

## PCR 法を用いた破傷風毒素遺伝子病原体の検出

徳島県保健環境センター

森 敏彦・澤田千恵子・篠川知位子<sup>\*</sup>

Detection of Tetanus Toxin Gene by Polymerase Chain Reaction: A Case Study

Toshihiko MORI, Chieko SAWADA and Chiiko SASAKAWA

Division of Public Health Sciences, Tokushima Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences

### Abstract

Around 50 tetanus cases are reported every year in Japan. Though the incidence is low, the mortality rate is high. We report here a tetanus case, in which tetanus toxin gene was detected by the polymerase chain reaction (PCR).

Though tetanus is usually diagnosed clinically, PCR detection of tetanospasmin will facilitate rapid definitive diagnosis of this infection. We actually obtained the final results on September 2 only three days after the receipt of the specimen.

**Key words:** 破傷風 tetanus, テタノスパスマシン (神経毒) tetanospasmin

破傷風菌 *Clostridium tetani*

### はじめに

破傷風は、年間の届出患者数が50人前後と少ないが、致死率の高い疾患である<sup>1)</sup>。

今回、当センターにおいて破傷風毒素遺伝子をPCR法によるスクリーニング検査において陽性と判定した事例の概要について報告する。

### 症 例

症例：60歳男性。

平成17年8月12日、左頭頂部に5cmの裂傷を受けた。受傷後は特に加療なし。

8月15日から頭頸部痛に加え、歩行・呼吸が不安定となつたため、8月16日に救急搬送された。

受診時は意識清明、発語困難であった。自発呼吸はあったが、呼吸困難のため気管内挿管を実施した。臨床経過より破傷風と診断し、破傷風ヒト免疫グロブリンが計6,000単位投与された。

8月18日から全身痙攣、開口障害、困難、上肢・体幹の硬直が出現。

開放創から採取した検体の塗抹検査でグラム(+)、特徴的

な太鼓バチ状の桿菌を検出した。

ペニシリソ G2,000万単位/日の他、筋弛緩剤、抗痙攣剤等を投与した。

8月26日、創部から再度同様の桿菌が検出されたため、開放創のままオキシドールでの洗浄に変更した。また、破傷風ヒト免疫グロブリン合計3,000単位を追加投与した。

9月10日ごろから痙攣と硬直が軽減し始め、同14日に人工呼吸器から離脱、同17日には自力座位が可能となったが、開口困難は残存したため、10月3日リハビリ目的で転院した。

### 病原体の形態観察

検体は、8月31日当センターに搬入された。鏡検でグラム陽性球菌及びグラム陽性桿菌の混在が認められたため、破傷風菌の遊走性を利用すべく検体をあらかじめ嫌気条件により還元した5%羊血液寒天培地の辺縁部に塗布した。

嫌気条件下24時間培養後、コロニーの最先端部は肉眼的に純培養に近い状態であった。グラム染色、芽胞染色(Moeller法)を行い *Clostridium* 様桿菌を確認した。

### 病原体毒素遺伝子の検出

DNA 検体は、寒天平板上のコロニーを滅菌蒸留水により懸濁後、加熱／溶菌(95°C/10min)し、さらに遠沈(15,000

<sup>\*</sup> 現徳島県立中央病院

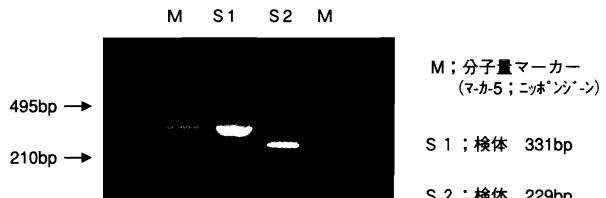


図-1 PCR 法による破傷風毒素(tetanospasmin)遺伝子の検出

rpm) し、採取した上清を使用した。

破傷風毒素遺伝子 (tetanospasmin) の検出は、PCR 反応を用いて加藤直樹らの方法<sup>2)</sup>に準拠した。

サイクル条件は、95°C 20sec, 55°C 20sec を35サイクル行い、PCR 産物の検出は、2 %アガロース寒天(TAKARA LO-3)で泳動後、常法により331bp 及び229bp のバンドを9月2日に確認した。(図1)

使用したプライマー

プライマーペア：

GAT1とGAT2 (331bp)

GAT5とGAT6 (229bp)

### むすび

破傷風の診断は、一般的に特有の臨床症状によるが、患者

から本病菌が分離され、さらにその菌株からマウス接種試験によって破傷風毒素が検出されればより確実になるとされている。

今回、典型的な破傷風の症状を呈した患者に対して PCR 法により破傷風毒素遺伝子を検出することで迅速かつ確実な診断につながった一例を報告した。

謝 辞：研究を行うにあたり、御協力をいただきました徳島日赤病院総合診療科 金崎淑子氏に深謝いたします。

### 文 献

1) 海老沢功：破傷風. 医学 1999; 54 (3月増刊) : 644–51.

Ebisawa I: Tetanus. Saishin-igaku 54(supple) : 644–651, 1999.

2) 加藤直樹, 他：神経毒を産生するクロストリジウムである *Clostridium tetani* と *Clostridium botulinum* の PCR による同定.

嫌気性菌感染症研究. 23, 86–89 (1993)

Naoki Kato, et al: Identification of Neurotoxin-producing *Clostridium tetani* and *Clostridium botulinum*