

炭疽菌検査マニュアル

Ver.1

日本臨床微生物学会
(社)日本臨床衛生検査技師会
日本臨床検査医学会

はじめに

現在、米国で発生した炭疽菌事件により国内での種々の体制強化が課題となっています。*Bacillus anthracis*（炭疽菌）は、我が国ではバイオセーフティレベル3に分類されているが、元来は家畜の感染症の原因菌であり、ヒトへの感染は稀であること、臨床経験が殆ど無いことから、病院等の検査室では検出、同定されたことがなく混乱を来たしている現状です。

炭疽は、4類感染症に分類されており、検査材料は一般的にはクラス1レベルの安全キャビネット内で、グラム染色、溶血性、運動性などを行えば推定は可能です。しかし、生物テロの場合は通常では考えにくい感染経路であること、臨床材料以外のものも検査対象となっていること、感染初期には検査材料からの検出が難しいことなどの問題があります。

日本臨床微生物学会では、教育委員会内にワーキンググループを組織し、炭疽菌の検査法を中心としたマニュアルを日本臨床衛生検査技師会および日本臨床検査医学会と作成することに致しました。

本マニュアルは、病院検査室および臨床検査センターにおける「臨床材料を対象とした検査法」を取り上げました。

なお、郵便物や白い粉末などの臨床材料以外のもの、炭疽が疑われる患者の診療・治療については、厚生労働省、日本感染症学会、米国疾病対策センター（CDC）などのガイドライン、広報などをご覧ください。

本邦では、日頃より危機管理が薄く、検査室の体制も例外ではありません。本学会マニュアルにより、最低限の防御設備、グラム染色等の基本的操作、連絡体制の整備などを考えていく参考になれば幸いです。

日本臨床微生物学会
理事長 山口 恵三

（社）日本臨床衛生検査技師会
会長 岩田 進

日本臨床検査医学会
会長 櫻林 郁之介

目 次

1 . バイオハザード対策	1
・ 検査室の基準	
・ 安全キャビネット	
・ 予防衣，マスク，手袋の着用	
2 . 検体採取方法	2
・ 皮膚炭疽	
・ 肺炭疽	
・ 腸炭疽	
・ 髄膜炭疽	
3 . 作業上の注意	2
4 . 直接塗抹（グラム染色）	3
5 . 使用培地と培養方法	3
・ 検査材料別使用培地	
・ 培養条件	
6 . <i>Bacillus anthracis</i> の同定法	3
・ 鑑別を要する菌種	
・ 性状検査法	
血液寒天培地上での集落性状および溶血性，集落のグラム染色による形態，	
莢膜の確認，運動性テスト，-ファージテスト，パールテスト，	
アスコリの熱沈降反応，PCR法	
・ 検査手順	
・ 検査結果の報告	
7 . 薬剤感受性検査	10
・ 試験薬剤	
・ 判定基準	
・ その他	
8 . 菌株の保存	11
9 . 消毒と滅菌	11
10 . 法的な届出	12
・ 4類感染症としての届出	
・ 生物テロのための特例措置	
11 . 各施設内でのマニュアル作成	14
12 . 参考文献	14
・ 書籍文献	
13 . 担当者一覧	18

1. バイオハザード対策

1. 検査室の基準

*Bacillus anthracis*の取り扱いには CDCで“バイオセーフティレベル2”の設備のあるところで扱うよう分類されており、検体の取扱いには以下の注意が必要である。

なお、国立感染症研究所病原体等安全管理規定では、炭疽菌は“バイオセーフティレベル3”に分類されており、取扱いにはP3の施設が必要とされているが、患者の検体の取扱いには検査室の現状を踏まえて“バイオセーフティレベル2”以上の設備のもとに、細心の注意を払って検査を行う。

炭疽菌が我が国ではレベル3取扱い、炭疽を疑う材料の取扱いはクラス Aレベルの安全キャビネット内（P2）相当でも可能という文部科学省の病原体取扱い安全指針の解釈です。

- 1) 作業は安全キャビネット（クラス A以上）内で行う。
- 2) 検査に際しては、予防衣、手袋、マスク（N95マスクが望ましい）、キャップを着用する。
- 3) 空気感染によるヒト-ヒト感染は起こりにくいいため患者の個室管理は必要ない。しかし、病巣に接触した場合は皮膚から感染する可能性があるため注意する。（病巣に接触した場合は直ちに石鹸と流水にて洗浄する。）
- 4) 使用（汚染）した器具はオートクレーブで滅菌する。滅菌するまでは消毒薬に浸しておく。あるいは、使用（汚染）した再利用しない用具類は、高圧蒸気滅菌用耐熱性袋に入れ可及的速やかに滅菌処分する。

2. 安全キャビネットについて

1) 安全キャビネットの構造概説

安全キャビネットは、作業区域内が陰圧であること、および前面開口部のエアーカーテンにより作業者の感染や環境汚染の危険度は低い。安全キャビネットの排気はHEPAフィルターを通じて外部へ排気される（室内廃棄型、排気ダクト接続型がある）。

2) 安全キャビネットとクリーンベンチとの相違

クリーンベンチは、作業区域が陽圧となっており、作業区域内の気流は外部へ放出される。このため、作業区域の清浄度は保たれるが作業者の感染防止はできない。むしろ作業区域内の病原菌などが作業者へ向かって排出されるため、感染防止には役立たない。

3) 効果的な使用法

- a) 作業開始前に最低5分間はファンを回しておく。
- b) キャビネット内に物を置きすぎない。
- c) 空気取入口、排気口の上には何も置かない。
- d) バーナーを使用する場合は気流の乱れを最小限に抑えるため、パイロット付バーナーを使用する。
- e) 作業終了後、2～3分間ファンを作動したままにしておき作業域の空气中に存在する汚染物を除去する。
- f) 殺菌灯を点灯する。

4) 保守管理

安全キャビネットの性能を維持するには、適切な時期に、適切な方法で検査を実施することが必要である。検査項目は密閉度試験、HEPAフィルターの透過率試験、気流バランス試験等がある。日常検査では頻繁に気流のチェックをすることが大切である（細切りティッシュペーパーを用い、前面開口部から中方向へティッシュペーパーが靡くことを確認する）。

3. 予防衣、マスク、手袋、キャップの着用

1) 予防衣

実験室内では感染防止のため着用し、実験室から出るときは実験室内で脱いでおく。

2) マスク

安全キャビネットを使用しないで作業を行う場合はマスク（N95マスクが望ましい）や必要に応じてゴーグル等を着用する。安全キャビネットで作業する場合もマスクを着用する事が望ましい。

3) 手袋

作業するときは手が検査材料や汚染表面・機器に触れなうよう着用する。なお、予防衣の袖口も手袋で覆い皮膚が出ないようにする。

4) キャップ

髪の毛（特に長髪）はエアロゾルや病原微生物の飛沫が付着し、他へ運ぶ危険がある。作業者および環境の感染防止のために着用することが望ましい。着用する場合は髪をすべてキャップで覆うようにする。

2 . 検体採取方法

1 . 皮膚炭疽：水疱期（破れていない水疱を穿刺し、滅菌綿棒で採取する。）

癩痕期（痂皮を取り除かないようにして痂皮の端の部分から滅菌綿棒を挿し回転させる。）

発熱，全身症状がある場合は血液も採取する。

2 . 肺炭疽：喀痰（一般の喀痰容器に採取する。検出は稀である。）

鼻腔前庭（滅菌綿棒にて左右別々に採取，一過性保菌調査用。）

原則的に血液培養も併用する。

3 . 腸炭疽：糞便，血液培養も併用する。

4 . 髄膜炭疽：髄液，血液培養も併用する。

* 血液培養は通常の培養ボトルを用いて2本採取するが，直接塗抹染色のために抗凝固剤（血算用検体でも可）を加えて採取し，そのまま検査室へ届ることが望ましい。

3 . 作業上の注意

検査にあたっては，手順よく作業を進めるために安全キャビネット内に使用する白金耳（ディスクを用意），ピンセット，スライドグラス，カバーグラス，滅菌スポイト（小容量のもの），あるいは，ピペットとチップなどの器具類，使用する培地類，墨汁（小分けにして用意），使用した白金耳入れ（0.5%次亜塩素酸ナトリウム約 100ml を入れた容器），使用済みスポイト類などを入れる小さなゴミ袋，0.5%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム入り洗浄ピン（ノズル先端を切断し太くしておく。遺伝子検査の時に利用しているものを流用）。キムタオルなどの吸湿性の強いものを手元に用意してから作業を開始する。

検査報告終了後には，培地類は高圧滅菌処理後廃棄する。標本類は 0.5%次亜塩素酸ナトリウム液に一昼夜浸し，高圧滅菌処理後廃棄する。とくに運動性を観察する生標本の取り扱いには注意する。キャビネット内で標本作製後，顕微鏡下に運ぶ時や，観察中，観察後などに標本を落としたり破損したりして飛散させないように細心の注意払い操作する。スライドグラスで手袋，手指を傷つけないよう注意する。

4 . 直接塗抹（グラム染色）

B. anthracis は、グラム陽性、竹の節様の大きな桿菌で、患者検体中では2~4個のレンサがみられることが多い。芽胞の形は卵円型で偏在性、芽胞により菌体が膨隆することはない。

血液や脳脊髄液はそのまま直接塗抹標本をグラム染色し、その後分離培養と増菌培養を実施する。これは、*B. anthracis* による菌血症時の血中菌数が、一般的細菌による菌血症の菌数より大幅に増加する機会が多いからであり、そのため直接塗抹標本の鏡検が優先される。

5 . 使用培地と培養方法

1 . 検査材料別使用培地（使用培地はすべてビニール袋に入れ、密封して保管する）

1) 常用培地（各種材料）

5%ヒツジ血液寒天培地

マッコンキー寒天培地 または BTB 乳糖加寒天培地

増菌培地：HK 半流動，GAM 半流動，チオグリコレート培地など

選択培地：PLET（ポリミキシン リゾチーム EDTA タリウム）寒天培地*

2) 血液

常用培地（炭疽菌による敗血症では血液中の菌数が多い場合があるため）

但し、増菌培地は血液培養ボトルを用いる。

3) 糞便

常用培地

+ PEA（フェニールエチルアルコール）加血液寒天培地**

* 新細菌培地学講座 - 下 - <第二版> 参照

** 常在菌などの混入が多い検査材料にも使用する。

2 . 培養条件

35 ~ 37℃，好気培養，18 時間

但し、約 8 時間でコロニーを形成する場合があるので観察する。

6 . *Bacillus anthracis* の同定法

1 . *B. anthracis* と鑑別を要する菌種

Bacillus 属は Manual of Clinical Microbiology (ASM, 1999) では *B. subtilis* group, *B. cereus* group, *B. circulans* group, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. denitrificans* が記載されている。*B. anthracis* はこれらのうちの *B. cereus* group に属しており、*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* が含まれる。これらの 4 菌種の性状は非常によく似ている。*B. cereus* group に日常検査でしばしば検出される *B. subtilis* を加えた 5 菌種の性状を表 1 に示した。*B. cereus* は食中毒の原因菌であり、また、日和見病原菌としてもしばしば検出される。*B. cereus* と *B. anthracis* とは血液寒天培地での -溶血の有無、周毛性鞭毛の有無などで異なる。*B. thuringiensis* は昆虫の病原菌で、その性状は *B. cereus* と非常に似ているが、2-5 日の培養菌のグラム染色で parasporal crystal が認められる点で異なるとされている。*B. thuringiensis* と *B. anthracis* とは *B. cereus* の鑑別点と同様の点で鑑別される。*B. mycoides* は血液寒天培地で非溶血、鞭毛を欠くことなどでは *B. anthracis* と全く識別できないが、仮根状集落 (Rhizoid colony) を形成すること、および病原性の点で異なるとされ

ている。このように *B. anthracis* は *B. mycoides* との鑑別が困難であるが、田村らの資料（炭疽菌検査法に関する講習会，資料 2）では -ファージテストにより鑑別が可能であり，また，PCR 法（莢膜遺伝子と毒素遺伝子の検出）でも可能であると考られる。

日常検査では *B. anthracis* は *B. cereus* との鑑別が問題となる。これら 2 菌種の鑑別点を表 2 に示した。*B. anthracis* の最も確実な同定は形態学的性状および血液寒天培地の溶血性に加え，PCR 法で莢膜遺伝子および毒素遺伝子が検出されること，又は -ファージテスト陽性が確認できれば *B. anthracis* と決定してよいと考えられる。パールテストも *B. anthracis* の同定に用いられるが，ペニシリン耐性株では陰性と判定されるので注意を要する。

アスコリテストは同定検査というよりは炭疽の診断用テストであり，患者検体より直接検査を行い，陽性の場合には炭疽が強く疑われる。しかし，炭疽の診断には *B. anthracis* の分離が最も確実な診断法である。

2. *B. anthracis* 性状検査の方法

1) 血液寒天培地上での集落性状および溶血性

ヒツジ血液寒天培地で 35～37℃，15～24 時間培養した培地で観察する。*B. anthracis* の集落は 2～5mm，平坦または凸状，辺縁は僅かに波形をした不規則な円形，光沢はなくスリガラス様である。集落の辺縁にコマ状の突起が観察され Medusa head（縮毛状）と表現される。-溶血はない。これに対し *B. cereus* や *B. thuringiensis* は +溶血が見られる。

ヒツジ血液寒天培地の *B. anthracis* は強い粘稠性があり，白金耳で触れると泡立てた卵白のように立ち上がり糸をひく。

集落の周囲に明瞭な -溶血が観察された場合は *B. anthracis* ではない。

2) 集落のグラム染色による形態

B. anthracis はグラム陽性，竹の節様の大きな桿菌で，培養菌は長い連鎖が見られる。芽胞の形は卵円型で偏在性，芽胞により菌体が膨隆することはない。なお，芽胞の観察は芽胞染色を行ってもよいが，グラム染色でも観察可能である。

3) 莢膜の確認

墨汁法，レビーゲル染色が推奨されているが，墨汁法について述べる。

・墨汁法（インディアインク法）

5～10 μl の検体をスライドグラスに滴下し，カバーグラスをかける。5～10 μl のインディアインクをカバーグラスの縁から加える。インクが検体全体に拡散した後，オイルをカバーグラス上に載せ，油浸レンズで鏡検する。莢膜陽性対照菌として *Klebsiella pneumoniae*，陰性菌の対照菌として *Escherichia coli* を用いる。塗抹標本の消毒には次亜塩素酸を用いる。

莢膜は生体内で形成されやすいので，患者検体（血液，培養ビン増菌培地，髄液など）を用いるのがよい。やむを得ず培養菌を用い，莢膜が不明な場合は，次のような莢膜を増強させる方法を行った後に墨汁法を行うと確認できる場合がある。次の 2 法がある。

(1) ウマ脱線維素血液 1～2ml を滅菌小試験管に取り，これに被検菌を接種して 6 時間～1 昼夜培養し，塗抹標本作製して莢膜を確認する。なお，血液は他の動物のものでもよい。

(2) 0.7% 炭酸水素ナトリウム加普通寒天培地に接種し，35～37℃，5～7% 炭酸ガス環境で培養した菌を用いる。

グラム染色性，形状が *B. anthracis* に一致し，厚い明瞭な莢膜が認められれば *B. anthracis* の可能性は極めて強い。しかし，莢膜が認められないからといって *B. anthracis* の否定はできない。

表 1 B. anthracis および鑑別を要する菌種の性状

性状	菌種				
	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. subtilis</i>
菌の長さ (μm)	1.3	1.4	1.3	1.4	0.8
莢膜	+	-	-	-	-
連鎖	+	+	+	+	-
運動性	-	+	-	+	+
芽胞形態	楕円形	楕円形 円筒状	楕円形	楕円形 円筒状	楕円形
芽胞の位置	偏在	中央, 偏在	偏在, 中央	偏在	中央, 偏在
芽胞部位菌体膨隆	なし	なし	なし	なし	なし
Parasporal crystal	-	-	-	+	-
仮根状発育*	-	-	+	-	-
羊血液寒天培地 (-溶血)*	-	+	-**	+	D
-ファージ感受性*	+	-	-	-	-
パールテスト*	+	-	?	?	?
嫌気条件での発育	+	+	+	+	-
卵黄反応	+	+	+	+	-
カゼイン分解	+	+	+	+	+
デンプン分解	+	+	+	+	+
アルギニン分解	-	V(-)	V	+	-
インドール反応	-	-	-	-	-
ゼラチン液化	(+)	+	+	+	+
硝酸塩還元試験	+	(+)	(+)	+	+
炭水化物からの ガス産生	-	-	-	-	-
D-アラビノース	-	-	-	-	-
グリセロール	-	+, V	+	+	+
グリコーゲン	+	+, -	+	+	+
イヌリン	-	-	-	-	(+)
マンニット	-	-	-	-	+
サリシン	-	+, -	(+)	(+)	+
D-トレハロース	+	+	+	+	+

+ : >85%陽性, (+) : 75-84%陽性, V : 26-74%陽性, (-) : 16-25%陽性, - : 0-15%陽性

*田村ら : 炭疽菌の検査法に関する講習会資料 2 より, その他は Manual of Clinical Microbiology, ASM, 1999 より引用. 表中の太字は特に重要な鑑別性状. **Mannal of Clinical Microbiology(1995)では弱い溶血と記載.

表2 B. anthracis とB. cereus の鑑別に役立つ性状

性状	B. anthracis	B. cereus
運動性	-	+
血液寒天培地での溶血性	-	-溶血
莢膜	+ (生体内)	-
-ファージによる溶菌	+	-
パールテスト	+ (ペニシリン感性株)	-
アスコリテスト	+	-
PCR テスト (莢膜および毒素遺伝子)	+	-

4) 運動性テスト

Bacillus 属の多くの菌種は周毛性鞭毛により運動性があるが、*B. anthracis* は鞭毛を欠くことから、重要な鑑別性状のひとつである。生鮮標本による方法と半流動培地を用いる方法とがある。前者の方が確認しやすく、迅速に実施できる。

- (1) 生鮮標本を用いる方法：寒天培地上の新鮮培養菌をブイヨン (Trypticase soy broth など) 0.5~1ml に接種し、35~37℃, 40分~数時間培養する。これを1滴スライドグラスに取り、カバーグラスをかけて400倍または油浸系で鏡検する。
- (2) 半流動培地を用いる方法：SIM培地や Motility test medium が用いられる。被検菌を接種後、35~37℃, 18~24時間培養する。これらの培地で運動性が確認できた場合は「運動性あり」としてよいが、有鞭毛菌でも陰性に判定される場合もあるので注意を要する。この場合は生鮮標本でも確認する。陰性の場合にはさらに培養を続けてみる(7日)。一般に運動性の検査は低温(室温~30℃)の方が確認し易い。

運動性ありと判定された場合には *B. anthracis* 以外としてよい。

5) -ファージテスト

-ファージは特異的に *B. anthracis* を溶菌する。被検菌をブイヨンに培養するかまたは新鮮培養菌をブイヨンに懸濁させて菌液を調製する。これを普通寒天培地に平等に塗布(コンラジ棒などを用いる)し、表面を乾燥させる。これに -ファージ液を1白金耳スポットし、37℃, 数時間から1昼夜培養する。ファージ液をスポットした部分に溶菌が認められ、丸く抜けて見えれば陽性と判定する。ファージ液は独立法人農業技術研究機構動物衛生研究所(TEL:0298-38-7707)から購入できる。

6) パールテスト

B. anthracis はペニシリンに感受性のため、微量のペニシリンに接触すると、菌体が円形化したプロトプラストとなる。これがパールに似ているためこのように呼ばれる。ベンジルペニシリンを0.05単位/mlおよび0.5単位/mlになるようにを添加した普通寒天培地を用意する。これに被検菌を接種し、2~4時間培養後、寒天平板の小片をスライドグラスに取り、カバーグラスをかけて鏡検する。*B. anthracis* であれば菌体が真珠状またはブドウの房状に見える。

また、ペニシリンディスクを用いる簡便法もある。

パールテストは *B. anthracis* の同定に用いられるが、ペニシリン耐性株では陰性に判定されるので注意。

7) アスコリの熱沈降反応

炭疽の迅速診断法のひとつである。患者検体に 3~4 倍量の生理食塩液を加え乳鉢ですりつぶして乳剤とする。これを沸騰水中で 30 分間加熱し、遠心後、上清をミリポアフィルターで濾過したものを抗原とする。抗原と抗炭疽血清を毛細管の中で重層し検査する。数分以内に白濁沈降体が生ずれば陽性と判定する。本法は血液または臓器からの乳剤に適し、土壌からの検査は不適とされている。

8) PCR 法 (炭疽菌検査法に関する講習会資料 1, 阪大微研 森石より抜粋)

実施にあたっては生菌の含まれる可能性のある検体のボルテックスの使用を禁止する、チップはフィルター付きを使用する、コンタミネーションに注意、安全性を重視し新しいフィルターチップを用いる、陰性および陽性コントロールを用いる、検体を入れないサンプルを用い試薬等にコンタミネーションがないことを確認する、などの注意が必要である。

試薬 : TaqDNA polymerase (GIBCO:10342-020)

- 2.5M dNTPmix (Amersham Pharmacia:27-2035-01)

- primer----各自でカスタム合成 DNA をオーダーし, 10pmol/ μ l の濃度に溶解する。

- 10xPCR buffer (Taq DNA polymerase に添付されている)

表 3 プライマーの種類と塩基配列

プライマー	増幅遺伝子	塩基配列	増幅 DNA 長
PA5 PA8	毒素遺伝子	tcctaactaactaacgaagtcg gaggtagaaggatatacggg	596bp
CAP1234 CAP1301	莢膜遺伝子	ctgagccattaatcgatatg tcccacttacgtaatctgag	846bp

方法 : 普通寒天培地の新鮮培養菌 1 白金耳を 500 μ l の滅菌蒸留水に懸濁する。

95 $^{\circ}$ C, 15 分間加熱処理し, 4 $^{\circ}$ C までさます。

12000rpm, 10min 遠心。上清 5 μ l を検体として用いる。

注 . 多数の芽胞が混入している粉末状の検体は 10 倍量の蒸留水で希釈し, 上記 および の操作を行う。

臓器に混入している場合は臓器 0.1mg を細断し, 0.5ml の A 液 { 10mM Tris-HCl (pH7.8), Proteinase K(200mg/ml), 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5%SDS } を加えて, 55 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後, フェノール・クロロホルム処理し, 12000rpm, 10 分間遠心する。その上清に 5.0 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.0) と 1ml のエタノールを加えて-20 $^{\circ}$ C で 20 分間置く。12000rpm, 10 分間遠心し, 80%エタノールで遠心洗浄し, 風乾する。乾いた沈澱を 50 μ l の滅菌蒸留水に溶かす。

反応液 : 全量 50 μ l で行う。詳細は以下のとおりである。

表 4 反応液の組成

添加物	添加量 (μ l)
滅菌蒸留水	31.5
2.5mM each dNTP	4
50mM MgCl ₂ (GIBCO の Tag に添付)	1.5
10pmol/ μ l Sense Primer	1
10pmol/ μ l anti Sense Primer	1
10x PCR buffer (GIBCO の Tag に添付)	5
Taq DNA polymerase (2.5unit/ μ l)	1
処理検体	5
Total	50

3本のコントロールが必要である。

コンタミネーションをさけるため次の順に行う。

1) 処理検体, 2) 検体の代わりに蒸留水のみ, 3) 陰性対照, 4) 陽性対照

*3) の陰性対照としては *B. cereus* (細菌中の非特異的増幅がないことを確認するため)

4) の陽性対照としては *B. anthracis* (手技上, 誤りのないことを確認のため)

増幅の温度設定 : 最初に 92 , 5分を1回行い, 以下のスケジュールを35回繰り返す。

表5 PCRの反応条件

温度	時間
92	0.5分
50	0.5分
74	0.5分

増幅産物の検出 :

10 μ lの溶液を1レーンにかける。1%アガーローズゲルで泳動後, 1 μ g/ml エチジウムプロマイド-TAE溶液で15分間染色し, UV下で判定する。

3. *B. anthracis* の検査手順

図1に *B. anthracis* の検査手順を示した。

4. 検査結果の報告

B. anthracis の検査手順にしたがい結果の報告について述べる。

第1日 : 次の2つの結果が得られる。

「中間報告1」: 検体の塗抹検査で「グラム陽性, 竹の節状の大桿菌」が陽性の場合には推定同定が可能であり, 図1の中間報告1に準じて報告する。

「中間報告2」: 検体から直接PCR法を行い, 莢膜遺伝子および毒素遺伝子が陽性になった場合は図1の中間報告2に準じて報告する。「*B. anthracis* 陽性」と決定する。

但し, PCR法は false positive, false negative の結果が得られる場合があるので, 慎重に対処する。

第2日 : 次の2つの結果が得られる。

「中間報告3」: 分離培地の集落性状とグラム染色所見から *Bacillus* 属を疑う細菌が検出された場合は「中間報告3」に準じて報告する。

「最終報告1」: 分離菌株についてPCR法を行い, 莢膜遺伝子および毒素遺伝子が陽性になった場合は最終報告1に準じて報告する。「*B. anthracis* 陽性」としてよい。

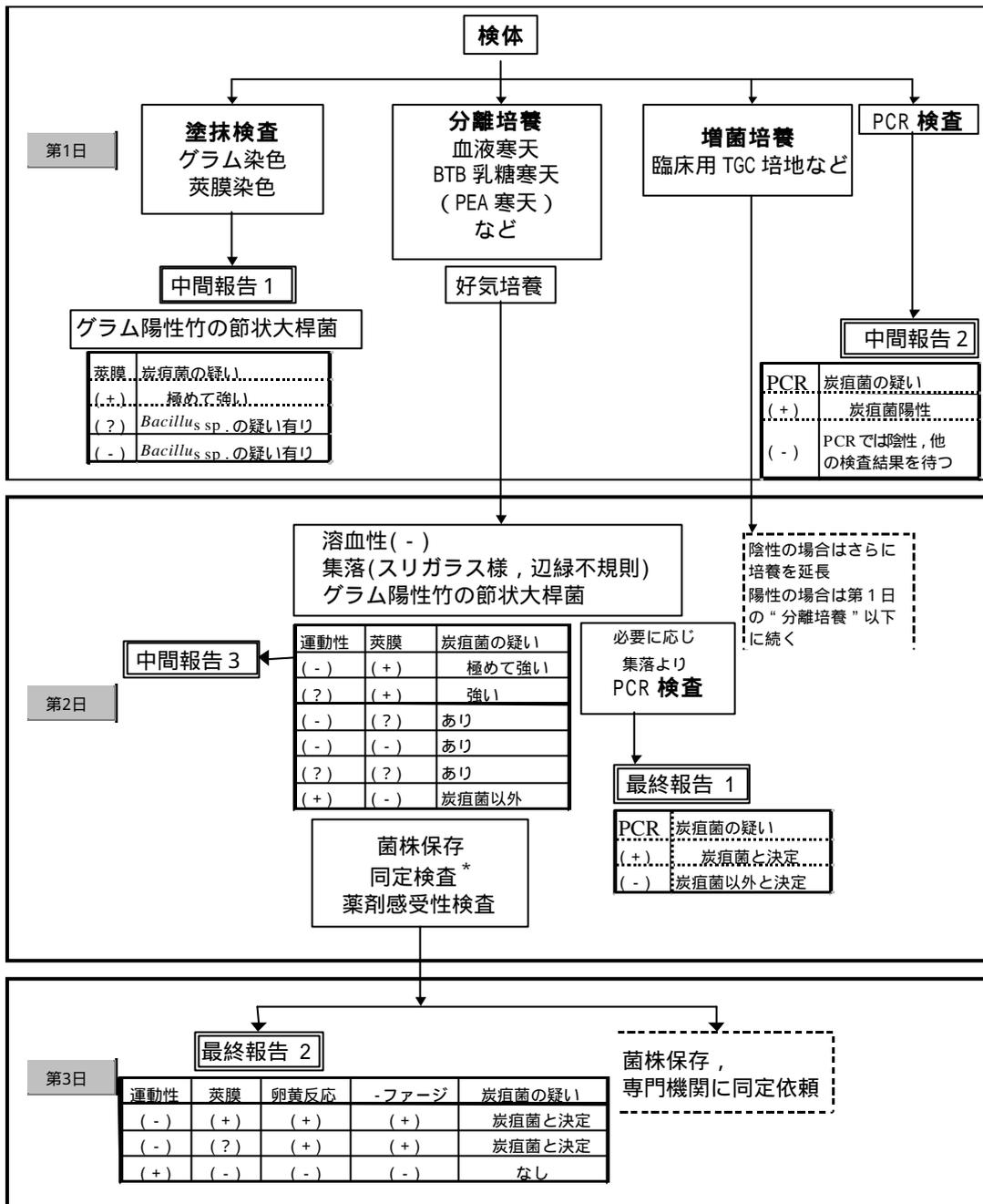
なお, 第1日に検体より直接PCR法を行って陽性の場合には菌株から行う必要はない。

付: *B. anthracis* と確定した菌株およびその疑いのある菌株は他施設(保健所など)への分与を考慮して必要な本数分を菌株輸送培地(ネジ栓付き斜面培地など)に接種しておく。

第3日 :

「最終報告2」: PCR法を実施せず生物学的性状検査で同定した場合は第3日の最終報告2に準じて報告する。

付: 薬剤感受性成績も同時に報告する。菌株輸送用培地はカギ付きのロッカー内など安全な場所に保管する。



担当医に連絡
発育の悪い菌や菌数が少ない場合は、上記よりも成績の報告が遅延することがある。

* 炭疽菌の同定検査： レシチナーゼ反応， フェージテスト， パールテスト， API 50CH

図1 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の検査手順

7. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は *B. anthracis* が疑われた時点で同定検査と同時に実施する。薬剤感受性試験は、ミューラーヒントン培地を用い、NCCLS 法に準拠したディスク拡散法または微量液体希釈法で検査する。現在のところ、実施方法および判定基準がないため、暫定的に米国に準じてブドウ球菌のものを採用する。

1. 試験薬剤

- 1) 必ず実施すべき抗菌薬：CPFX (LVFX)，MINO (DOXY)，PCG，ABPC (AMPC)その他臨床医の要望により実施する。
- 2) 二次的実施すべき抗菌薬：EM, AGs, VCM, IPM, CET, CEZ, CP, CLDM, TC, 広域ペニシリンは *in vitro* での *B. anthracis* に対する効果が知られており、理想的な抗菌薬が不足している場合や、入手不能な場合には使用が考慮される薬剤であり、検査薬剤に加えることができる。
- 3) 不必要な抗菌薬：*B. anthracis* は CXM, CTX, CTRX, CAZ, AZT などに耐性であり、炭疽の治療に用いられない。

2. 試験薬剤と判定基準 (NCCLS ブドウ球菌用)

1) ディスク拡散法

	耐性 (R)	中間 (I)	感性 (S)
ABPC	28	-	29
PCG	28	-	29
CPFX	15	16-20	21
LVFX	13	14-16	17
MINO	14	15-18	19
DOXY	12	13-15	16

mm

2) 微量液体希釈法の MIC のカテゴリー分類

	耐性 (R)	中間 (I)	感性 (S)
ABPC	0.5	-	0.25
PCG	0.25	-	0.12
CPFX	4	2	1
LVFX	8	4	2
MINO	16	8	4
DOXY	16	8	4

μg / ml

3. その他

現在、多くの臨床検査の現場では、自動細菌検査装置により同定と薬剤感受性試験が組み合わせて試験する機能をもつ機器により感受性試験が行われている。2001年11月現在では、これらの自動細菌検査装置による *B. anthracis* の薬剤感受性試験を実施しないことが望ましい。

8 . 菌株の保存

B. anthracis を疑う菌株または決定された菌株は保存しなければならない。
寒天培地の新鮮培養菌を 1ml のブイヨン（Heart infusion broth など）に濃厚に懸濁し、これに滅菌グリセリンを等量混合し、密栓して、-60 以下で凍結保存する。またはマイクロバンクに入れ、凍結保存してもよい。これらの菌株は、万一、災害に遭ったとしても、外部に漏れないように、缶に入れ密栓して保存する。缶内にはガラス容器が破損した場合は液が吸収できるようなもの（綿または紙）で満たしておく。数日間の室温保存の場合は、ネジ栓付き試験管の斜面培地に接種し、先のように缶に入れ、鍵つきのロッカーなどに保管する。

9 . 消毒と滅菌

滅菌とはすべての微生物を完全に殺滅することである。熱または消毒薬などの化学薬品に最も抵抗性の強いのは細菌の芽胞である。その芽胞を完全に不活化可能な方法としての滅菌操作に高圧蒸気滅菌や、線照射、プラズマ滅菌、エチレンオキシドガス滅菌などがある。エチレンオキシドガスによる滅菌は、近年、安全性や滅菌所要時間の点から使用頻度が少なくなってきた傾向がある。

消毒とは、感染の危険がほとんどなくなるまで病原微生物を不活化する処置をいう。消毒は、滅菌と比較して、芽胞の不活化は全く出来ないか例えできても不十分であることを念頭におく。一般に消毒薬は、存在する微生物を完全に不活化するものでなく、タンパク質の存在下で効果が低下することや、効果判定温度は室温で評価されておりそれより低温では効力が薄れる。また消毒薬との接触時間により効果を評価し、効力を発揮するまでに時間がかかることがある。また有効濃度を長時間持続することが困難な消毒薬もあることなどが知られている。

B. anthracis は、芽胞形成菌であるので、検査室内や医療施設内で利用される消毒薬は、次亜塩素酸ナトリウムやグルタルアルデヒドが、滅菌には高圧蒸気滅菌（オートクレーブ）が利用される。

1 . 消毒

検査室内において行われる消毒は、以下のものがある。

1) 塗抹標本作成、培養後の実験台

キムタオルなどに 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムをしみ込ませ、ふき取り後感染性医療廃棄物容器に捨てる。あるいは、検査済み培地などの滅菌処分用容器にいれ一括高圧蒸気滅菌後処分する。次亜塩素酸ナトリウムは、金属を腐食するので残留塩素がなくなるようにさらに水で丁寧にふき取る必要がある。

2) 容器から漏れたり、こぼしたりした場合

静かに汚染箇所を洗浄ピンのノズル先端から 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムを周囲から注ぎ、その上をキムタオルなどで覆っておく。5 分以上 30 分位そのまま置きふき取る。蛋白質の濃度が高いと消毒効果が薄れること、低温では、消毒効果が劣化することを考慮し、冷蔵庫内の汚染などには、処理時間を 1 時間以上おく。

3) 使用済みピンセットなど

安全キャビネット内のバーナーで標本を火災固定する際に簡単にバーナーで炙る。使用した器具類は滅菌するまで消毒液につけておくことされているが、再利用しない用具（スポイト、白金耳類）はゴミ袋に入れておき作業終了時に纏めて高圧滅菌用容器にいれ滅菌後処分する。

4) 手指

作業終了後、着用していた手袋を外し、手袋は滅菌処分用容器に捨てる。手指は丁

寧に流水で洗いとくに消毒は必要としない。誤って検体などが皮膚についた場合は 0.01% 次亜塩素酸ナトリウム液（又は手洗い用ポピドンヨード）でふき取り、水洗後石鹼で十分洗い落とす。

5) 予防衣など

大量の菌体に汚染された時以外通常の洗濯で特別の消毒は必要ないものと思われる。いずれの場合もスタンダードプリコーションであわてず慎重に対処する。

2. 滅菌

高圧蒸気滅菌オートクレーブの保守管理に注意する。現在多くの施設で使用されている高圧蒸気滅菌機は自動化されている。滅菌中に機体内に残留した空気により滅菌不十分となる場合がある。とくに大容量の高圧滅菌袋中に残留空気がみられ内部が滅菌できていないことがある。使用時に脱気可能なように滅菌袋の上部を開放したり、耐熱性の袋の一部で脱気口を塞ぐことがないように注意して滅菌物を入れ滅菌する。使用している高圧蒸気滅菌を評価する方法は、バイオケミカルインジケータとして *Bacillus stearothermophilus* を利用する方法がある。*B. stearothermophilus* の芽胞浮遊液を濾紙に付着乾燥させた物が紙袋に入っている。そのバイオケミカルインジケータを滅菌物の中にいれ、滅菌後取り出し、トリプトソイブイオンに無菌的に投入し 55 にドライバスを設定して 1 週間培養評価する。

微生物検査室の廃棄物の中で 検査済みの検体や検査に使用した培地などが高圧滅菌処理後に排出される。地方自治体や、病院の経営管理者によって異なるが、滅菌廃棄物を産業廃棄物扱いにしている施設と、滅菌後の培地成分を下水に流すことを禁止している施設（下水に流すことにより、高濃度の栄養分で下水の生物汚濁の危険がある）、高圧滅菌により培地容器が変形し、形状が不均一なため培地成分が残存し易くなり、それに環境中の微生物の付着と再増殖が起こり、悪臭が発生するため、感染性医療廃棄物扱いとし焼却処分としている施設もある。

10. 法的な届出

炭疽は 4 類感染症（全数把握）に指定されており、**診断から 7 日以内**に都道府県知事（実際には保健所）へ届けることが義務付けられている。

平成 13 年 10 月 11 日付けの厚生労働省健康局結核感染症課より各都道府県・政令市・特別区に出された事務連絡「国内における生物テロ事件発生を想定した対応について」で、「米国での状況等も踏まえ、**感染者（疑われる感染者を含む）を診察した場合は、直ちに最寄りの保健所に届け出を行っていただく**と同時に国立感染症研究所にご相談 情報提供をお願いします。」となっている。また、11 月 16 日付けで「炭疽菌のおそれのある場合の対応について」を通知している（図 2）。

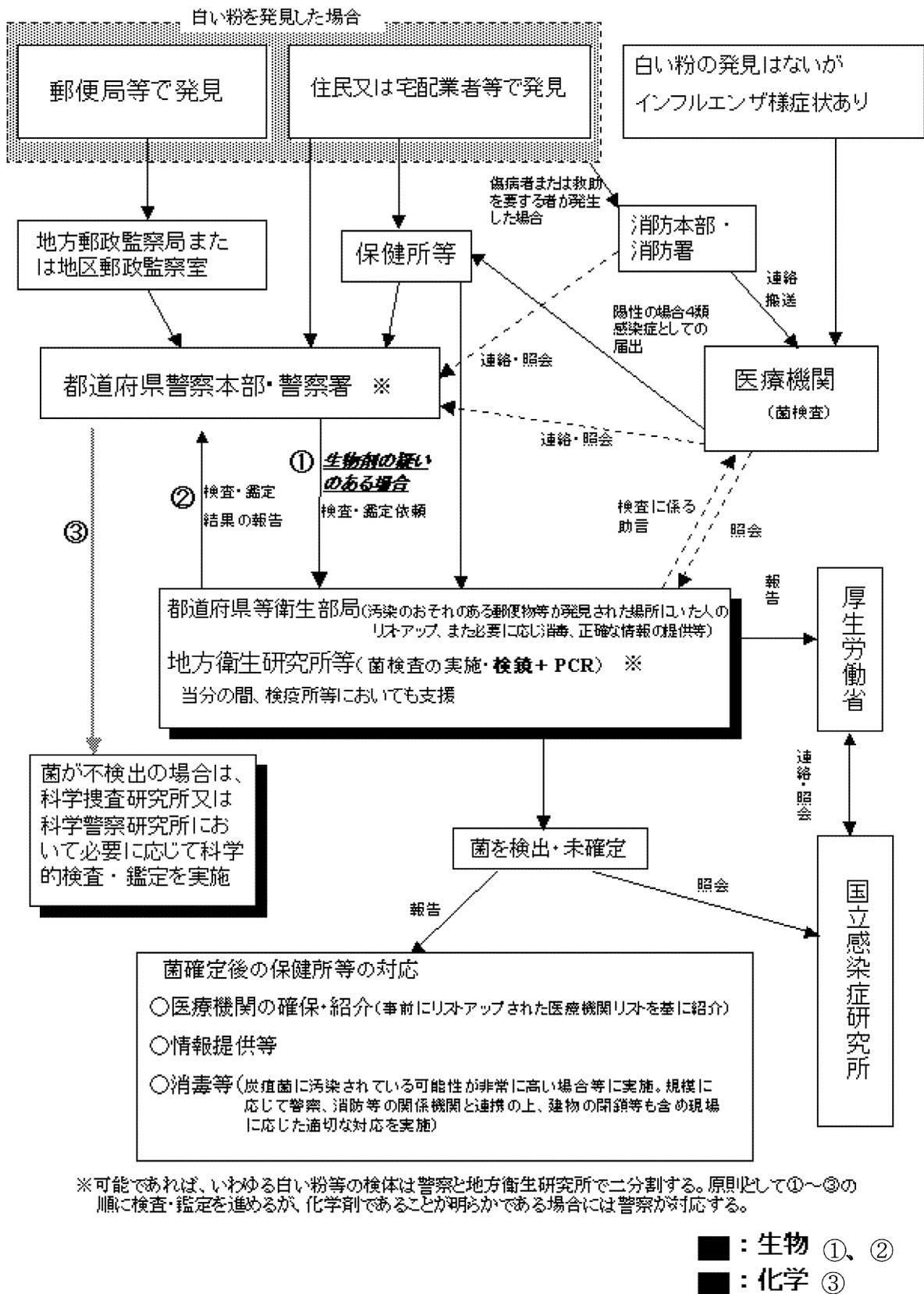


図2 厚生労働省「炭疽菌のおそれのある場合の対応について(別紙8)」より抜粋

11. 各施設内でのマニュアル作成

1) 検体提出

検体は一般細菌検査依頼のラベルを貼り，炭疽菌の検査が必要であることを記し，検体と一緒に提出する。検体は所定の密栓容器（日常用いている微生物検査用のもの）に入れて提出する。血液はカルチャーボトルでよいが，直接塗抹染色のために抗凝固剤（血算用検体で可）でも採取し検査室へ届る。

2) 検体受付，細菌学的検査の実施

検体の直接塗抹鏡検，分離培養
発育コロニーの観察・鏡検
各種生化学試験，キットによる同定
PCR，薬剤感受性試験
検体のグラム染色による塗抹検査は即日報告する。
培養検査，薬剤感受性検査は 3～4 日を要する。

3) 炭疽菌検出時

炭疽菌が検出された場合は，微生物検査室主任から担当医，検査部技師長に連絡する。
また，菌株を保存し保健所の要請に備える。

4) 連絡ルートと菌株分与

検査部技師長は管理課に連絡する。保健所より管理課に菌株分与依頼が来る。管理課から検査部技師長に，さらに微生物検査室主任に菌株分与の件を連絡する。微生物検査室主任は保健所に菌株を分与する。

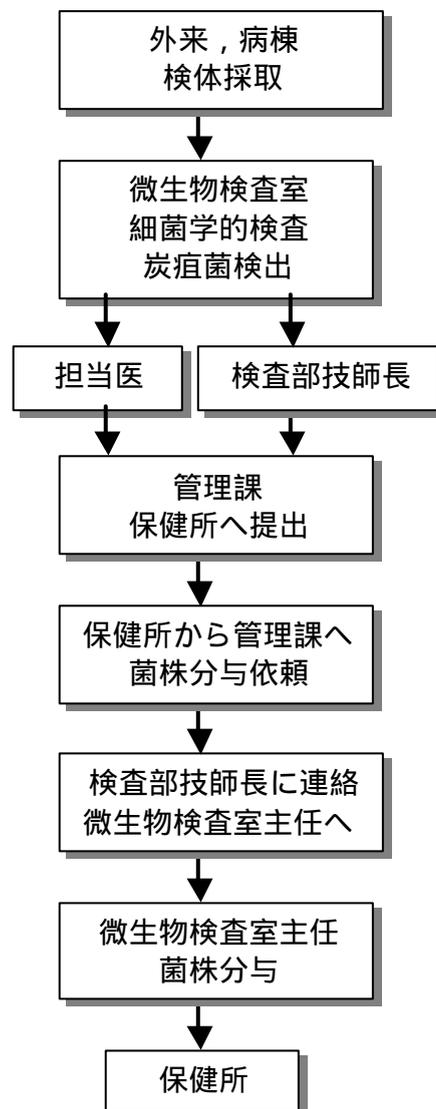


図 3 各施設でのマニュアル作成

12. 参考文献

書籍文献

・ Turnbull PCB, Logan NA. Bacillus and Recently Derived Genera. In: Murray PR, Boron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999:357-369.

・ Sneath PHA: Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2) Williams & Wilkins, Baltimore, 1986: 1104-1141

- ・ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eleventh informational supplement. M100-S11, NCCLS, Wayne, USA, 2001
- ・ Turnbull PCB, Kramer JM. Bacillus. In: Balows A, Haulser WJ, Herrman KL, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991:298-299.
- ・ Edward M. Anthrax. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 3rd ed. Philadelphia, PA; 1992:1053-1056
- ・ Brachman PS. Anthrax. In: Hoepfich PD, Jordan MC, Ronald AR., eds. Infectious Diseases: a treatise of infectious processes. 5th ed. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Company; 1994: 1003-1008
- ・ Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, et al. The Sverdlosk anthrax outbreak of 1979. Science 1994; 22:1202-1208.
- ・ LeForce FM. Anthrax. Clin Infect Dis. 1994; 19:1009-1014.
- ・ Benenson AS, ed. Control of Communicable Diseases Manual. 16th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1995:18-22
- ・ Fleming DO, Richardson JH, Tulis JJ, Vesley D, eds. Laboratory Safety Principles and Practices. 2nd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1995:324.
- ・ Lew D. Bacillus Anthracis (Anthrax). In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995: 1885-1889.
- ・ Friedlander AM. Anthrax. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, eds. Textbook of Military Medicine. Washington, D.C.: Office of the Surgeon General at TMM Publications; 1997:467-478.
- ・ Pile JC, Malone JD, Eitzen EM, Friedlander AM. Anthrax as potential biological warfare agent. Arch Intern Med. 1998; 158:429-434.
- ・ US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases. Medical Management of Biological Casualties. 3rd edition. Fort Detrick, MD.1998.
- ・ Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al. Anthrax: Civilian Medical and Public Health Management following use of a Biological Weapon. JAMA 1999:(in press).
- ・ 小橋 修. 炭疽菌とバシラス属の細菌: (森 良一ほか編) 戸田新細菌学, 第 31 版, 南山堂; 1997:482-486.
- ・ 渡邊一功, 松本孝夫, 白川理恵. 感染症症候群 炭疽: 日本臨牀 (別冊); 1999:42-47.
- ・ 森石恆司: 炭疽菌遺伝子の PCR 法による検出. 炭疽菌の検査法に関する講習会 資料 1, 2001, 11 月, 国立感染症研究所.
- ・ 田村和満他: 炭疽の細菌学的検査手順. 炭疽菌の検査法に関する講習会 資料 2, 2001, 11

月，国立感染症研究所.

・広瀬健二他： *Bacillus anthracis*(炭疽菌)の同定方法．炭疽菌の検査法に関する講習会 資料 3, 2001, 11 月，国立感染症研究所.

13 . 担当者

ワーキンググループ委員

太田 美智男 (名古屋大学医学部)

荒川 宜親 (国立感染症研究所)

村瀬 光春 (愛媛大学医学部)

江崎 孝行 (岐阜大学医学部)

熊坂 一成 (日本大学医学部)

菅野 治重 (千葉大学医学部)

山中 喜代治 (大手前病院)

山口 恵三 (東邦大学医学部)

(執筆担当)

奥住 捷子 (東京大学医学部)

佐藤 智明 (静岡県がんセンター)

西山 宏幸 (駿河台日本大学病院)

小栗 豊子 (順天堂大学医学部)

長沢 光章 (防衛医科大学校)

炭疽菌検査マニュアル Ver.1

平成 13 年 12 月 25 日発行

発行 日本臨床微生物学会
東京都大田区大森西 5-21-16
東邦大学医学部微生物学教室内