破　傷　風

目　次

1. 破傷風の概要
2. 破傷風の細菌学的検査における注意事項
3. 検査材料の採取・輸送・保管
4. 検査の実際
［１］検査材料の前処理
［２］細菌学的検査
（１）破傷風菌の分離・同定
（２）破傷風菌の顕微鏡観察
1) グラム染色
2) 芽胞染色
（３）破傷風毒素の検出：動物接種試験
（４）破傷風毒素遺伝子の検出：PCR 法
［３］血清学的検査
（１）破傷風毒素の検出
⇒［２］細菌学的検査（３）破傷風毒素の検出 を参照
（２）破傷風抗体の検出
1) 破傷風抗体簡易測定法：破傷風抗体測定キット「化血研」（ KPA 法 ）
2) 中和（発症防御）抗体測定法：破傷風毒素中和試験
5. 破傷風患者の診断と届出
6. 文献
7. 執筆者

1. 破傷風の概要

破傷風は、破傷風菌（*Clostridium tetani*）が産生する神経毒素（破傷風毒素）により引き起こされる疾患であり、強直性痙攣が主な症状である。破傷風菌は、芽胞の形で土壌中に広く分布し、外傷などによる創傷部位から侵入する。芽胞は感染部位が嫌気状態では発芽して栄養型菌となり、破傷風毒素を産生する。破傷風の特徴的な症状である強直性痙攣は、3～21 日の潜伏期間の後に感染部位近辺、顎、頚部の筋肉のこわばり、痙笑、開口障害、嚥下困難などの局所性の痙攣から始まり、呼吸困難や後弓反張などの全身性の痙攣に移行する。重篤な患者では呼吸筋の麻痺により窒息死することがある。初期症状(一般に開口障害）から全身性痙攣が始まるまでの時間をオンセットタイムといい、オンセットタイムが 48 時間以内である場合、患者の予後は不良であることが多いといわれている。現在、報告されている患者の 95%以上が 30 才以上の成人である。

2. 破傷風の細菌学的検査における注意事項

破傷風菌は偏性嫌気性の芽胞形成菌であり、本菌が産生する破傷風毒素は極めて毒性が強い。破傷風菌および臨床検体の検査は、国立感染症研究所や日本細菌学会の病原体等安全管理規程等を参考にバイオセーフティーレベル 2 以上の検査施設で行うとともに、以下の事項について注意が必要である。

破傷風菌は偏性嫌気性菌であるので、検査過程での酸素への暴露はなるべく短時間にすることが望ましい。

［１］検査環境が芽胞で汚染された場合は対処が困難なため、芽胞を含む可能性のある検体の取り扱いには十分な注意が必要である。もし汚染した場合は、エタノールが無効のため取扱者は物理的な排除で対応する。芽胞の消毒には通常使用濃度の 5 倍ほどの次亜塩素酸またはグルタールアルデヒドによる処置を行う。具体的には、耐薬品性の高い芽胞の処理は、まず物理的な拭き取りでその汚染量を減らす。その後、上に挙げたような消毒薬をかけて３時間以上の浸漬を行った後、ペーパータオルで拭き取り、水をしみ込ませたペーパータオルで水拭きを何回か繰り返し、最後に乾拭きする。これらの消毒剤は刺激性が強いため注意が必要である。

［２］不測の事態に備え、破傷風の検査従事者は自分の血中破傷風抗体価を測

定し、抗体価が発症防御に必要な抗体価（0.01 U/mL）未満の場合には、破傷風トキソイドの接種により破傷風に対する免疫を獲得しておくことが望ましい。

3. 検査材料の採取・輸送・保管

［１］採取

破傷風を対象とした検査では、破傷風の疑いのある患者の創傷部位のデブリドーマン（創面切除法）による組織片、洗浄液、膿汁、さらに患者血清などが検査材料となる。検査材料の採取方法は、一般的な細菌学的材料の採取方法と同様であるが、スクリューキャップ付チューブなどの密閉容器に採取する。採取された臨床材料への検査環境中の微生物による汚染を避ける。材料の包装には、材料の組織などの名称、患者の症状や疑いのある疾病、採取された日時、その他の特記事項を記載する。材料の採取時期は患者への抗菌薬と抗破傷風ヒト免疫グロブリンの投与前が望ましいが、投与後の場合は、投与された抗菌薬や抗破傷風ヒト免疫グロブリンの名称、投与量、そして投与日時などを明記する。

［２］輸送

検査材料の輸送の際は、国立感染症研究所のホームページのバイオセーフティ管理室（http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biosafe.html）の記載事項を確認の上、輸送内容に応じて以下の記事を参照して梱包する。

http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biosafe/947-youkisb.html

または

http://www.nih.go.jp/niid/images/biosafe/who/WHOguidance_transport11-12.pdf#page=21

梱包した検査材料の輸送はゆうパックに依頼する。また、検査材料を梱包した容器を保冷状態に維持して輸送することが望ましい。

［３］保存

採取された検査材料は、直ちに検査されるべきである。しかし、やむを得ない場合は、凍結や乾燥を避け冷蔵保存する。しかし、保存に時間がかかる場合は凍結して材料の変質を防ぐ。

4. 検査の実際

［１］検査材料の前処理

患者の創傷部位のデブリードマンによる組織片や、洗浄液、膿汁等の臨床材料からは、破傷風菌の分離や破傷風毒素の検出を試み、患者血清からは、破傷風毒素や破傷風抗体の検出を試みる（表 1)。

これらの臨床材料はそのまま、もしくは必要に応じてハサミなどを用いて細切して滅菌生理食塩水を添加したものを検体として、検査に使用する。

表1.各検体における破傷風の検査項目

検査事項 / 検体	菌の分離	毒素の検出	抗体価の測定
組織片 組織洗浄液 膿汁など	○	○	×
患者血清	×	△	○
分離菌の培養濾液	×	○	×

○：検出可能、△：検出困難、×：検出不能

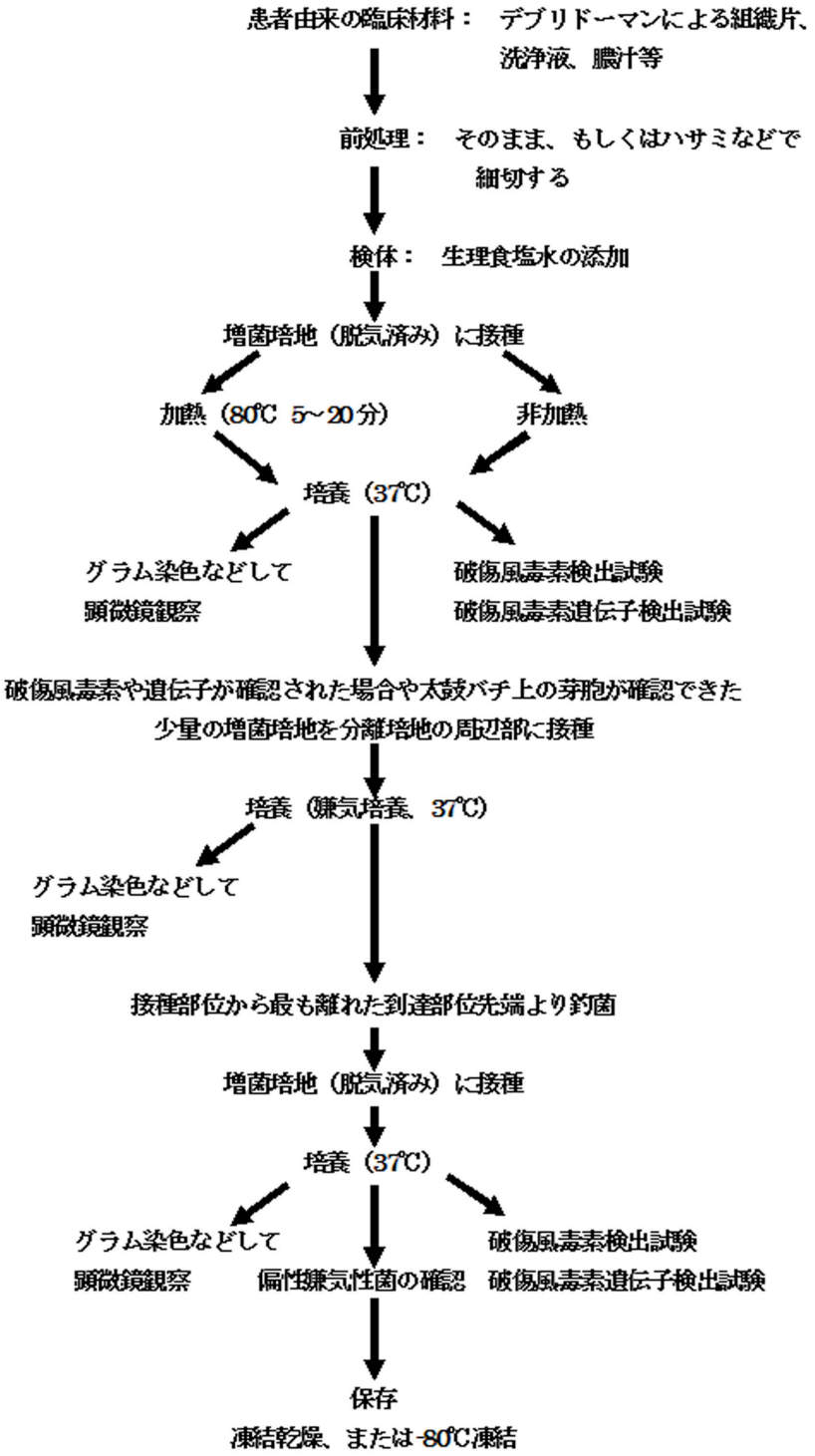
［２］細菌学的検査

細菌学的検査としては、主に破傷風菌の分離・観察や破傷風毒素活性の検出がある（図 1)。

破傷風患者は通常、破傷風特有の臨床症状（強直性痙攣）により診断されるが、患者の臨床材料から破傷風菌が分離され、さらに分離菌株より破傷風毒素が検出されれば、より確実な“病原体診断”となる。

分離菌株から毒素遺伝子が検出されても毒素の産生が認められないことがあるので（サイレント遺伝子の存在)、動物接種試験で破傷風毒素活性を確認し、毒素の検出を行うべきである。

図１．細菌学的検査の流れ



○脱気により増菌培地は嫌気状態になるので嫌気条件での培養の必要はない

（１）破傷風菌の分離・同定

破傷風は主に臨床症状により診断されることが多く、患者の臨床材料から破傷風菌の分離を試みる機会は少ない[2)]。しかし、患者の臨床材料から破傷風菌が分離・同定され、さらに破傷風毒素が検出されれば、破傷風の診断がより確実となる。

材料

1)検体（前処理済みの臨床材料）

2)増菌培地（使用前に 100℃ 5 分間煮沸後、急冷することにより脱気する。）

クックドミート培地（BD-DIFCO など）

酸化還元電位を下げるために、システイン（最終濃度 0.03%）[2)]や、グルコース（最終濃度 0.5%）を加える場合もある。

チオグリコール酸培地（日水製薬など）

3)分離培地（寒天濃度：1.5%）

変法 GAM 寒天培地（日水製薬）

嫌気性菌用血液寒天培地（日水製薬、極東製薬、日本 BD などから市販されているが、自家製でも 可）

4)嫌気培養装置等

酸素ガス吸収・炭酸ガス発生剤（三菱ガス化学 アネロパック）、または嫌気性チャンバー等を使用する。

5)滅菌エーゼ

方法

1)２本の増菌培地（10 mL/本）に、検体（0.5～1 g または 0.5～1 mL/本）を接種する。

2)1 本の増菌培地を 80℃で５～20 分間加温し、もう 1 本の増菌培地は非加熱のまま、37℃で２～４日間培養する。（破傷風菌には、芽胞形成能が低い菌株も存在し、このような菌株は加熱により容易に死滅するため、非加熱の増菌培地も用意する。）

3)培養 2，3 日目の培養液をグラム染色し、太鼓バチ状の有芽胞桿菌を観察する。培養 4，5 日目の培養上清について破傷風毒素の検出〔 4.-[

２]-(３)〕を実施する。培養沈渣については破傷風毒素遺伝子のPCR法〔４.-[２]-(４)〕を実施して毒素遺伝子の有無を確認する。

4)太鼓バチ状の有芽胞（端在芽胞）桿菌が確認されるか、破傷風毒素あるいは毒素遺伝子が確認された場合、破傷風菌が含まれている可能性が高い。その少量の培養液を寒天平板培地の辺縁に接種し、37℃で24時間嫌気培養する。

5)破傷風菌は一般的に遊走性を示すため、分離培地上で嫌気培養すると接種部位から離れた所まで到達する。その到達部位の先端では純培養に近い状態で破傷風菌を得ることができる[1, 2]。しかし、遊走性の低い破傷風菌株も存在するので、注意が必要である。

6)分離菌を増菌培地（脱気済み）で４～６日間培養し、その菌液を検体にして、後述の破傷風毒素の検出〔４.-[２]-(３)〕を実施する。また、PCR法を用いて破傷風毒素遺伝子の検出〔４.-[２]-(４)〕を実施して毒素遺伝子の有無を確認する。

7)6)の分離菌が偏性嫌気性菌であることを確認するため、嫌気性菌用血液寒天培地に塗抹し、好気および嫌気条件下でそれぞれ培養する。嫌気条件下でのみ発育することを確認する。

判断

グラム陽性、偏性嫌気性桿菌で、端在芽胞を有し、遊走性を示し、破傷風毒素を産生することを確認した菌株について、破傷風菌と同定する。

参考

分離培地の寒天濃度を３％にすると破傷風菌の遊走性が低くなり、単一のコロニーの形成効率が改善されることがある[3]。

（２）破傷風菌の顕微鏡観察

破傷風は少ない菌数による感染で発症すると考えられ、患者臨床材料の直接塗抹標本を鏡検した場合、菌を確認できる確率は低いとされている。

芽胞を形成している破傷風菌をグラム染色や芽胞染色後に観察すると、特徴的な太鼓バチ状の桿菌として観察される。しかし、芽胞形成は

多くの環境要因に影響を受けるので、芽胞の有無だけで破傷風菌かどうかの判定はできない。

1) グラム染色

材料

a) 検体（前処理済みの臨床材料）

b) グラム染色用染色液

c) スライドガラス

d) 顕微鏡

方法

a) 検体をスライドガラス上に塗抹する。
（スライドガラスにガラス鉛筆等で検体塗抹箇所を記す）

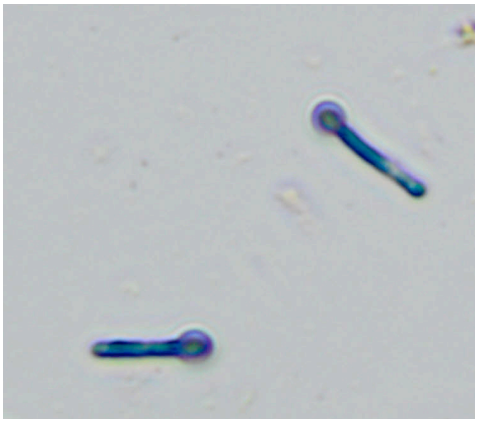
b) 検体を乾燥後、ガスバーナー等で火炎固定、またはメタノールにより固定する。

c) 固定された検体を染色し、スライドガラスを乾燥後、顕微鏡観察する。

※染色キットを使用する際は、キット添付の使用書に従う。

判定

菌体は青色染色される。しかし、芽胞を形成している場合は、芽胞は染まらない（下写真）。また、培養を続けると、陰性化し赤色に染色される傾向がある[1)]ので注意が必要である。



2)芽胞染色：MoeLLer 法[4)]

材料

a)検体（前処理済みの臨床材料）

b)a 液：ZiehL 石炭酸フクシン液

フクシン原液と 5%石炭酸水溶液 を １：９ の割合で混ぜた混合液

c)エタノール

d)b 液：LoeffLer メチレンブルー液

メチレンブルー原液と 0.01%水酸化カリウム水溶液を３：10 の割合で混ぜた混合液

e)スライドガラス

f)顕微鏡

方法

a)検体をスライドガラス上に塗抹する。

b)検体を乾燥後、ガスバーナー等で火炎固定、またはメタノールにより固定する。

c)a 液で塗抹面を被い、ガスバーナーで湯気が出るまで加温する。

d)湯気が出たら加温をやめ、５分間放置する。

e)流水でスライドガラスを軽く水洗する。

f)赤色が消失するまで、エタノールで脱色する

g)b 液で塗抹面を被い、1～２分間染色する。

h)流水でスライドガラスを軽く水洗する。

i)スライドガラスを乾燥後、顕微鏡観察する。

判定

MoeLLer 法では、菌体は青色、芽胞は赤色に染色される。

（３）破傷風毒素の検出：動物接種試験

臨床材料から直接破傷風毒素が検出される事例は多くない。しかし、臨床材料から破傷風菌が分離された場合、通常、その菌株の培養濾液から破傷風毒素を検出することができる。比較的入手が容易な実験動物であるマウスを用いる方法を示す。

材料

1)検体（臨床材料や菌液）

患者の創傷部や痂皮などの臨床材料は、細切し少量の PBS に浮遊させる。菌液は、培養液を遠心分離（4℃、10,000～15,000rpm、5 分）し、その遠心上清を PBS で 10 倍希釈する。

2)ディスポーザブルメンブレンフィルター（0.22 μm）

3)マウス：ddY（比較的安価で入手が容易）、SPF、体重約 16-20 g、4 週前後、1 群 2 匹投与する。

4)抗破傷風毒素抗体（200 単位/mL 以上の破傷風抗体を含む）（感染研から分与可能）

5)ディスポーザブル注射筒：１mL ２本

6)ディスポーザブル注射針：25G × １インチ、１本／注射筒

7)PBS：滅菌済み 0.2%(w/v)ゼラチン加 0.017 M リン酸塩緩衝 0.15 M 塩化ナトリウム液（pH7.0）（ゼラチンは、破傷風毒素が容器内面に付着して毒素溶液の濃度低下を防ぐために添加する。）；無水リン酸一水素ナトリウム 1.42 g、リン酸二水素カリウム 0.91 g、塩化ナトリウム 8.5 g、ゼラチン 2.0 g を加温溶解し水酸化ナトリウム溶液にて pH7.0 に調整した後、1000 mL としオートクレーブ滅菌する。

方法

1)ディスポーザブルメンブレンフィルターを用いて検体を濾過する。

2)マウス（a）：検体の濾液（0.5 mL）を大腿部皮下に注射する（臨床検体が少量の場合、接種量は 0.5 mL よりも少なくてよい）。

3)マウス（b）：予め PBS で 10 U／mL に希釈した抗破傷風毒素抗体と検体の濾液を等量混合し、室温で 1 時間反応させる。この反応液 0.5 mL をマウスの大腿部皮下に接種する。

4) これらのマウスを４日間毎日観察する。

判定

抗破傷風毒素抗体により中和された場合、破傷風毒素と判定する。

すなわち、接種濾液中に破傷風毒素が存在する場合、マウス（a）では破傷風毒素特有の強直性痙攣などが認められ、濾液中の毒素量が多い時は死亡する。マウス（b）は抗破傷風毒素抗体により破傷風毒素が中和されるために発症せず、生存する。

参考

マウス（a）と（b）がともに死亡しない場合、破傷風毒素を含めマウスに対して致死活性を示す物質が接種濾液中に存在しないと考えられる。マウス（a）と（b）がともに死亡した場合、接種濾液中に抗破傷風毒素抗体で中和しきれない破傷風毒素が存在する可能性があるため、接種濾液を 100 倍希釈から 10 倍階段希釈して 10000 倍までの 3 希釈を作製し、再度、動物接種試験を行う。再試験でもマウス（a）と（b）が ともに死亡した場合、マウス致死活性を有する破傷風毒素以外の物質の存在が疑われる。

（４）破傷風毒素遺伝子の検出：PCR 法

PCR 法による破傷風毒素遺伝子の検出は、比較的迅速で簡便に実施できるため、分離培養検査時の菌の追跡やコロニーのスクリーニングに非常に有効である。また動物接種試験を行わなくても、毒素産生能の可能性を容易に知ることができる。しかし、サイレント遺伝子の可能性もあるので、厳密には PCR 法による毒素遺伝子検出のみで破傷風毒素産生能の有無を判定せず、最終的にはマウス法によって毒素産生性の有無を確認する必要がある。

以下に、PCR 法による破傷風毒素遺伝子の検出法の概略を示す。
詳細は 畠山らや加藤らの文献[5, 6]を参考にされたい。

材料

1)検体（分離菌株）

2)ブレインハートインフュージョン培地（日水製薬 など）

3)プライマー（ プライマーペア：GAT1 と GAT2、GAT5 と GAT6 ）

GAT1（5'- GATGATACGTATGCCAATAACC -3'）

GAT2（5'- TAAGGCTTCACCTGCTACATTG -3'）

GAT5（5'- CTACATGGTTTATACGGAATGCAGG -3'）

GAT6（5'- GATCATTGCAGCTAGTGACTTGAC -3'）

4)PCR 反応用試薬（市販品）等

方法

1)検体をブレインハートインフュージョン培地で、37℃、18 ～24 時間嫌気培養する。

2)培養菌液 100 μL を 100℃で 5 分間加熱し、10000～15000 rpm で 1 分間遠心した上清をテンプレートにする。

3)PCR 反応用試薬の説明書に従い、PCR 反応の準備を行う。

4)プライマーの添加量はそれぞれ最終濃度を 0.4 μM で反応液に加える。

5)サーマルサイクラーを用い、95℃・20 秒間、55℃・2 分間を 35 サイクル行う。

6)2%アガロースゲルを用い、PCR 産物を電気泳動する。

7)アガロースゲルをエチジウムブロマイド染色液で染色する。

8)染色したアガロースゲル上で、PCR 産物（バンド）を確認する。

判定

アガロースゲル上で 331 bp（GAT1-GAT2）と 229 bp（GAT5-GAT6）のバンドが観察されれば、破傷風毒素遺伝子陽性と判定する。

破傷風患者における病原体診断では 破傷風菌の毒素産生を確認する必要があるので、PCR 法による毒素遺伝子の検出は、補助的な試験と考え、動物接種試験を行う必要がある。

［ 3 ］血清学的検査

血清学的な検査として、主に患者血清中の破傷風毒素や破傷風抗体の検

出がある。通常、検査に使用できる患者血清の量は少ないので、検査計画を綿密に立て、効率良く検査を実施する。

（１）破傷風毒素の検出

⇒［２］細菌学的検査 －（３）破傷風毒素の検出：動物接種試験 を参照

（２）破傷風抗体の検出

血清学的な検査の一つとして、患者血清中の破傷風抗体価を測定するが、本マニュアルでは、1)破傷風抗体簡易測定法（破傷風抗体測定キット「化血研」（KPA 法））と、2）中和抗体価測定法（破傷風毒素中和試験）を示す。

迅速に破傷風抗体価を測定できる 1）の KPA 法は、早期診断が重要な破傷風では有用である。2）の破傷風毒素中和試験は、破傷風毒素に対する中和（発症防御）抗体価を測定できる唯一の方法である。

1)破傷風抗体簡易測定法：破傷風抗体測定キット「化血研」（KPA 法）

連絡先：(財）化学及血清療法研究所 第一製造部 開発室　TEL：096－344 － 1211 諸熊 一則、田嶋 義高

この試験法では、破傷風毒素に対する中和抗体価ではなく、ポリアミノ酸粒子に吸着した破傷風トキソイドと抗体が結合することにより、凝集抗体価を定量する。しかし、この試験で測定された凝集抗体価と中和抗体価の間には高い相関が確認されているので、破傷風抗体価の簡易測定法として十分利用可能である。また、実験動物を使用し判定までに長期間を要する破傷風毒素中和試験に比較して、安価かつ迅速に抗体価を測定できる。

試験方法はキット内添付文書を参照されたい。

2)中和（発症防御）抗体測定法：破傷風毒素中和試験

破傷風毒素に対する中和抗体を測定できる唯一の抗体価測定法である。この試験法は実験動物を使用するため、費用と判定まで時間を要する。そのため、早期診断には向かないが、ELISA 法で測定した発症防御レベル以上の抗体価を保有していながら、破傷風を発症した例

などのように、中和抗体価を確認するための方法として重要である。具体的な測定方法は、生物製剤基準の破傷風抗毒素価測定法に記載（p275）されている。

5. 破傷風患者の診断と届出

破傷風は、その急激な臨床経過と治療を行わない場合の致死率が高い疾患のために、早期診断・早期治療が重要である。

診断は、臨床症状に加え菌の分離による総合診断（臨床診断＋病原体診断）を行うことが薦められる。しかし、1999 年、2000 年の 2 年間に発生した 156 例の破傷風患者に関する詳細な調査で、病原体診断がされたのは 1 例のみであった[7)]。さらに、受傷部位の特定が出来なかった患者の割合も 23.6%あった[7)]。このような報告から、開口障害、嚥下困難等の破傷風を疑う症状がある場合は、慎重に診断を行い、速やかに免疫グロブリン投与を行うことが大切である。

免疫グロブリン投与前の患者血清からの抗体検出は、患者が抗毒素抗体を有しているか、すなわち破傷風免疫をなされているかを確認できて有用である。しかし、(ELISA 法で測定した）発症防御レベル以上の抗体価を保有していながら、破傷風を発症した例[8,9)]も報告されているため、注意が必要である。

感染症法に基づく届出は、患者を診断した医師が 7 日以内に所管の保健所に届出をすることが定められている[10)]。

その折、破傷風菌を分離し、毒素を検出すれば「病原体診断」の旨を発生届に記載する。

6. 文献

1) 微生物検査必携細菌真菌検査 第三版、(財) 日本公衆衛生協会（1987）
2) 臨床検査のための嫌気性細菌学 第三版、日水製薬社（1978）
3) 海老沢 功：破傷風、日本医事新法社（1988）
4) 戸田細菌学 31 版、南山堂（1997）
5) 畠山 薫、他：小学校で飼育されていた家兎の破傷風 . 日本獣医師会雑 誌、 53（６）、405-408、(2000)
6) 加藤直樹 他. 日本臨床微生物学雑誌 1993; 3 (2):104-109.
7) http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/466-tetanis-info.

html
8) Crone and Reder, NeuroLogy 1992; 42(2): 761-764
9) Kai König et.al., Pediatrics November 1, 2007 120: e1355-e1358
10) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（1998 年施行）

7. 執筆者

遠藤 美代子　endoh@tokyo-eiken.go.jp
東京都立衛生研究所 微生物部
〒 169-0073　東京都 新宿区 百人町 3-24-1
TEL： 03-3363-3231
FAX： 03-3368-4060

世良 暢之　SERA@star-fihes.pref.fukuoka.jp
福岡県保健環境研究所 保健科学部 病理細菌科
〒 818-0135　福岡県 太宰府市 大字 向佐野 39
TEL： 092-921-9944
FAX： 092-928-1203

福田 靖　yfukuda@nih.go.jp
高橋 元秀　motohide@nih.go.jp
岩城 正昭　miwaki@nih.go.jp
荒川 宜親　yarakawa@nih.go.jp
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
TEL： 042-561-0771
FAX： 042-561-7173

第２版追加執筆者（平成 26 年 7 月）

畠山　薫　Kaoru_Hatakeyama@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全センター　微生物部　病原細菌研究科
〒 169-0073　東京都 新宿区 百人町 3-24-1
TEL： 03-3363-3231
FAX： 03-3368-4060

河合　高生　kawai@iph.pref.osaka.jp
大阪府立公衆衛生研究所　感染症部　細菌課
〒 537-0025　大阪市東成区中道 1-3-69
TEL： 06-6972-1321
FAX： 06-6972-1329

山本　明彦　yama-aki@nih.go.jp
加藤　はる　cato@nih.go.jp
柴山　恵吾　keigo@nih.go.jp
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
TEL： 042-561-0771
FAX： 042-561-7173