが多いため、今回、啓蒙的意義も踏まえて紹介する。

II. 毒素治療の基本～抗毒素～

毒素性疾患は、ボツリヌス中毒のようにボツリヌス毒素そのものを含んだ食品を食したり、毒蛇咬傷のように毒牙を通して体内に毒素が注入されたことで、一度に大量の毒素が生体内に入って発病するタイプと、*C. perfringens* 感染症などのように病原体が体内に侵入してその部位で菌が増殖し、感染局所で産生された毒素によって初めて発病するタイプの2種類があ

この論文は今号のハイライトで取り上げています。
 高橋 元秀、クロストリジウム属菌感染症と抗毒素療法。
 日集中医誌 2010; 17: 253-255.

*1 独立行政法人国立病院機構災害医療センター救命救急センター
 (〒190-0014 東京都立川市緑町 3256)

*2 国立感染症研究所細菌第2部 (〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1)

*3 財団法人化学及血液療法研究所 (〒860-8568 熊本県熊本市大塚 1-6-1)

*4 鳥取大学医学部救急災害医学分野 (〒683-8503 鳥取県米子市西町 86)

受付日 2009年 4月 16日
 採択日 2009年 7月 1日

る⁶⁾。後者の場合は、菌の増殖を抑えない限り引き続いて毒素が産生され、病状が進展してしまうことになる。産生された毒素が大きな役割をもつという点で、毒素性疾患は他の感染症とは大きく異なり⁶⁾、我々臨床医は毒素の働きをとにかく止めることに着目しなければならず、できるだけ早期に抗菌薬とともに抗毒素を投与して、毒素を中和しなければならない。

抗毒素とは、細菌の外毒素、植物毒素、動物毒素などの生物から発生した抗原性毒物質に反応して生成される抗体と定義されている⁷⁾。

ここで注意しなければならないのは、抗毒素は毒素を中和して完全に毒作用を抑えることができるが、殺菌作用はなく、菌の増殖を抑える効果はない。また、一度毒素によって傷害された臓器の機能を回復させるものでもない。つまり、*C. perfringens* 感染患者に対しては、外科的処置と並行して、できるだけ早期に抗毒素を投与して毒素を中和するとともに、十分な量の抗菌薬を投与し、引き続いて集中治療を行うことが臨床医には要求される。

Ⅲ. *C. perfringens* の産生毒素 に対する抗毒素療法

C. perfringens に対する抗毒素製剤として現在の日本にあるのは、ガス壊疽患者の緊急治療用として保管されている国家備蓄品(国有品)のみであり、国内市場での流通はない。使用に際しては、厚生労働省の医薬食品局血液対策課または医療機関の所属する都道府県に供給を依頼しなければならない。しかし、国家備蓄品(国有品)の使用に際して制限があるわけではなく、臨床診断に基づいて患者への抗毒素製剤投与が必要であると判断した場合は、通常保険診療の範囲内で処理される。

国家備蓄品の抗毒素製剤は、1バイアル中に *C. perfringens* Type A, *C. septicum*, *C. oedematiens* の各抗毒素5,000単位を含有した3種混合の凍結乾燥製剤である。免疫用抗原として各毒素をホルマリンで無毒化したトキソイドでウマを免疫し、そのウマから採血・分離した血漿を精製した免疫グロブリン製剤である。

歴史的には、1957年(昭和32年)から日本での製造が開始され、現在は、千葉県血清研究所から継承し、化学及血清療法研究所(化血研)で生産されている。千葉県血清研究所では10 ml入りの液状品製剤(有効期間3年)を年間約2,000本製造していたが、現在化血研では、乾燥品製剤(有効期間10年)をほぼ2年間隔で約500本製造している。

用法としては、10,000~20,000単位を数回に分けて静脈内注射するか、生理食塩水などで希釈して点滴静注する⁸⁾。適用は、起因菌が前述した3種の抗毒素の菌と分かっている場合、あるいは起因菌が3種の菌である可能性が高く中毒症状を示している場合である。

2000年から2001年にかけて、実際に抗毒素製剤を患者に投与した医療機関25施設に対して行ったアンケート調査では、13施設より回答があり、抗毒素製剤を実際に投与して「効果あり」と回答した施設が8施設、「効果なし」が2施設、「不明」が3施設であった⁹⁾。しかし、抗毒素製剤を投与した23例中、*Clostridium* 属菌は6例に過ぎず、また、血管内溶血や代謝性アシドーシスが急速に進行して死に至る劇症型での抗毒素製剤の使用報告例はなかったことから、その有効性を証明するためにも、今後の症例の蓄積と検討が必要である。

ただし強調するが、抗毒素製剤を投与すれば必ず救命できるという訳ではなく、投与の時期が極めて重要であり、毒素が標的となる組織に結合した後に投与しても効果は期待できない⁶⁾。

また、ウマに免疫して作られるウマ抗毒素製剤は、主な副作用としてアナフィラキシーショックと血清病が挙げられる。アナフィラキシーショックの頻度は1,000人に1人あるいはそれ以下であるが、直ちに治療をしないと死に至る可能性もあるため、投与に際しては酸素、輸液、エピネフリン、気道確保セットを準備しておく必要がある⁵⁾。血清病は、投与数日後に発熱、蕁麻疹様湿疹、顔面浮腫、関節痛、蛋白尿をきたす疾患であるが、多くの場合、予後は良好であり、治療としては抗ヒスタミン薬、ステロイド投与が挙げられる⁵⁾。

これらの問題を解決するため、現在、ウマ抗毒素製剤に代わって、ボツリヌス抗毒素製剤、ジフテリア抗毒素製剤によるヒト型の抗体の製剤化に向けた研究が行われているが¹⁰⁾、*C. perfringens* に対するヒト型抗毒素製剤に関しては国際的にも行われていない。

したがって我々は、抗毒素製剤の安全性を十分に認識した上で、治療に必要と判断した時には、速やかに投与しなければならない。

Ⅳ. まとめ

- ① *C. perfringens* 感染症に対する治療用抗毒素製剤について情報提供した。しかし、この抗毒素製剤のみで治療できるわけではないことを再度認識しておく必要がある。

- ②できるだけ早期の抗毒素製剤や抗菌薬の投与に加えて、血液浄化法などを加味した集中治療を展開することが重要である。
- ③C. perfringens 抗毒素製剤は国家備蓄品であるが、通常の保険診療の範囲内で処理される。

文 献

- 1) 赤坂威史, 橋口清明, 増田和之, 他. 激しい溶血が特徴的であった劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の1症例. 日集中医誌 2004;11:247-8.
- 2) 清水敬樹, 甲嶋洋平, 加藤はる, 他. 急激な経過をたどり救命し得なかった劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の1例. ICUとCCU 2005;29:63-70.
- 3) Ohtani S, Watanabe N, Kawata M, et al. Massive intra-vascular hemolysis in a patient infected by *Clostridium perfringens*. Acta Med Okayama 2006;60:357-60.
- 4) Bennet JM, Healey PJM. Spherocytic hemolytic anemia and acute cholecystitis caused by *Clostridium welchii*. N Engl J Med 1963;268:1070-2.
- 5) 近藤 久. 20. 抗毒素. 国立予防衛生研究所学友会編. 日本のワクチン. 東京:丸善;1977. p. 279-91.
- 6) 近藤 久. 抗毒素療法のポイント. 臨と細菌 1980;7:59-63.
- 7) 作岡 晋. 抗毒素の現状. 化血研所報黎明 2002;11:19-33.
- 8) 国立感染症研究所. ガスえそウマ抗毒素(ガスえそ抗毒素). 生物学的製剤基準. 2004. p. 23-5.
- 9) 高橋元秀, 杉本 央. わが国におけるガス壊疽抗毒素の使用状況に関するアンケート調査. 平成14年度厚生労働科学研究費補助金 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究 分担研究報告書. 2002.
- 10) 高橋元秀. 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金 総括研究報告書. 2007.

Abstract

Do you know the Clostridium perfringens antitoxin?

Toru Hifumi*¹, Motohide Takahashi*², Kazunori Morokuma*³, Hayato Yoshioka*¹, Yoshikura Haraguchi*¹, Hiroshi Kato*¹, Yuichi Koido*¹, Masato Homma*⁴

- *¹Division of Critical Care Medicine and Trauma, National Hospital Organization Disaster Medical Center
*²Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases
*³The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute
*⁴Division of Emergency and Disaster Medicine, Tottori University Faculty of Medicine

- *¹3256 Midoricho, Tachikawa, Tokyo 190-0014, Japan
*²4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan
*³1-6-1 Okubo, Kumamoto, Kumamoto 860-8568, Japan
*⁴86 Nishimachi, Yonago, Tottori 683-8503, Japan

There are several reports on non-traumatic *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) infection rapidly progressing to intravascular hemolysis and metabolic acidosis and eventually death, within a few hours after admission. In such cases, a toxin of *C. perfringens* is responsible for causing intravascular hemolysis followed by severe anemia, acute renal failure, disseminated intravascular coagulopathy, and multiple organ failure. Surgical debridement is the treatment of choice. High dose of penicillin, hyperbaric oxygen treatment, continuous hemodiafiltration, polymyxin B-immobilized fiber direct hemoperfusion, and plasma exchange are also considered as promising treatment options. However, the optimal therapeutic strategy has not been established thus far. Antitoxin against the α toxin of *C. perfringens* has been used as a treatment for *C. perfringens* infection for a long time. However, medical doctors of the current generation are not familiar with this therapeutic option, because it has not been introduced as a treatment of choice in medical papers or congresses. Therefore, in this paper, we introduce the use of antitoxin against the α toxin of *C. perfringens* as the optimal therapy.

Key words: ① *Clostridium perfringens*, ② antitoxins, ③ gas gangrene antitoxin

J Jpn Soc Intensive Care Med 2010;17:287 ~ 289.

クロストリジウム属菌感染症と抗毒素療法

はじめに

クロストリジウム属菌による代表的な創傷感染症に、*Clostridium tetani* (*C. tetani*)による破傷風がある。破傷風菌(芽胞)は世界中の土壤に存在し、創傷局所に混入した菌が嫌気環境下で発育・増殖する際に産生した毒素により、破傷風を発症する。同様に、*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*)をはじめとして、*C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*といったガス壊疽の起原菌も広く土壤に存在する。ガス壊疽では、創傷部位に混入したこれらの菌の増殖に伴い、急速、広範囲な筋肉および皮下組織の壊疽を呈する。

上述した毒素産生細菌感染症の治療には、第一次世界大戦以降からウマ抗毒素血清製剤(ウマ免疫グロブリン)が開発され、現在も使用されている¹⁾²⁾。破傷風の治療にあつては、破傷風トキソイドの普及により、1970年代からヒト血液由来の免疫グロブリン製剤が開発・市販された。異種タンパクであるウマ抗毒素製剤よりも、治療だけでなく予防的利用が一般化している。

一方、ガス壊疽治療におけるウマ抗毒素製剤は、年間の使用数が限られるため製造所の採算性に乏しく、製造にあつては馬の管理などの特別な技術や経験が必要であり、国が備蓄供給を管理する国有品となっている。現在は*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*の各菌を別々に培養して得た毒素および、精製後にホルマリンで無毒化したトキソイドを用いて高度免疫したウマ血漿を原料として精製した「乾燥ガスえそウマ抗毒素」(乾燥ガスえそ抗毒素)が、(財)化学及血清療法研究所(熊本)で製造されている。本製剤の製造および品質管理方法は、生物学的製剤基準に従って安全性および有効性試験を実施し、さらに国家検定として国による品質確認が行われている³⁾。この基準では、各毒素に対する抗毒素価は、1バイアルの製剤中に5,000単位以上を含有することが求められる。添付文書による用法および用量では、添付20 mlの溶解液で溶解した後に、「治療にはなるべく早期に10,000~20,000単位(20~40 ml)を筋注あるいは静注

または生理食塩水で希釈したものを点滴静注する。また、予防的には5,000~10,000単位(10~20 ml)を静脈内あるいは筋肉内に注射する」と示している。

ガス壊疽抗毒素製剤の使用実態調査を、平成14年度の厚生省科学研究費補助金事業の研究班で、過去に本製剤の分与申請を行った医療機関25施設に対し実施した⁴⁾。その結果、わが国のガス壊疽感染の実態は変化しており、糖尿病や慢性肝疾患の増加に伴い、非クロストリジウム属菌によるガス壊疽患者の報告が多くなっていた。そして、このような患者に対しても適応外でガス壊疽ウマ抗毒素製剤が使用されていた。

他方、本報告⁵⁾にもあるように、非外傷性の*C. perfringens*感染症による死亡報告例もあり、感染後の病態に菌が産生した毒素の関与が疑われている。本疾患の治療法も、創傷性ガス壊疽と同様に外科的処置、抗菌薬療法および集中治療が求められている。

医師が*C. perfringens*によるガス壊疽と診断(疑いを含み)し、抗毒素製剤の投与が必要と判断して国家備蓄の抗毒素製剤を請求した場合は、行政側ではガス壊疽の定義に合致すれば申請は受理するのが一般的である。*C. perfringens*による感染が疑われるのであれば、抗毒素製剤投与による早期治療も選択肢の一つであり、抗毒素製剤の申請にあつては、病院検査室などによる当該菌の分離・同定は必須ではない。創傷性ガス壊疽においても抗毒素製剤の有効性の判断は、ガス壊疽の臨床症例が少ないため、各患者の基礎疾患、感染部位および病巣の広がりなどの違いによる比較は困難である。高齢化に伴う非外傷性ガス壊疽に対しては、ウマ抗毒素製剤の迅速な適応による延命効果、治療機転などの治療効果を見極めることが求められる。国家備蓄品の有効利用による患者救済が、本製剤の目的でもある。

国有ワクチン(抗毒素製剤を含む)の備蓄供給体制

国有ワクチン(抗毒素製剤を含む)の備蓄供給体制とは、国が買い上げることにより、その生産と供給を確保する体制である。患者数が少なくその需要が少ないことから、単独企業では採算がとれず、市場に任せられているはその供給が確保されにくいワクチンおよび抗

Table 1 国有ワクチン・抗毒素製剤の保管連絡先

保管場所	住所	電話	
			夜間・休日 (緊急時)
(株)ほくやく	〒063-0830 北海道札幌市西区発寒10条3-1-1 札幌西薬務センター	011-665-0989	011-665-0989
(株)バイタルネット	〒981-1298 宮城県名取市下余田字鹿島10	022-384-1119	080-3192-5235 080-3146-9870 090-2882-3054
デンカ生研(株)	〒959-1834 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 物流センター	0250-42-0712	0250-43-4111 0250-58-5574 0250-42-6898
(学)北里研究所	〒364-0026 埼玉県北本市荒井6-111	048-593-3939	048-543-7808 048-728-8016
(財)阪大微生物病研究会 (大阪)	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1	06-6877-4804	06-6850-0715 06-6831-1860
(財)阪大微生物病研究会 (観音寺)	〒768-0061 香川県観音寺市八幡町2-9-41	0875-25-4171	0877-21-1257 0875-23-2445 0875-27-7892
武田薬品工業(株)	〒743-8502 山口県光市大字光井字武田4720	0833-71-5511	0833-71-5546
(財)化学及血清療法研究所	〒860-8568 熊本県熊本市大塚1-6-1	096-345-6500	096-344-1211
(株)琉薬	〒901-2686 沖縄県浦添市牧港5-6-5	098-878-3111	098-878-3358 内線(1194) 098-863-3730 098-878-3314直通

厚生労働省連絡先 医薬食品局血液対策課 直通：03-3595-2395 FAX：03-3507-9064, 厚生労働省代表番号：03-5253-1111

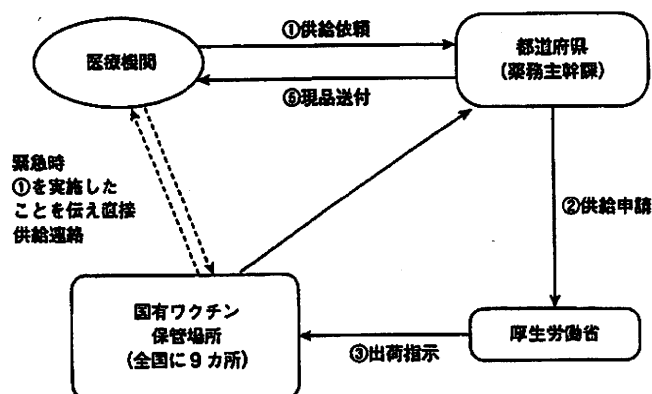


Fig. 1 国有ワクチン・抗毒素製剤の供給体制

毒素製剤が対象となる。それぞれ、コレラワクチン、乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの2種類、およびガスえそウマ抗毒素、乾燥ジフテリアウマ抗毒素、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(ABEF型およびE型)の4種類の製剤がある。これらは、国が計画的に買い上げて温度管理システムが整っている全国9カ所で保管し、緊急時に速やかに供給されている(Table 1)。なお、過去に患者が発生した都道府県においては、国有ワクチン

チンを国から直接買い上げ、独自に県内に保管し供給体制を構築している場合もある⁶⁾⁷⁾。

標準的な供給方法は、抗毒素製剤を必要とする医師や医療機関が都道府県の薬務所管課に供給申請を行い、薬務主幹課が厚生労働省に供給申請を行う。厚生労働省は、供給要請を受けて、抗毒素製剤の保管先に出荷指示を行い、医療機関に供給が行われる(Fig. 1)。

なお、緊急時にはTable 1に示す保管場所に直接電

話をして、医療機関、必要本数および申請窓口担当者などを連絡することにより、最小限の事務手続きで速やかに適切な対応がとられ、後日の申請処理も可能となっている。

高橋 元秀

国立感染症研究所細菌第二部

(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1)

Antitoxin therapy for Clostridial infection

Key words: ①antitoxin, ②treatment, ③*Clostridium perfringens*

Motohide Takahashi

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control,
National Institute of Infectious Diseases

4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

J Jpn Soc Intensive Care Med 2010;17:253~255.

文 献

- 1) Robertson M, Felix A. Serological studies in the group of the spore-bearing anaerobes. II. *IN VIVO* experiments with an "O" immune serum to *Vibrio septique* devoid of antitoxin content. Brit J Exp Path 1930;11:14-23.
- 2) Henderson DW. Studies on *clostridium chauvei*. Brit J Exp Path 1932;13:412-427.
- 3) (乾燥)ガスえそ抗毒素. 細菌製剤協会等監修. 生物関連製剤ハンドブック2004. 東京:じほう;2004. p. 24-7.
- 4) 高橋元秀, 杉本 央. わが国におけるガス壊疽抗毒素の使用状況に関するアンケート調査. 平成14年度厚生労働科学研究費補助金 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究 分担研究報告書. 2002.
- 5) 一二三亭, 高橋元秀, 諸熊一則, 他. *Clostridium perfringens* 感染患者に対する治療用ウマ抗毒素製剤の存在を知っていますか? 日集中医誌 2010;17:287-9.
- 6) 福岡県. 国有ワクチンの手引き. 国有ワクチンの概要. Available from: <http://www.pref.fukuoka.lg.jp/b02/kokuvu.html>
- 7) 北海道保健福祉部. 道有医薬品及び国有ワクチン・抗毒素の供給マニュアル(平成20年4月改訂版). Available from: <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/NR/rdonlyres/C421EB51-43CC-4D17-8D9A-06B80E5D719D/0/douvuuwakutin-manvuaru.pdf#search='国有ワクチン'>

受付日2009年12月26日

採択日2010年1月18日

