

炭疽検査マニュアル

(第 3 版)

令和元年 12 月

炭疽検査マニュアル 目次

	ページ
I. 炭疽について	1
1. 疫学	1
2. 臨床症状	1
II. 細菌学的検査	3
1. 炭疽菌(<i>Bacillus anthracis</i>)の形態	3
2. 莢膜および芽胞の染色	3
2. 1. 1 ポリクローム・メチレンブルー染色	3
2. 1. 2 レフレルのメチレンブルー染色	4
2. 2 レビーゲル染色：莢膜染色	4
2. 3 ギムザ染色：莢膜染色	4
2. 4 芽胞染色	5
3. 分離培養法	5
3. 1 分離培養用培地	7
3. 2 ガンマ(γ)ファージテスト	9
3. 3 パールテスト	9
3. 4 形態及び生化学的性状	11
3. 5 動物接種	11
III. 遺伝子診断	13
1. 遺伝子診断における注意点	13
2. 鋳型 DNA の調製	14
2. 1 菌株	14
2. 2 粉状物	15
2. 3 食品、組織及び臓器	15
3. PCR	16
3. 1 プライマーオリゴヌクレオチド	16
3. 2 PCR 反応液	16
3. 3 反応条件	16
3. 4 電気泳動	16
IV. 汚染の除去と消毒	17
1. 汚染の除去、消毒および滅菌	17
2. 検査室における消毒	17
3. 人体の汚染	17
4. 建物等の汚染	18
5. 衣服、道具、器物等の汚染	18

6. 水の汚染	18
V. 文献	19
VI. 連絡先 別表	19

I. 炭疽について

炭疽(*anthrax*)は *Bacillus anthracis* (炭疽菌)の感染によっておこる急性敗血症性の疾病である。人獣共通感染症(動物由来感染症: *zoonoses*)として重要であるが、ウシやウマなどの草食獣に比べてヒトは比較的抵抗性が強いといわれる。

1. 疫学

炭疽菌は地球上に広く存在し、世界の多くの地域で炭疽の発生がみられる。患者数および動物の炭疽の発生は、発展途上国や獣医衛生の立ち後れている国に多くそれぞれ年間およそ2万人および100万頭に達すると推定されている。一方、先進国で見られる炭疽は動物の組織の処理過程での孤発的発生が多い。ヒトおよび動物の炭疽の自然感染は、偶発的に摂取(あるいは接触)した芽胞が原因であり、炭疽菌が個体から個体へ直接伝播されることはほとんどない。

炭疽菌は土壌などの環境中で芽胞として長期間生残し、動物に感染を繰り返す。芽胞が生体内に侵入すると発芽し、栄養型として体内で急速に増殖し炭疽を発病する。感染した動物の血液、体液、死体などで地表が汚染すると、その土壌は再び感染源となりうる。炭疽菌はこのような感染サイクルを繰り返して炭疽汚染地帯を作る。スペイン中部からギリシャ、トルコを経てパキスタンに及ぶ汚染地域は炭疽ベルトとも呼ばれる。近年わが国では家畜衛生等の対策が功を奏して動物の炭疽発生は極めて少なくなり、その結果ヒトの炭疽発生もない。

炭疽菌による暴露が明らかな場合、発症前であれば経口感染や吸入感染であっても抗生物質による暴露後治療が効果的とされる。発症者にはシプロフロキサシンやドキシサイクリンの投与が推奨される。ウシおよびウマの予防には莢膜プラスミドが脱落した無莢膜ワクチン株の生菌ワクチンが用いられている。ヒト用ワクチンが実用化されている国もあるが、わが国では使用されていない。

家畜からヒトへの伝播の防止は、病獣の同定診断と淘汰が第一である。非流行国における炭疽の発生は流行地域から輸入される羊毛や骨などの動物産品からおこる危険性が高いため、防疫には汚染された家畜成分のサーベイランス、および検疫が有効である。

2006年から2009年の間に米国および英国で、獣皮革製のドラム(太鼓)による炭疽が発生した。これらの事例は炭疽発生国から未処理で輸入された獣皮革に炭疽菌の芽胞が汚染していたことによるものと考えられている。2009年から2010年にかけては欧州北部においてヘロイン薬物中毒患者の間で注射由来の炭疽(*injection anthrax*)が発生した。

2. 臨床症状

ヒトの病型は伝播様式によって皮膚炭疽(経皮感染)、腸炭疽(経口感染)、および肺炭疽(吸入感染)に三つに大きく分けられる。

皮膚炭疽：

炭疽の自然感染の 95%以上が皮膚炭疽である。炭疽菌芽胞は正常の皮膚からはほとんど侵入せず、創傷部から体内に取り込まれる。炭疽菌や芽胞を含んだ動物又はその成分と接触した後 1～10 日して小さな掻痒性、無痛の丘疹が出現し、周囲に発疹と浮腫が出現する。丘疹は崩壊し、潰瘍を形成する場合がある。局所リンパ節の腫脹が著しい。未治療の場合の致死率は 10～20%とされる。

腸炭疽(出血性腸炎)：

感染獣の肉を摂食して発症する。症状は悪心、嘔吐、食欲低下、発熱で始まる。 2～3 日後激しい腹痛と血液を含んだ下痢がある。この激しい症状のあと、毒血症、ショック、死亡に至ることがある。病変は盲腸に見られ、時に他の大腸部や十二指腸にも見られる。未治療の場合の死亡率は 25～30%とされる。

肺炭疽：

発生はきわめてまれである。初期にはインフルエンザ様症状（軽度の発熱、消沈、筋肉痛など）を示し、発熱、呼吸困難、咳、頭痛、嘔吐、悪寒、脱力、腹部と胸部の疼痛が見られる。胸部に浸潤像は見られないが、胸水をともなった縦隔の拡張がある。未治療の死亡率は 90%以上に達するとされる。

動物における炭疽は草食獣、特にウシやウマなどに多い。甚急性/急性感染、および亜急性/慢性感染の病型が知られている。症状は眼結膜の充血、可視粘膜の浮腫、呼吸困難などで、感受性の強い動物は急性敗血症や尿毒症による腎障害を呈して死亡する。

II. 細菌学的検査

1. 炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の形態

炭疽菌(*B.anthraxis*)は、1.5～3 μm のグラム陽性大桿菌で鞭毛は保有していない。感染動物の体内では単在か短連鎖であるが、培地で人工培養すると並列または絡み合った状態の長連鎖を呈する。

2. 莢膜および芽胞の染色

莢膜は、炭疽菌の強毒株がウシ、マウス、モルモット等に感染するとその体内で形成される。このほか、ウマやウシなどの血清を 10～20% 添加した普通寒天培地に塗抹し 10～30% CO_2 存在下で一晩(18 時間程度)培養すると莢膜が形成される。本法で培養した強毒株の炭疽菌集落は S 型で、血清非添加で好気条件下で培養した時の R 型とは容易に区別できる。また、ブレイン・ハート・インフュージョン(BHI)寒天培地で 24 時間程度培養した菌を 1 白金耳分取り 2～3ml のウマ脱線維素血液に接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5～8 時間培養後、厚めの塗抹標本を作製し染色を行う。

芽胞は、0.8～1.2 μm ほどの楕円形または卵円形で菌の中央に菌体の幅以内で形成される。一般的に感染動物体内では形成されないが、剖検や出血により菌が空気に触れると形成される。人工培地では、2% NaCl の添加または対数増殖期以降も培養を続けると芽胞の形成が促進されるが、 Ca^{++} の存在で抑制される。

2. 1.1 ポリクローム・メチレンブルー染色

(Polychrome methylene blue stain : M'Fadyean's reaction) : 莢膜染色

【染色液】

- 1) メチレンブルー0.3g を純エタノール 30ml に溶解する。
- 2) 0.01% 水酸化カリウム 溶液を 100ml 作製し混合する。

新たに調製した 2)の溶液は染色性が悪いので、古い染色液でも同時に染色して染色性を比較し、莢膜が染色されることを確認できるまで保存してから使用する。

【染色法】

- 1) スライドグラスに菌を 1.5 μl 滴下あるいは血液や感染動物の臓器をスタンプし、カバーグラスをかける。
- 2) 風乾後、無水または純エタノール(メタノールでもよい)に 60 秒間浸漬、固定後、再度風乾させる。
- 3) 染色液を塗抹面に満遍なく滴下し、60 秒間放置する。
- 4) 水洗し、濾紙で水分を吸収し、乾燥させる。洗浄水は高圧蒸気滅菌または、1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液中と混ぜて消毒する。

- 5) まず、100 倍で観察し、次いで 1,000 倍で莢膜を観察する。2～4 個または長連鎖した無芽胞を観察すると莢膜はピンク色、菌体は青色に染色される。使用した濾紙及びスライドグラスは、高圧滅菌または 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液中に浸漬後捨てる。

2. 1.2 レフレルのメチレンブルー染色：莢膜染色

【染色液】

- 1) メチレンブルー 5g を純アルコール 100ml に溶解したものをメチレンブルー原液とする。
- 2) メチレンブルー原液 30ml に 0.01% 水酸化カリウム溶液 100ml を加えて混和する。これをレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液という。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、無水または純エタノール(メタノールでもよい)に 60 秒間浸漬、固定後、再度風乾させる。
- 3) 固定後速やかにレフレルのアルカリ性メチレンブルー染色液を載せ数秒間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は青色、莢膜は淡青色に染色される。本染色法は、染色時間が長くなると菌体と莢膜の区別がつかなくなる。
- 5) レフレルのメチレンブルーは古くなると酸化されて染色性が良くなる。37°C 一晚静置あるいは 1% 炭酸カリウム(K_2CO_3)溶液の添加において酸化が促進される。

2. 2 レビーゲル染色：莢膜染色

【染色液】

- 1) ゲンチアナバイオレット 10g と局方ホルマリン 100ml を混和する。
- 2) よく混和し、数時間後に濾過する。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、固定せず染色液を載せて 20～30 秒間染色する。
- 3) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は鮮やかな紫色、莢膜は淡い紫色に染色される。

染色液には、ホルマリンが入っているので殺菌効果が強く安全であるが、洗浄液やスライドグラスは滅菌後捨てる。ヒトや動物が敗血症死後時間が経過すると染色性が悪くなる。

2. 3 ギムザ染色：莢膜染色

【染色液】

- 1) 水 2ml にギムザ染色液を 1～3 滴加えた薄い染色液を作る。

【染色法】

- 1) スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2) 完全に風乾したら、ホルマリンガスで固定する。200 または 300ml のビーカーにホルマリンを 10ml 位入れ、そこに 1)で作製したスライドグラスの塗抹面を下向きにして斜めに立て、発生したホルマリンガスが漏れないように上部はアルミ箔で覆って3～5 分間固定する。
- 3) 固定後 ギムザ染色液で2～3 分間染色する。
- 4) 水洗し、乾燥後鏡検する。菌体は濃紫色、莢膜は淡紫色に染色される。本染色法では、

白血球や赤血球も紫色に染色されるので血液塗抹標本では菌と血球との比較ができる。

2. 4 芽胞染色

【染色液】

- 1) 飽和マラカイトグリーン水溶液 6.9g /100ml (20°C)を作成する。マラカイトグリーン粉末は非常に飛散しやすいので閉鎖容器内で秤量するとよい。
- 2) 0.25%サフラニン水溶液を作成する。

【染色法】

- 1)スライドグラスに培養した菌、血液や感染動物の臓器を塗抹またはスタンプする。
- 2)完全に風乾したら、ホルマリンガスで固定する。
- 3)固定後上記飽和マラカイトグリーン水溶液を標本上に満載し、10 分間染色する。
- 4)水洗後、サフラニン水溶液で約 30 秒間、後染色する。
- 5)乾燥後鏡検する。菌体は赤色、芽胞は緑色に染色される。

染色時、飽和マラカイトグリーン溶液で染色する場合は加温する必要はない。

3. 分離培養法

炭疽菌は、普通寒天培地や普通ブイヨンでよく発育する。発育至適温度は 37°Cであるが、12～44°Cでも発育する。普通寒天培地で好氣的条件下において 37°C、18 時間位の培養により、やや乾燥、隆起した **Rough** 型の大きな集落を生じる。普通寒天培地では、束状の長連鎖発育をするため集落の周縁はカール(捲毛: **Medusa-head**)状、表面は粗造でスリガラス様構造である。

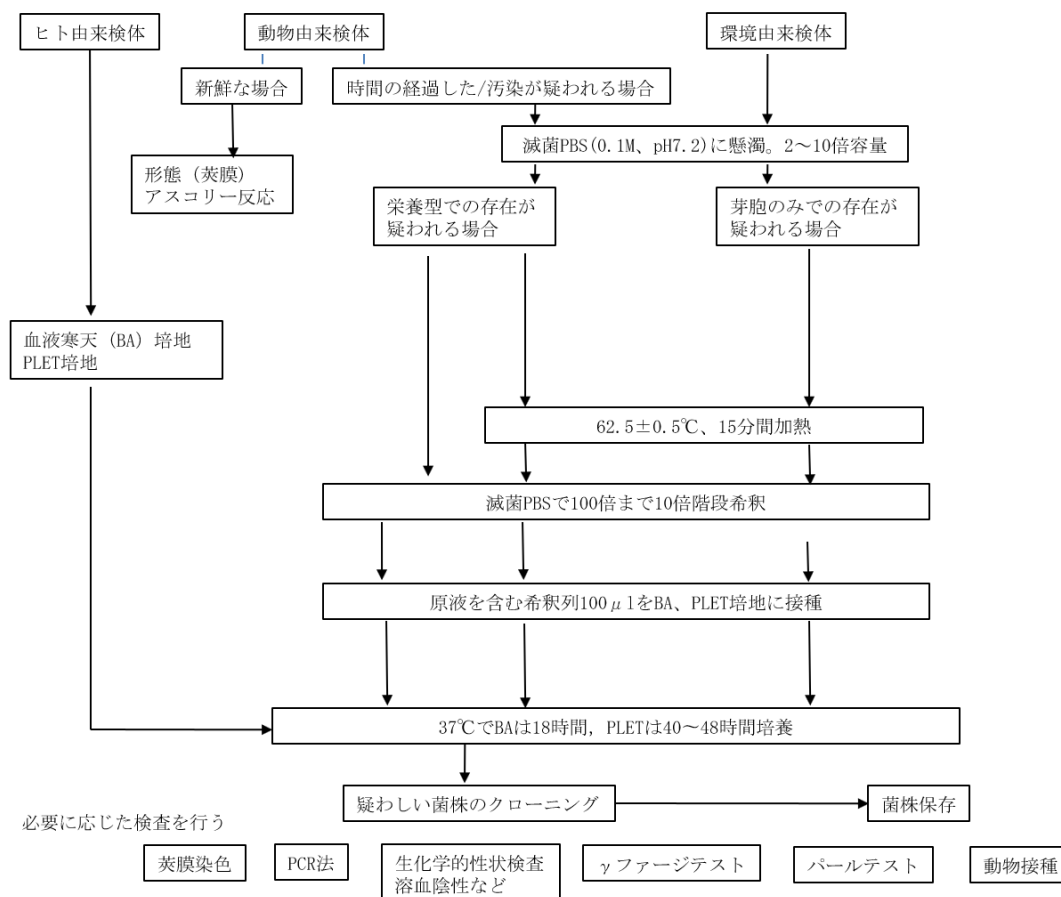
図 1 に示したように血液寒天培地での炭疽菌は、37°C、18 時間培養で非溶血性の周辺が鋸歯状の集落を作る。それに対して、枯草菌(*B.subtilis*) は、37°C、18 時間培養で集落の表面は乾燥した凸凹状で、溶血性が認められる。このほか、*B.mycoides* の初代分離では、根足

状 (rhizoid)の集落を作るのですぐ見当がつくが、培地で継代を重ねると炭疽菌と区別し難くなる。また、普通寒天培地での炭疽菌と *B.cereus* の集落はよく似ているが、*B.cereus* は2〜3日経過すると運動性のため拡散する性質が強い。

強毒株は、R型であるが環境の変化によってS型への移行、毒性の低下、莢膜形成能の喪失など種々の変異が認められることがある。炭疽菌分離培養法の手順の概略を図1に示す。本菌の感染が疑われる敗血症を起こした動物由来新鮮材料は、血液寒天や普通寒天培地への直接塗抹で充分分離できる。しかし、動物由来材料でも死後時間が経過したものや土壌等環境材料では、他の菌が混入している可能性があるため、検体を加熱して芽胞のみを選択的に培養する方法がとられる。

炭疽菌または本菌に汚染された可能性が強い検体の分離培養に当たっては、安全性の面からBSL3実験室内に設置されたクラスIIBのバイオセーフティキャビネット内で操作する。術者は、ラテックス・ディスポーザブル手袋やガウン等を着用して危険性を軽減する。

炭疽菌の分離・同定手順フローチャートを示す。



B.anthraxis, 37°C 18 時間培養



B.subtilis, 37°C 18 時間培養

図 1. *B.anthraxis* 及び *B.subtilis* の血液寒天培地での集落

3. 1 分離培養用培地

炭疽菌分離用培地は、普通寒天培地のほか下記に示したような培地を用いる。その培地の組成を以下に示す。なおセレウス菌の選択分離培地として NGKG 寒天培地(日水)、PBCW 寒天培地(栄研)、MYP 寒天培地(BD)などがあるが、これらはどれか一種類を用いればよい。

1)血液寒天(BA)培地 市販の培地を用いても良い。

ハートインフュージョン寒天 40 g (ブロスを用いた場合は Bact agar を 1.5%の割合で
添加する)

蒸留水 950ml

121°C, 15 分間高圧蒸気滅菌後、50°Cまで冷却

綿羊脱線維素血液 50 ml

十分攪拌し滅菌シャーレに分注し固める。

2) Polymyxin-lysozyme-EDTA-thallos acetate (PLET) agar [文献 1] 市販の培地を用いても良い。

炭疽菌の選択培地である。炭疽菌では、24 時間以内に発育する。

BA、PLET 培地は、雑菌混入の多いと考えられる検体からの炭疽菌の分離に適する。

ハート・インフュージョン寒天 40 g

蒸留水 1,000ml

pH7.4

121°C, 15 分間高圧蒸気滅菌後、50°Cまで冷却後に下記を添加する。

ポリミキシン B 30,000 IU

EDTA,0.01%水溶液 3ml

酢酸タリウム 40mg

リゾチーム 40mg

十分に攪拌し、滅菌シャーレに分注し固める。

3) 運動性試験用半流動培地

ハートインフュージョン・ブロス 2.5g

Bact agar 0.3g

蒸留水 100ml

2ml ずつ分注後、121°C, 15 分間高圧蒸気滅菌後、冷やし固める。

B.anthraxis が疑われる集落の微量を高層に固めた運動性試験用半流動培地の上部から
1cm 位の深さまで接種し、20~25°C及び 37°C、48 時間培養し運動性の有無を観察する。

B.cereus は運動性が陽性で、*B.anthraxis* は陰性である。

4) 芽胞形成促進用培地(土壌浸出液)

土浸出液 1000ml

牛肉エキス(Beef Extract) 3g

ペプトン 5g

寒天 15g

pH7.0

下記のようにして作った土浸出液に各成分を加熱して溶かし、pH を調整して試験管に分注して、121°C15 分間滅菌後、斜面に固める。

土浸出液の作り方[文献 2]

畑その他の場所の有機物を多量に含む土を空気中で良く乾燥させ、ふるい(No.9 目の開き 2.00mm)で漉す。その 500~1000g に水 2400ml を加え、良く混和した後、121°Cで 1 時間加熱浸出する。液は濾紙で濾過する。もし透明な浸出液が得られないときは、その 1000ml に対し、タルク 30~40g を加えてよく振り、再び濾紙で濾過する。

注：タルクとは滑石という鉱石を微粉碎した無機粉末のこと。化学名は「含水珪酸マグネシウム($Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$)」。硬度が低く耐熱性にすぐれ化学的に安定し配合充填材（フィラー）として使われる。

3. 2 ガンマ(γ)ファージテスト

- 1) 培養菌、臓器乳剤、血液等を普通あるいは血液寒天培地に接種し、直径 3~4cm に広げる。この時、陽性対照として炭疽菌弱毒株、枯草菌など陰性対照を必ずおく。
- 2) γ ファージ液を中央部に 1 滴接種して 37°Cで培養する。
- 3) 3~4 時間培養すると γ ファージ滴下部が溶菌して透明化してくる。
- 4) γ ファージ液については下記まで相談のこと。

国立感染症研究所 獣医科学部

TEL : 03-5285-1111



図 3. ファージテスト 左：炭疽菌 34F2 株、右：*B.cereus*

【注意点】

本テストは新鮮分離株でないといけない。

3. 3 パールテスト

- 1) 最終濃度 0.5 IU/ml、0.05 IU/ml になるようにペニシリンを添加した普通寒天培地を作製する。本培地は、高圧蒸気滅菌した 9ml の普通寒天培地を 2 組用意し、それぞれに濾過滅菌した 5.0 IU/ml、0.5 IU/ml のペニシリンをそれぞれ 1ml 添加し、静かによく攪拌し

滅菌シャーレに分注し固めて作製する。この時、泡を立てないように注意する。なお、対照はペニシリン非添加の普通寒天培地とする。この時作製する各培地は、あまり厚すぎると観察し難いのみならず、鏡検の時フォーカスが合わなくなるので注意する。

- 2) 各寒天培地をカバーグラス大に切り、図2のように滅菌スライドグラスに載せる。
- 3) 被検菌を各寒天培地表面に塗抹し、滅菌カバーグラスを無菌的にかける。
- 4) 菌を接種した寒天培地が乾燥しないように図に示したように脱脂綿に蒸留水等を浸したものをあらかじめ滅菌しておきシャーレの中央に入れる。これを 37°Cで 2~4 時間培養する。脱脂綿は、スライドグラスへ触れないようにすること。

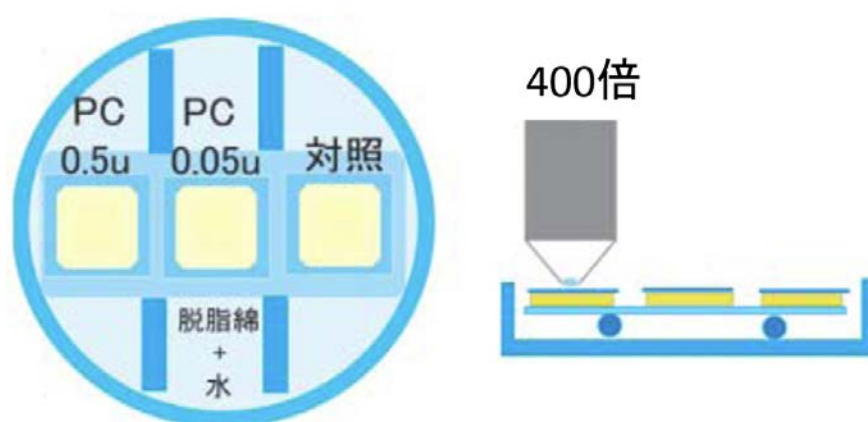


図2. パールテストの模式図

- 5) 培養後、400 倍程度で鏡検し、ペニシリンを含む培地で菌が真珠状の膨満した菌、含まない培地で桿菌になっているかを確認する。このテストは、ペニシリンによって菌の細胞壁が脆弱化し、プロトプラスト化と呼ばれる菌体が膨化する現象を応用したものである。

【注意点】

- 1) 菌がプロトプラスト化し、真珠の珠状になると浸透圧で極めて短時間に破裂する。したがって、30 分間隔で観察するのが望ましい。
- 2) 本試験を行う際には、必ず陽性対照として炭疽菌弱毒株、陰性対照として *B.subtilis* または *B.cereus* を必ずおく。まれにパールテスト陽性の *B.cereus* があるので、陰性対照とする *B.cereus* は、あらかじめ陰性であることを確かめておくこと。
- 3) ペニシリン耐性の炭疽菌はパールテスト陰性となる。このような株もまれに認められる。
- 4) 敗血症を起こした動物の血液を直接接種する場合は、赤血球を誤認する可能性があるので 1~2 倍量の滅菌蒸留水を加えて溶血させる。

3. 4 形態及び生化学的性状

B.anthraxis、*B.cereus*、*B.megaterium*、*B.subtilis* の主な形態ならびに生化学的性状を表 1 に示した。*B.anthraxis* は、普通寒天や普通ブロスで好氣的条件下でよく発育し、37°C、18 時間位の培養により、やや乾燥、隆起した周縁部がカール状になった Rough 型の大きな集落を生じる。普通ブロスでは、上清が透明で長糸状の沈殿ができて試験管の内壁に厚いリング状の菌苔が付着してくる。運動性用半流動培地では運動性は認められないが、ゼラチン培地に穿刺培養すると穿刺部から外側へ向けて樹枝状の発育をする。なお、非運動性菌は *B.mycoides* のかなりの株でも認められるので注意を要する。*B.cereus* と *B.anthraxis* および非運動性の *B.mycoides* と *B.anthraxis* との鑑別はヒツジ血液寒天培地での溶血性、 γ フェージの溶菌性や莢膜の有無等の結果を総合して判定すればほとんど間違うことがない。

前述の形態及び生化学的性状でも不可能な場合はマウスやモルモット等感受性の強い動物に接種する。また、別項で記述されている PCR 法を併用すれば、さらに同定の精度が上がる。

3. 5 動物接種

通常必要ではないが、動物接種により病原性の確認を行う場合がある。

炭疽菌は、*Bacillus spp.*の中で唯一ほとんどの哺乳動物に敗血症や菌血症を起こす菌である。本菌に対する感受性が最も高いのはマウスで、次いでモルモットである。これらに対する LD₅₀ は、芽胞の場合皮下接種で 5 CFU とされている。皮下接種した場合、芽胞はまもなく発芽し、約 2 時間で浮腫病巣が接種部位に形成される。この時すでに莢膜を形成した菌体が病巣部に認められる。菌は更に増殖すると毛細血管の変性、リンパ管の拡張も認められる。

浮腫は、最初に起こった部位から段々外に拡大していくが、菌が存在するのは最初の浮腫層のみで、拡大した浮腫層には存在しない。その後、時間が経過すると菌はリンパ流で局所リンパ節に運ばれ増殖し、血液中に放出され脾臓で捕らえられ脾臓は暗赤色に腫大する。動物が死亡する直前は血液中にも大量の菌が存在する。また、この時期、血液中には浮腫因子と致死因子という外毒素が証明され、さらにこれらの毒素を宿主細胞に運ぶための防御抗原と呼ばれる蛋白も産生される。臓器や汚染材料等の乳剤等については、15g 以下のマウスでは 0.1~0.2ml、モルモットでは 0.5~1.0ml を皮下または腹腔内に接種する。分離菌の場合、マウスに対する致死量は 2~4 logCFU である。

動物接種を行う場合は、次のことに留意する。

- 1) 接種動物が死んだ場合、炭疽菌によるものか否かを確認する。
- 2) 加熱した材料を接種した接種動物が死んだ場合は、*Clostridium sp.*を検査する。
- 3) 接種動物が死んだ場合、そのままにしておくとか共食いし、ケージ内面や床敷を汚染するので直ちに検査するとともに実験に用いたケージは完全に滅菌する。

表 1 *Bacillus anthracis* および近縁 *Bacillus* 属の主な性状

性状	<i>B. cereus</i> group				
	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
桿菌平均長さ (μm)	1.3	1.4	1.4	1.5	0.8
菌の連鎖	+	+	+	+	(-)
運動性	-	+	+	+	+
芽胞の位置	S	S,C	S	S,C	S,C
結晶性封入体	-	-	+	-	-
嫌気での発育	+	+	+	-	-
50°Cでの発育	-	-	-	-	v
65°Cでの発育	-	-	-	-	-
卵黄反応	+	+	+	-	-
カゼイン加水分解	+	+	+	+	+
スターチ加水分解	+	+	+	+	+
アルギニン分解酵素	-	-	+	-	-
ゼラチン加水分解	(+)	+	+	+	+
硝酸還元	+	(+)	+	-	+
酸産生能					
D-アラビノース	-	-	-	-	-
グリセロール	-	+	+	+	+
グリコーゲン	+	+	+	+	+
イヌリン	-	-	-	+	+
マンニトール	-	-	-	+	+
ザリシン	-	+	+	+	+
D-トレハロース	+	+	+	+	+

S: Side, C: Center, (+): 80% positive, (-): 80% negative

出典: Manual of Clinical Microbiology, version 8th edition より

III. 遺伝子診断

炭疽の迅速診断法の一つとして、炭疽菌の毒素遺伝子及び莢膜遺伝子を標的とした PCR 法が普及している。迅速に結果を得るために、検体から直接鋳型 DNA を調製して PCR を行う方法が考案されているが、検出感度や PCR 阻害物質の混在など種々の問題がある。

確実な結果を得るためには検体の増菌培養を同時に行い、増菌後の試料からも鋳型 DNA を調製して PCR を行う必要がある。PCR 法については迅速スクリーニングとして用い、確定は菌の生化学的性状の確認など培養試験によって行う。

1. 遺伝子診断における注意点

PCR を実施するときは、試験の結果に与える影響や環境への汚染防止の観点から、特にクロスコンタミネーションが起らないように注意する。そのためには鋳型 DNA の調製、PCR 反応液の調製、増幅反応及び電気泳動などの各作業を異なった場所で行う。エアロゾルの発生を予防するため、必ず滅菌済のフィルター付チップやねじ口(スクリューキャップ付き)のチューブなどを使用し、試験終了後は使用した器具等を必ずオートクレーブ処理する。

試験には必ず陰性対照(滅菌蒸留水及びセレウス菌由来 DNA)ならびに陽性対照(炭疽菌由来 DNA)を置き、偽陰性及び偽陽性のないことを確認する。また、検出感度や PCR 阻害物質の影響などを考慮すると、増菌培養後の試料から鋳型 DNA を調製する操作も併せて行うことが必要である。

PCR 試験は、脳脊髄液や血清など元来は無菌である臨床検体の場合は陽性結果を確定診断の根拠としてよい。ただし環境検体の場合は迅速スクリーニングの手段であると考えべきである。

最終的な確定診断は、生化学的性状による培養試験などの結果と共に総合的に判定する。培養試験と同様、鋳型 DNA の調製までの操作はレベル 3 の実験室で行われるべきである。炭疽菌の栄養細胞及び芽胞は、鋳型 DNA 調製時の加熱条件で死滅するので、以後の操作についてはレベル 3 の実験室で行う必要はない。参考までに炭疽菌の熱抵抗性を表 2 に示す。

表 2 炭疽菌の熱抵抗性[文献 3]

栄養型細胞

湿熱抵抗性

65°Cでは 5 分生存、5.5 分で死滅

70°Cでは 3.5 分生存、4 分で死滅

75°Cでは 2.5 分生存、3 分で死滅

80°Cでは 50 秒生存、60 秒で死滅

乾熱抵抗性

92~100°C 2 時間以上

芽胞

生理食塩水中の湿熱抵抗性

D value* 90°C 2.5~7.5 分

D value 95°C 1.7~4.2 分

*D value : D 値。対象の菌に固有の耐熱性の指標であり、最初の菌数を 1/10 にする時間を表す。

乾熱抵抗性

ガラス上の芽胞の死滅時間

120°Cで 60 分、160°Cで 9 分、229°Cで 2.5~4 分、288°Cで 1.5~2 分

0.2mm 厚アルミホイル上の芽胞 10⁸ 個の死滅時間

140°Cで 30 分、160°Cで 8 分、180°Cで 2 分

2. 鋳型 DNA の調製

搬入される検体については菌株、白色粉状物(洗剤、デンプン、スキムミルクなど)、食品、組織及び臓器、土壌などが想定される。陽性対照 DNA および陰性対照 DNA は、各 PCR 反応毎に必ず用いること [文献 4]。

2. 1 菌株

試験には新鮮培養の菌株を用いる。増菌培養については、トリプトソイブイオンに株を接種し、37°Cで一晩振とう培養する。培養液を 10 倍希釈し、これをトリプトソイブイオンに接種してさらに 3~4 時間振とう培養する。二次増菌により、芽胞非形成の栄養型細胞を多数得ることができる。培養後、その 100 µl を TE 緩衝液 900 µl に接種し、加熱処理(100°C、10~15 分間、以下加熱処理)する。これを冷却し、その遠心上清 1 µl を鋳型 DNA として用いる。寒天培養については、菌株を選択培地(下記参照)に画線塗抹し、37°Cで 24 時間培養

する。炭疽菌を疑う集落を少量の滅菌蒸留水に懸濁し、増菌培養と同様に加熱処理して鋳型 DNA を調製する。

セレウス菌選択培地を用いる場合は、NGKG 培地、PBCW 培地および MYP 培地等のうちいずれか一つを用いればよい。

2. 2 粉状物

粉状物に 2~10 倍容の滅菌リン酸緩衝食塩水(PBS; 0.1 M, pH 7.2)を加えてよく混和し、これを遠心する。上清を捨て、沈渣に少量の TE 緩衝液を加えて加熱処理し、冷却後、遠心する。その上清を鋳型 DNA として用いる。

増菌培養する場合は、検体を 10 倍容のトリプトソイブイオン (Polymyxin B sulfate を 100 units/ml に添加;TSBP)に接種し、37°Cで一夜振とう培養する。二次増菌後、その 100µl を 900µl の TE 緩衝液に接種し、加熱処理する。これを冷却し、その遠心上清を鋳型 DNA として用いる。

2. 3 食品、組織及び臓器

検体を鉗などで細切し、これに 5 倍容の抽出液(注)を加えてよく混和し、55°Cで 1 時間反応させる。この間、緩やかに混和操作を数回繰り返す。反応終了後、フェノール・クロロホルム溶液を等量加えて処理し、これを遠心(12,000rpm, 5 分間)する。上清をマイクロチューブにとり、これに 1/10 量の酢酸ナトリウム(3 M, pH 4.0)を加え、次いでイソプロピルアルコールを加えて(抽出液と等量)よく混和した後、遠心する。上清を捨て、沈渣に 500µl の 70%エタノールを加えてよく混和し、再度遠心する。上清を捨て、沈渣を乾燥させ、これに 50µl の滅菌蒸留水を加えて鋳型 DNA とする。

また、検体を細切後、10 倍容の TSBP に接種し、37°Cで一夜振とう培養を行ってから鋳型 DNA を調製する。

注) 抽出液の組成

TE 緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.8)

NaCl(100mM)

Proteinase K(200mg/ml)

SDS(終末濃度 1%)

土壌から炭疽菌を検出・分離することは、菌数が多い場合を除き極めて困難で、その検出法はまだ確立されていない。

3. PCR WHO 推奨プライマーを用いる [文献 5]。

3. 1 プライマーオリゴヌクレオチド

炭疽菌遺伝子の増幅に用いられる WHO PCR プライマー

プライマー名	標的遺伝子	増幅塩基配列(5'-3')	サイズ
CAP1234	莢膜遺伝子	CTGAGCCATTAATCGATATG	846 bp
CAP1301		TCCCACTTACGTAATCTGAG	
PA5	毒素遺伝子	TCCTAACACTAACGAAGTCG	596 bp
PA8		GAGGTAGAAGGATATACGGT	

3. 2 PCR 反応液

PCR 反応液の組成 例

滅菌蒸留水	37μl
10 x 緩衝液(TaKaRa Ex Taq に付属)	5.0μl
dNTPs (2.5 mM each)	4.0μl
sense primer (10 pM)	1.0μl
anti-sense primer (10 pM)	1.0μl
TaKaRa ExTaq DNA Polymerase (2.5 unit / μl)	1.0μl
template	1.0μl
	total 50.0μl

3. 3 反応条件

(a) 熱変性 : 95°C 5 分

(b) 熱変性 : 95°C、30 秒、アニーリング : 55°C、30 秒、伸長 72°C、30 秒。

以上を 30 サイクル。

(c) 伸長 : 72°C 5 分

アニーリング温度は 50°C および 52°C でも反応を行い、増幅の有無を確認する方が良い。

3. 4 電気泳動、核酸染色、バンドの確認、塩基配列の確認

増幅反応終了後、常法に従って反応液をアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行う。次いでゲルを適宜染色し、観察する。予想されたサイズの増幅断片が確認できたら、これを撮影して保存する。

なお、細菌遺伝子検出用プライマーとしてキットが市販されている(TaKaRa 炭疽菌 PCR Detection Kit 宝酒造(株))。

陽性サイズの PCR 増幅産物は、塩基配列を解読して炭疽菌由来の遺伝子であることを確認することが望ましい。

IV. 汚染の除去と消毒[文献 5]

1. 汚染の除去、消毒および滅菌

炭疽菌芽胞により汚染した身体、器物および環境から芽胞の飛散を最小限に抑える一方、以下に掲げるいずれかの消毒薬または滅菌法を用いることが奨められる。どの方法を用いるかは、対象物の性質(生物材料、器物、建造物の一部、土壌、水など)や、処理後の用途(廃棄、再使用など)によって異なる。汚染物の取り扱いにはガウン等を着用する。

汚染した可能性のある衣服(靴、ソックス、ストッキング、および袖や襟が汚染した場合には上着)はできるだけ早く脱衣して缶かバッグに入れ、消毒やオートクレーブ処理を行う。使い捨てガウンは焼却しても良い。最終消毒終了後、室内あるいは動物舎のような閉鎖空間は十分に換気を行い、消毒剤が人体に悪影響を及ぼさないように注意してから再使用する。

- ・ 10%ホルムアルデヒド(30%ホルマリン) 1~1.5L/m²、2 時間、10°C以上
- ・ 4%グルタルアルデヒド(pH8.0-8.5) 1~1.5 L/m²、2 時間、10°C以上
- ・ 3%過酸化水素水 0.5 L/m²、2 時間
- ・ 1%過酢酸 0.5 L/m²、2 時間
- ・ 焼却
- ・ オートクレーブ処理 121°C 20-30 分
- ・ エチレンオキサイドガス滅菌

なお、芽胞を効果的に消毒するのはきわめて困難であり、状況によってはこれを完全に実施するのは不可能な場合がある。また、消毒作業の効果を推定することはできないので、確認する場合はスワブを採取して培養によって確かめる。

2. 検査室における消毒

病院用の殺芽胞剤過酢酸製剤(アセサイド 6% 消毒液(原液) : 0.3% w/v 実用液で使用)または 0.5%次亜塩素酸溶液(家庭用漂白剤の 10 倍希釈液、有効塩素濃度 5,000 ppm)を用いて、消毒を行いながら作業を行う。ベンチコートなどの実験台カバーを用いる。

3. 人体の汚染

検体などが皮膚についた場合、汚染部位を 0.01%次亜塩素酸溶液で拭き取り、水洗後に石鹼を使って十分に洗い落とす。皮膚に損傷がある場合は血液を絞り出してから傷口を十分の水を用いて洗浄する。目に飛散した場合には、目をこすらず、直ちに大量の水で十分に洗い出す。口腔内の汚染は直ちに口の中のものを吐き出し 0.01%次亜塩素酸溶液で口腔内を十分にすすぎ、次いで何回か水で口腔内をすすぐ。人体の汚染が考えられた場合には直ちに医師による診察を受け、最低 1 週間は観察下に置く。

4. 建物等の汚染

床等の上に滴下したり飛散したものには直接、または汚染区域を吸湿性物質で覆ってから、1%次亜塩素酸溶液(有効塩素濃度 10,000ppm)、10%ホルマリン、4%グルタルアルデヒドまたは1%過酢酸を十分にふりかける。2 時間以上経過してからペーパータオルでふき取り、ペーパータオルは袋に入れて焼却する。

5. 衣服、道具、器物等の汚染

可能な場合には汚染した器物は焼却またはオートクレーブ滅菌を行う。使い捨てにしない器物の場合は、付着している大きなゴミは焼却用袋またはオートクレーブ用袋に入れ高圧蒸気滅菌を行う。器物それ自身は4%ホルムアルデヒド溶液または2%グルタルアルデヒド溶液に一晩(8 時間以上)浸漬する。

6. 水の汚染

汚染水の滅菌・消毒にはオートクレーブ滅菌、ホルムアルデヒドによる滅菌、塩素剤による滅菌、濾過滅菌などが考えられるが、水の溜まり場所、芽胞の推定濃度、処理する水の量、その水が流れて行く先、および処理後の水の使用目的等の状況を判断して、最もよい解決方法を適用する。

また、消毒方法については、と畜検査実施要領(昭和47年5月27日作成 平成16年4月6日改正)の別表 「消毒方法の基準」を最後に添付する。

V. 文献

1. Knisely, R. F. 1966. Selective medium for *Bacillus anthracis*. J Bacteriol 92:784-6.
2. Gordon, R. E., and M. M. Smith. 1953. Rapidly growing, acid fast bacteria. J Bacteriol 66:41-8.
3. National Food Processors Association (N.F.P.A.). 2001. ANTHRAX-What is it and addressing inquiries. <http://www.mda.state.mn.us/animals/diseases/anthrax/anthrax-faq.aspx>
4. Inoue, S., A. Noguchi, K. Tanabayashi, and A. Yamada. 2004. Preparation of a positive control DNA for molecular diagnosis of *Bacillus anthracis*. Jpn J Infect Dis 57:29-32.
5. WHO. 1998. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. <http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/en/>

VI. 連絡先

国立感染症研究所 獣医科学部

奥谷 晶子、井上 智、前田 健

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111 (代表)

FAX 03-5285-1179 (直通)

平成 25 年 3 月改訂 第二版

令和元年 12 月改訂 第三版

別表

消毒方法の基準

消毒目的物	処理室、運搬車	けい留所、生体検査所 通路その他の場所	ふん尿溜、汚水溝と場廃 水、その他	器具器械その他	と体、肉、骨、内 臓、血液皮等	汚物および胃腸内容 物	接触者
一般 消毒 法	次亜塩素酸ソーダ(100～ 200PPM)又は逆性石け ん(2%)両性石けん (0.5%)を散布、浸潤させ 若しくは洗浄し、1時間以 上経過した後に常水で十 分に洗浄すること。	次亜塩素酸ソーダ(100 ～200PPM)逆性石けん (2%)両性石けん(0.5%) 又はクレゾール石けん 水(3%)石炭酸水(3%)ク ロール石灰水(5%)、土 壌の場合はクロール石 灰若しくは苛性ソーダ液 (2～3%)を十分散布す ること。	クロール石灰、消石灰を 用いるときは汚水量の1/ 10以上、クレゾール水又 は石炭酸水を用いるとき は汚水量と同量以上にな るよう投入し攪拌して5時 間以上放置すること。	1時間以上煮沸又は 流通蒸気による消毒 をするか若しくは30分 以上1cm ² /kg以上の 加圧蒸気消毒をする こと。ただしこの方法 による消毒が困難な 場合は逆性石けん (2%)両性石けん (0.5%)次亜塩素酸 ソーダ(100～ 200PPM)クレゾール 水(3%)に十分浸すこ と。	適当な大きさに切 断し、1時間以上 煮沸又は、流通蒸 気消毒するか焼 却炉により焼却す ること。薬物消毒 による場合はクレ ゾール(3%)石炭 酸水(3%)ホルマリ ン水(ホルマリン1: 水34)に浸すこと。	焼却するか、クロール 石灰又は消石灰を用 いるときは汚物量の およそ1/10以上クレ ゾール水又は石炭酸 水を用いるときはおよ そ汚物量の同量以上 投入し攪拌して5時間 以上経過した後他の 場所に埋却すること。	手指は逆性石けん (2%)両性石けん (0.5%)クレゾール石 けん水(3%)石炭酸水 (1%)に十分浸した 後、常水で洗浄するこ と。被服類は1時間以 上煮沸するか又は、 流通蒸気により、消 毒するか、30分以上 の加圧蒸気消毒をす るか、若しくはクレ ゾール水(3%)ホルマ リン水(ホルマリン1: 水34)石炭酸水(3%) 両性石けん(0.5%)に 十分浸すこと。
炭疽 等芽 胞形 成菌 に対 する 消毒 方法	次亜塩素酸ソーダ (5000PPM)又はホルマリ ン水(ホルマリン1:水34) を十分散布、浸潤させ若 しくは洗浄し数日にわた り3回以上反復実施し、 最終回には常水で洗浄 すること。	次亜塩素酸ソーダ (5000PPM)クロール石 灰を十分散布し、数日 にわたり3回以上反復実 施すること。土壌の場合 は表面にクロール石灰 又は消石灰を散布して から深さ20～30cm掘起 しこれを搬出した後、ク ロール石灰又は消石灰 を散布し、新しい土を入 れること。搬出した土は 焼却又は埋却すること。	次亜塩素酸ソーダ、クロー ル石灰を用い遊離塩素が 十分残存するまで投入す ること。	1時間以上煮沸又は 流通蒸気による消毒 をするか、若しくは30 分以上1cm ² /kg以上 の加圧蒸気消毒をす ること。ただし、この 方法による消毒が困 難な場合は、次亜塩 素酸ソーダ(500～ 1000PPM)の水溶液 に十分浸漬するか同 (5000PPM)の水溶 液、ホルマリン水(ホ ルマリン1:水34)で撒 布浸潤若しくは洗浄 すること。	焼却すること。血 液等煮沸困難な ものについては煮 沸消毒を準用す る。	焼却すること。血液等 煮沸困難なものにつ いては煮沸消毒を準 用する。	手、腕等接触部附近 を流水と石けんブラ シを用いて洗浄をくり 返し、その後昇永水 (0.1%)に1分以上浸し て流水で洗うこと。被 服類は1時間以上煮 沸するか又は30分以 上の加圧蒸気による 消毒をすること。安価 な被服類は焼却する こと。
注	前記消毒方法によらない時はこれと同等以上の効果がある場合に限り実施することができる。						