

# ボツリヌス症

## 目次

<b>I</b>	<b>ボツリヌスの概説</b>	----	<b>3</b>
1.	感染症法におけるボツリヌス症	----	4
2.	ボツリヌス症の分類	----	5
<b>II</b>	<b>細菌学的検査</b>	----	<b>12</b>
1.	ボツリヌス症の細菌学的検査に関する一般的注意事項	----	12
2.	検体の採取・輸送および保管	----	12
3.	検査手順	----	16
4.	ボツリヌス毒素の検出検査	----	17
5.	ボツリヌス菌の分離・同定検査	----	21
6.	ボツリヌス毒素遺伝子の検出（PCR法）	----	25
<b>III</b>	<b>ボツリヌス症の診断基準</b>	----	<b>28</b>
<b>IV</b>	<b>引用文献</b>	----	<b>32</b>
<b>V</b>	<b>検査相談先および連絡先</b>	----	<b>34</b>
<b>VI</b>	<b>執筆欄一覧</b>	----	<b>35</b>
<<参考情報>>			
	ボツリヌス菌の分布	----	10
	医療機関や臨床検査室でのボツリヌス菌汚染に対する注意	----	12
	検査作業環境のボツリヌス芽胞汚染の除去	----	15
	パウチ法によるボツリヌス菌の分離	----	24
	ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRプライマー	----	26

## I ボツリヌス症の概説

ボツリヌス症 (botulism) は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が産生するボツリヌス神経毒素 [botulinum neurotoxin, (BoNT)] によって起こる神経麻痺性の疾患である。ボツリヌス菌は芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり、生物学的性状と遺伝学的分類で I群から IV群に分けられている。しかし一般的には、菌が産生する毒素の型によって菌を分類、呼称していることも多い。ボツリヌス毒素は抗原性の違いによって A型から G型までの7型が知られている (表1) (Cato, 1986; Hatheway, 1992)。I群菌には A型とタンパク分解性の B型および F型毒素産生菌が属し、II群菌には E型とタンパク非分解性の B型および F型毒素産生菌が、III群菌には C型と D型毒素産生菌、IV群菌には G型毒素産生菌が属している。IV群菌は、タンパク分解性糖非分解性であり、現在は *Clostridium argentinense* と認識されている (Suen, 1988)。また、E型毒素に類似した毒素を産生する *Clostridium butyricum*、F型毒素と類似した毒素を産生する *Clostridium baratii* が知られており、これらもボツリヌス症を起こす原因となる。

表1 ボツリヌス毒素産生菌の分類と生物学的性状

性状/菌名	I	II	III	IV <sup>1</sup>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
産生毒素型	A, B, F	B, E, F	C, D	G	(E)	(F)
タンパク分解性	+	-	-	+	-	-
ゼラチン液化	+	-	+	+	-	-
ブドウ糖分解性	+	+	+	-	+	+
マンノース分解性	-	+	+	-	+	+
白糖分解性	-	+	-	-	+	+
リパーゼ	+	+	+	-	-	-
運動性	+	+	+	+	-	-
トリプシンによる毒素活性化	-	+	-	+		
芽胞耐熱性	120°C 4分	80°C 6分	100°C 15分			
温度/	112°C	80°C	104°C	104°C		
D値	1.23	0.6-1.25	0.1-0.9	0.8-1.12		
発育至適温度	37-39°C	28-31°C	40-42°C	37°C	30-37°C	30-45°C
発育最低温度	10°C	3.3°C	15°C	10°C		
類似菌種	<i>C. sporogenes</i>	あり <sup>2</sup>	<i>C. novyi</i>	<i>C. subterminale</i>		

<sup>1</sup>IV群菌は、*C. argentinense*として独立した (Suen, 1988)。

<sup>2</sup>認められるが、相当する菌種はない。

## 1. 感染症法におけるボツリヌス症

「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」（感染症法）の改正（2003年11月5日施行）によって、ボツリヌス症の分類、届出基準は以下のように一部変更された。すなわち、発生が想定されるすべてのボツリヌス症を四類感染症とし、全数把握対象疾患として取り扱うことになった。報告は下記の分類で行う。

- (1) 食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）：Foodborne botulism
- (2) 乳児ボツリヌス症：Infant botulism
- (3) 創傷ボツリヌス症：Wound botulism
- (4) 成人腸管定着ボツリヌス症：Adult intestinal toxemia botulism
- (5) その他原因不明：(Inhalational botulism / Iatrogenic botulism)

法的な届出義務としては、感染症法が、本症の診断を行った医師に、四類感染症として全数の届出を行うよう義務づけている。また、食品衛生法（第58条）では医師にボツリヌス食中毒患者発生の届出を求めている。さらに、食品衛生法施行令（第36条、第37条）および食品衛生法施行規則（第75条）では、ボツリヌス食中毒発生時に、保健所における調査・報告を義務づけている。

いずれのボツリヌス症もヒトだけではなく動物でも発生する。ヒトのボツリヌス症は、主としてA、BおよびE型の毒素産生菌で起こるが、まれにC型やF型菌による事例も報告される。一方、ニワトリや野鳥ではC型、家畜（ウマ、ウシなど）ではC型およびD型によるボツリヌス症の発生が報告されている。

## 2. ボツリヌス症の分類

### (1) 食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）

食餌性ボツリヌス症は、食品中でボツリヌス菌が増殖し、産生された毒素を経口的に摂取することによって発症する毒素型食中毒である。

1897年、Van Ermengem によって最初の食中毒事例が報告されて以来、米国、カナダ、旧ソビエトなど世界各国での発生事例が報告されるようになった。

食餌性ボツリヌス症の潜伏時間は6時間から8日間程度、多くは 12～24時間である。摂取した毒素の量が発症までの時間に影響する。初期症状で眼症状（複視、弱視、眼瞼下垂、瞳孔散大、対光反射の遅延・消失など）が観察された後、主な臨床症状として脱力感、倦怠感、嚥下困難、発声困難、口の渇き、しわがれ声、腹部膨満、腹痛、便秘、歩行困難、握力低下、尿閉、呼吸失調などを呈する。重症例では、呼吸困難によって死亡することも少なくない。そのほか特異的な症状ではないが、特にB型毒素およびE型毒素による場合は、嘔気、嘔吐、下痢などの胃腸炎症状が神経症状の前に認められることもある。二次感染症を発症しないかぎり発熱は認められない。

日本で最初の報告は、1951年、北海道岩内町で発生したニシンのいずしを原因食品としたE型菌による食中毒事例である。その後全国各地でしばしば発生が確認され、2012年4月までに120事例の報告がある（患者数542名、死者は113名）（表2Aおよび2B）。北海道、東北地方で発生した原因食品は自家製のいずし、あるいはこれに類似した魚類の発酵食品で、原因毒素型はいずれもE型である。その他の地域では、1969年、宮崎県での輸入キャビアによる B型菌による事例、1976年東京都でのA型菌による事例（原因食品不明）、1984年熊本県産の辛子レンコンによって全国14府県で患者36名、死者11名をみた A型菌事例、および同年、栃木県で発生した B型菌事例（原因食品不明）などが主な発生事例である。滋賀県では自家製のハスずしによって1973年、1989年に各1事例ずつの E型菌によるボツリヌス食中毒が発生している。1985年以降は、A型菌による事例が多くなってきており、2012年には鳥取県において、「あずきぱっとう」（原因食品の製造所在地は岩手県）を原因食としたA型菌事例が認められた。さらに、1998年に東京都で発生したイタリア産のグリーンオリーブ（瓶詰）による B型菌を原因とした事例のように、輸入食品の関与にも注目し、輸出国での食品衛生事情にも関心を払っていく必要がある。過去の発生事例についての詳細情報は、“ボツリヌス症の手引き・資料集” p.167-172などにまとめられている。

表2A 都道府県別ボツリヌス食中毒の発症状況 (1951年-2012年5月)

都道府県	事例数	患者数	死者数	毒素型	主な原因食品
北海道	57	316	53	E	いずし類
青森	22	43	10	E	いずし類
秋田	14	63	24	E	いずし類
	1	4	0	A	里芋缶詰
宮城	3	1	0	A	井戸水
岩手	1	9	5	E	いずし類
山形	1	3	3	E	いずし類
福島	5	9	1	E	いずし類
栃木	1	1	0	B	不明
東京	1	2	1	A	不明
	1	18	0	B	オリーブ塩漬
	1	1	0	A	不明
千葉	1	1	0	A	不明
	1	1	0	A	ハヤシライスの具
	1	1	0	不明	不明
滋賀	2	6	2	E	ハスずし
大阪	1	1	0	不明 <sup>2</sup>	不明
	1	1	0	A	不明
岡山	1	1	0	A	不明
広島	1	1	0	A	不明
鳥取	1	2	0	A	あずきばっとう
熊本 <sup>1</sup>	1	36	11	A	辛子レンコン
宮崎	1	21	3	B	キャビア
計	120	542	113		

<sup>1</sup>原因食品の製造施設所在地

<sup>2</sup>臨床診断による診断

表 2B 最近の日本におけるボツリヌス食中毒の発生状況

発生年月日	発生場所	喫食者数	患者数	死者数	原因食品	毒素型	原因施設	摂取場所
1984.6.9	14 都府県	不明	36	11	辛子レンコン	A	製造業者	家庭
1984.10.4	青森県	3	1	0	鰯のいづし	E	家庭	家庭
1984.11.9	足利市	1	1	0	不明	B	家庭	家庭
1984.12.21	釧路市	34	6	0	ハタハタ・鮭のいづし	E	家庭	家庭
1985.11.15	函館市	7	1	1	鰯のいづし	E	家庭	家庭
1988.8.26	備前市	不明	1	0	不明	A	不明	不明
1988.11.4	札幌市	13	3	0	自家製鮭の調味乾燥品	E	家庭	家庭
1989.1.3	釧路市	7	1	0	鰯のいづし	E	家庭	家庭
1989.7.26	滋賀県	4	3	0	ハスずし	E	家庭	家庭
1989.12.31	名寄市	2	2	0	カレイのいづし	E	家庭	家庭
1991.5.30	青森県	9	1	0	ウグイのいづし	E	家庭	家庭
1991.9.2	広島市	不明	1	0	不明	A	不明	不明
1991.9.21	青森県	29	1	0	アユのいづし	E	家庭	家庭
1993.1.1	秋田県	4	4	0	里芋（缶詰）	A	缶詰製造所	家庭
1993.12.28	高槻市	3	1	0	不明	不明 <sup>1</sup>	不明	不明
1995.6.25	青森県	5	1	0	コハダのいづし	E	家庭	家庭
1995.10.10	青森県	4	3	0	ウグイのいづし	E	家庭	家庭
1995.10.22	北海道	8	6	0	鮭のいづし	E	家庭	家庭
1996.2.5	茂原市	不明	1	0	不明	A <sup>2</sup>	不明	不明
1997.1.1	福島県	5	3	0	ハヤのいづし	E	家庭	家庭
1997.2.27	福島県	1	1	0	イワナのいづし	E	家庭	家庭
1998.7.26	東京都	50	18	0	グリーンオリーブ（瓶詰）	B	飲食店	飲食店
1999.7.24	東京都	1	1	0	不明	A	不明	不明
1999.8.14	柏市	1	1	0	ハヤシライスの具（総菜）	A	家庭	家庭
1999.9.1	大阪市	1	1	0	不明	A	不明	不明
2006.9.17	宮城県 <sup>3</sup>	9	1	0	井戸水	A	家庭	家庭
2007.4.17	岩手県	1	1	0	アユのいづし	E	家庭	家庭
2010.12.22	船橋市 <sup>4</sup>	1	1	0	不明	B	不明	不明
2012.3.24	鳥取県	2	2	0	あずきばっとう	A	不詳	家庭

<sup>1</sup> 1993年高槻市事例は臨床診断による。

<sup>2</sup> 1996年茂原市事例では、A型毒素が検出されたが、ボツリヌス菌不検出。

<sup>3</sup> 2006年 宮城県の事例は、表3の乳児ボツリヌス症（宮城、2006年）と同一事例でボツリヌス食中毒として届出も行われた。

<sup>4</sup> 2010年 船橋市の事例は、表3の乳児ボツリヌス症（岡山、2011年）と同一の患者の事例で、発病時期に患者家族が船橋市に帰省していたため、船橋市からもボツリヌス症の発生が食中毒として届出された。

表 3 国内の乳児ボツリヌス症発生状況

発生地域	発生時期	月齢 (日齢)	性別	確認された	患児便		血清中の	ハチミツ		
				毒素型	毒素検出	菌分離	毒素検出	摂取歴	菌分離	
1	千葉	1986年5月	2.5ヶ月(83)	男	A	+	+	-	+	+
2	京都	1987年7月	1ヶ月(40)	女	A	+	+	+	+	-
3	大阪	1987年8月	1.5ヶ月(49)	女	不明	-	-	-	+	-
4	石川	1987年9月	2ヶ月(62)	女	A	+	+	+	+	+
5	大阪	1987年8月	1ヶ月(38)	男	A	-	-	-	+	+
6	京都	1987年9月	3ヶ月(93)	男	不明	不明	不明	不明	+	-
7	愛媛	1987年9月	5ヶ月(146)	男	不明	不明	不明	不明	+	不明
8	愛媛	1987年10月	4.5ヶ月(135)	男	A	+	+	-	+	+
9	神奈川	1987年11月	4.5ヶ月(132)	男	A	-	+	-	+	-
10	岐阜	1987年12月	3ヶ月(99)	男	A	+	+	-	+	+
11	神奈川	1989年2月	4ヶ月(122)	男	A	+	+	+	+	+
12	岡山	1989年10月	1.5ヶ月(54)	男	A	+	+	-	+	+
13	北海道	1990年2月	5.5ヶ月(171)	女	C	+	+	-	不明	不明
14	大阪	1992年9月	2ヶ月(66)	女	A	+	-	-	-	ND <sup>1</sup>
15	石川	1995年3月	6ヶ月(183)	女	B	+	+	-	-	ND
16	東京	1996年4月	3ヶ月(91)	女	A	+	+	+	-	ND
17	広島	1999年3月	7ヶ月(212)	男	A	+	+	-	-	ND
18	東京	2004年12月	9.5ヶ月(296)	男	E	+	+ <sup>2</sup>	-	-	ND
19	愛知	2005年7月	9ヶ月	女	A	+	+	-	-	ND
20	大阪	2005年10月	3ヶ月	女	B	+	+	ND	-	ND
21	大阪	2006年5月	5ヶ月	女	B	+	+	+	-	ND
22	宮城	2006年9月	1.5ヶ月	男	A	+	+	-	-	ND
23	岩手	2007年1月	10ヶ月	男	A	+	+	ND	-	ND
24	茨城	2007年11月	6ヶ月	女	A	+	+	+	-	ND
25	岩手	2008年9月	8ヶ月	男	A	+	+	ND	-	ND
26	福岡	2010年6月	9ヶ月	女	A	+ <sup>3</sup>	+	ND	-	ND
27	岡山	2011年1月	10ヶ月	女	B	+	+	-	-	ND
28	愛媛	2011年1月	11ヶ月	男	B	+	+	-	+ <sup>4</sup>	-
29	愛知	2011年6月	10ヶ月	女	A	+	+	-	-	ND
30	広島	2011年10月	7ヶ月	男	A	+ <sup>5</sup>	+ <sup>5</sup>	ND	-	ND
31	大阪	2011年10月	6ヶ月	男	A	+	+	-	-	-

<sup>1</sup>ND, 検査せず。

<sup>2</sup>E型ボツリヌス毒素産生 *Clostridium butyricum* が分離された。患者は唇の乾燥防止のため唇に蜂蜜をつけていた。しかし、その量はごく少量で、該当するハチミツの検査をしてもボツリヌス菌芽胞は検出できなかったため、ハチミツが原因だった可能性は低いとされた。

<sup>3</sup>糞便検体より分離されたボツリヌス菌において検出された。

<sup>4</sup>2011年 愛媛県の症例では患者がハチミツを少し含む食品を食していた。しかし、その量は少量で、該当するハチミツの検査を行ってもボツリヌス菌芽胞は検出できなかったため、ハチミツが原因だった可能性は低いとされた。

<sup>5</sup>糞便検体から増菌した培養液より検出された。



## (2) 乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、消化管内で菌が増殖し、産生された毒素の作用により発症する。1976年米国での症例が最初の発生報告である。生後2週齢まででは報告例が少なく、母乳（初乳）に含まれる成分がボツリヌス菌の定着・増殖を抑制していると考えられている。また、腸内細菌叢の構成細菌とボツリヌス菌が増殖する条件は関係が深いとされている。発病患児の臨床所見としては便秘状態が数日続き、全身の筋力低下、哺乳力の低下、泣き声が弱くなるなどの症状が見られる。発病時に発熱がみられる症例もある。特徴的な症状として、顔面が無表情となり、頸部筋肉の弛緩により頭部を支えられなくなる症状が見られる。眼瞼下垂、瞳孔散大、対光反射が緩慢になる等、食餌性ボツリヌス症と同様な症状も認められる。患児が死亡することは少ないが、呼吸管理が必要な症例も認められる。通常、乳児ボツリヌス症にはウマ抗毒素を用いた治療は行わないが、最近米国では抗ボツリヌスヒト免疫グロブリン製剤が認可承認を受けている（BabyBig<sup>®</sup>）。患児の回復を早め入院期間を短縮するのに大きな効果があると報告されている。高価であるが、希望すれば医師の手続きによって輸入し日本でも使用することが可能である(<http://www.infantbotulism.org/>)。回復後も患児便からは長期間（1～6ヶ月）ボツリヌス菌が排泄される例が珍しくない。

米国では1976年から2006年までに2,419症例が報告されており、そのうち20症例(0.8%)が入院後死亡したと報告されている(Koepke, 2008)。A型菌による症例が1,079例、B型菌による症例が1,310例と報告された。また、1970年代はハチミツの喫食歴のある症例が39.7%であったが、2000年代では4.7%に減少し、感染源が特定できない症例が多いと報告された(Koepke, 2008)。

日本では、1986年に千葉県で発生したA型菌による事例が最初の報告で、2012年5月現在で、31症例が報告された（表3）。毒素型はA型菌による症例が21例、B型菌による症例が5例、C型菌（Oguma, 1990）とE型産生性*Clostridium butyricum*による症例(Abe, 2008)がそれぞれ1例ずつ、毒素型不明症例が3例である。1980年代に発生した12症例はハチミツ摂取が原因だったと考えられている。1987年10月には、厚生省（当時）から「1歳未満の乳児にはハチミツを与えないように」という指導が出された。その後はハチミツが原因とされた症例の発生は1989年に神奈川県での1例のみで、1990年以降は発生していない。1996年に東京都で発生した症例では、自家製野菜スープが原因食品として推定されている。2006年には宮城県で汚染された井戸水が感染源と推定された症例が報告された。この事例は、食品衛生法に基づく「食中毒」としても届けられている（表2B）。近年の国内症例は、感染源の調査を行っても原因が特定できない事例のほうが多い。日本では乳児ボツリヌス症の死亡例報告はない。

## (3) 創傷ボツリヌス症

創傷部位がボツリヌス菌によって汚染し、菌の増殖によって産生されたボツリヌス毒素によって発生するボツリヌス症である。従って、食餌性ボツリヌス症よりも潜伏期間は長く4日から18日である。また、食餌性ボツリヌス症では認められない発熱が認められることが多い。症例のほとんどは米国で発生しており、日本では報告例がない。創傷

ボツリヌス症は A型菌による事例が多いが、B型菌によっても発生している。1994年以降、米国ではブラックタールヘロインの常用者が不衛生な注射器の使い回しによって、注射部位がボツリヌス菌で汚染され発症する例が増えていると報告されている。

#### (4) 成人腸管定着ボツリヌス症

成人や1歳以上の小児が、乳児ボツリヌス症と同じ機序によって発症するボツリヌス症で、明確な原因食品や創傷ボツリヌス症の証拠がない。ボツリヌス菌や毒素の糞便からの検出が長く続く。消化管に器質的あるいは機能的異常があるか、抗菌薬を使用している場合が多い (Brook, 2006)。

#### (5) その他原因不明

上記 4つの区分に分類できない場合では、生物兵器によるアウトブレイクや医源性のボツリヌス症が、ここに分類される。

ボツリヌス毒素は、バイオテロに使用されうる可能性が高い物質として警戒されている。毒素の空中散布による不特定多数に対する攻撃や、食品等に混入させ社会不安を煽る行為が懸念される。ボツリヌス菌を嫌気条件下に保存、貯蔵する食品に混入させることなども想定される。

近年ボツリヌス毒素製剤 (Botox<sup>®</sup> など) が筋疾患等の治療目的や美容目的で医薬品として利用される機会が増えてきた。このような目的での使用時に、過剰投与などによりボツリヌス症を発症することがある。このような事例を、米国 CDCでは treatment-related botulism (医療処置に関連したボツリヌス症) と分類している。

日本では、2008年の栃木県症例、2011年の広島県症例、2012年の熊本県症例が、原因不明例として届け出られているが、生物兵器や医療行為による発症は疑われていない。

#### <<参考情報 ボツリヌス菌の分布>>

「ボツリヌス菌は、元来土壤中に芽胞の状態で分布する細菌である。自然界におけるボツリヌス菌の分布は、食餌性ボツリヌス症の原因食品への汚染源として深く関わっていると指摘されている。したがって、ボツリヌス食中毒の感染源の究明に際しては、環境のボツリヌス菌調査も重要である。」

##### (1)環境におけるボツリヌス菌の分布

ボツリヌス菌は芽胞の状態で世界中の土壤、河川、湖沼、海水、泥などの自然界に広く分布している。このため、農作物、魚介類、動物の肉などのあらゆる食品の原材料がボツリヌス菌芽胞に汚染される可能性がある。環境から分離される菌の毒素型は地理的に均一ではなく、地域により特徴があり、その地域で発生する症例の菌型と関係が深い。

##### (2)食品とボツリヌス菌

耕地などに分布するボツリヌス菌により家畜を通じて食肉が汚染される可能性があり、野菜や果実への汚染も考えられる。また、河川や海におけるボツリヌス菌は、魚介類を汚染す

る可能性がある。

ボツリヌス菌の食品汚染率は、他の食中毒起因菌の汚染率に比べて極めて低い。わが国では、E型菌汚染の高い北海道、青森、秋田で捕獲された生魚の数%からE型菌が検出されたという報告がある。また、青森県では、淡水魚から A、E、F型菌が、東京都の魚市場に入荷したキスからは E型菌が検出されている。このほか、市販食品では魚肉練り製品から A および E型菌、真空包装食品から B型菌、香辛料から A型菌が検出された例がある。食中毒の原因となった食品では、ドイツ産瓶詰の「キャビア」から B型菌、真空包装食品の「辛子レンコン」から A型菌、イタリア産瓶詰の「グリーンオリーブ」から B型菌、合成樹脂製袋詰めのリトルト類似食品「ハヤシライスソース」から A型菌が検出されている。2012年の食中毒事例では患者宅の喫食残品の真空包装食品「あずきばっとう」よりA型菌が検出された。米国、英国やカナダの調査では、食肉製品から A、B型菌が、魚肉製品からE型菌が証明されている。

乳児ボツリヌス症の原因として注目されたハチミツのボツリヌス菌汚染調査成績によると、三田村らは 6.6%から E型菌を検出している。また、阪口らが実施したボツリヌス菌汚染調査研究班の成績では 512件中 27件 (5.7%)から、A、B、C、E、F の各型のボツリヌス菌が検出されている。

## II 細菌学的検査

### 1. ボツリヌス症の細菌学的検査に関する一般的な注意事項

ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は、感染症法における特定二種病原体等に指定されており、法規制を遵守した適正な取り扱いが求められている。検査などでボツリヌス菌およびボツリヌス毒素を取り扱う機関は、あらかじめ厚生労働省に許可申請を行い、許可書の交付を受けることが必要になる。検査検体の段階では取り扱いに法規制は及ばないが、検体中にボツリヌス菌またはボツリヌス毒素があることが検査で同定された後は法規制の対象となる。ただし、法的規制の対象とはならない「検査検体」であってもボツリヌス症患者由来の試料およびボツリヌス菌汚染が疑われる材料の取り扱いは、ボツリヌス菌やボツリヌス毒素が含まれていることを前提とした取り扱いが必要であり、バイオセーフティーレベル 2 の封じ込め施設内で検査作業を行う。

<<参考情報>> 医療機関や臨床検査室でのボツリヌス菌汚染に対する注意

「乳児ボツリヌス症では、患児の腸管内でボツリヌス菌が増殖し毒素を産生しているため、検体（糞便）を取り扱う際には医療機関や臨床検査室で厳重な感染管理が必要である。特に患児の周辺に離乳前の乳児が入院している場合は、患児の便中のボツリヌス菌が周囲の患者に伝播することのないように対策を講じなければならない。患児の家庭においても排泄便による環境汚染が予想されるため、排泄便の扱いについて指導する必要がある。健常な1歳以上の小児や成人における感染の恐れは極めて低いが、手術後や抗菌薬を使用している症例が周囲にいる場合は注意する必要がある。また、ボツリヌス菌の芽胞は煮沸による加熱やアルコール等による消毒では殺菌効果が得られないことを周知徹底する。」

### 2. 検体の採取・輸送および保管

#### (1) 検査材料の採取

食餌性ボツリヌス症の診断のための検体は、血清および糞便を採取する。また、吐物や胃の洗浄液なども状況に応じて採取する。原因調査のための検体は、喫食した食品残品、関係食品、食品原料などのほか、調理場の下水、排水溝内の泥、食材の採取場所の土壌検体などの採取を行う場合もある。食品について、購入・入手先、調理方法、保存方法などの情報にも入手する。患者が調理者である場合、家族や関係者からも情報収集を行う。食品が市販の製品であれば、状況に応じて、その数ロット分のサンプルを採取する。

乳児ボツリヌス症における検査検体も、糞便および血清を採取する。ただし乳児ボツリヌス症事例の場合、血清からは毒素が検出されないことも多い。原因調査としてはハチミツ摂取の有無を確認し、喫食残品や参考品があれば検査を行う。家族の協力が得られる場合は、患者の生活、居住環境等の聞き取りを行い、可能であれば、食品の残りや、乳児の口に触れた可能性が高い物や場所、さらに、室内の植木鉢や居住区周辺の土などからのサンプリングを行う。ただし、乳児ボツリヌス事例の場合は、環境調査検体からボツリヌス菌が検出され

ても、それが感染源あるいは感染経路なのか、それとも発症後に患者の便から排泄されたボツリヌス菌により汚染されたものなのか、状況から判断することが重要である。

創傷ボツリヌス症では創傷部位の浸出液、組織、その拭い液を採取する。創傷ボツリヌス症の患者が麻薬や覚醒剤の常習者であれば、注射跡の確認を行い、使用した注射器等も検体とする。

ボツリヌス症の診断に必要な検体について、その概要を表に示す（表4）。

表4. ボツリヌス症の診断に必要な検体

検体	食餌性ボツリヌス症	乳児ボツリヌス症	創傷ボツリヌス症	成人腸管定着ボツリヌス症
血清	○	○	○	○
糞便	○	○	-	○
吐物、胃洗浄液	○	-	-	-
喫食残品などの食品	○	○ <sup>1</sup>	-	○
環境材料 <sup>2</sup>	○	○	○	○
創傷部から採取した検体	-	-	○	-
使用注射器など <sup>3</sup>	-	-	○	-

<sup>1</sup>ハチミツ等

<sup>2</sup>哺乳瓶、ハウスダスト、土壌、下水や排水構内の泥等

<sup>3</sup>麻薬常習者の場合等

患者由来検体の採取量はできる限り多い方が望ましいが、以下の量を目安とする。

- ・ 患者血清：10～15 mL相当が望ましく、3 mL以下であると確定的な結果が得られない可能性がある（乳児の場合は 0.5～2 mL 程度の少量でもよい）。また、ボツリヌス抗毒素血清投与前に血清を採取することが重要である。

- ・ 患者糞便：食中毒事例では、25g～50gの検体採取が望ましい。ボツリヌス抗毒素血清投与前に採取する。しかし、これより少量の糞便でも診断は可能な場合もある。乳児ボツリヌス症の場合には 1g 程度の便量があれば十分毒素は検出できる。もし、患者が便秘のため浣腸しなければならない場合には、少量の液体（滅菌水が望ましい）を用いて回収した液を、そのまま毒性試験に供試する。また、患者が薬物治療されていた場合、糞便からの菌の培養や毒性試験が阻害される可能性がある。例えば、筋無力症の患者に経口投与された抗コリンエステラーゼ薬は、糞便抽出液のマウスを用いたボツリヌス毒素試験を阻害することが明らかになっている。

・推定原因食品等の食品：食品の種類にもよるが、可能であれば 100g以上を検体として採取する。

## （２）検査材料の輸送

ボツリヌス毒素やボツリヌス菌が含まれる可能性のある検体の取り扱いには、毒素や芽胞による周囲の汚染に十分な注意を払う必要がある。検体は採取後、乾燥や高温を避けて、冷蔵状態で速やかに検査室に送付する。また、検体には、臨床診断名（症状等）、採取の日時、抗菌薬使用の有無などの情報を添付する。検体輸送の際は、感染症法に基づき適正な梱包を行い輸送する。

## （３）検査検体、同定菌株および毒素の保管

検査に供した検体の残りは冷蔵または凍結して保存する。凍結融解の繰り返しは毒素活性を低下させるので注意を要する。検査が完全に終了した後は、高圧蒸気滅菌処理し廃棄する。

分離同定したボツリヌス菌の保存は凍結乾燥が理想的であるが、 $-80^{\circ}\text{C}$ での凍結保存も可能である。クックドミート培地による培養液の状態でも、室温で0.5～1年は保存できる。空気の遮断と水分の蒸発を防ぐために、流動パラフィンやワセリンを液面に重層する方法もある。可能であれば室温よりも冷暗所に置く方が望ましい。ボツリヌス菌の中には高い嫌気度を要求する菌株もあるので、継代の際には十分な注意が必要である。

ボツリヌス菌の取り扱いのみで、ボツリヌス毒素の取り扱い届けをしていない検査機関では、感染症法でボツリヌス毒素の所持量が 0.1mg（タンパク質量）以下と規定されている。ボツリヌス毒素は、菌の培養液上清に多量に含まれるため、検査終了後は毒素が含まれていると思われる（クックドミート培地のような）液体培地等は速やかに不活化するように徹底する。ボツリヌス菌を保管する場合は、遠心分離で少量の菌体または芽胞を集めるか、寒天平板からコロニーをかき取り、保存液（20%グリセロール溶液や10%スキムミルク）などに懸濁して $-80^{\circ}\text{C}$ に保管し、液体培地の上清は廃棄するようにする。ボツリヌス毒素の取り扱い申請をしている検査機関でも、届け出の上限量を超えないように、適正に毒素の管理を行う（注）。

（注）感染症法で規制しているボツリヌス毒素量は、毒素活性ではなくタンパク質量である。このため、ボツリヌス毒素を含む試料をローリー法などで定量したタンパク質量が毒素量と見なされる。毒素活性が非常に低くても、タンパク質量が多ければ規制の対象となる。

## （４）滅菌、毒素の不活化と廃棄方法

### 1) 検査に使用した器具や廃棄物の処理方法

ボツリヌス毒素は、 $100^{\circ}\text{C}$ 、10分の加熱で失活するが、ボツリヌス菌は芽胞を形成するため、ボツリヌス菌や毒素の付着した検査器具類は、 $121^{\circ}\text{C}$ で 20分間オートクレーブ処理する。これによって芽胞を含めボツリヌス菌および毒素は完全に滅菌あるいは不活化さ

れる。多量の菌液等を滅菌する場合には、使用するオートクレーブの容量、能力に応じた温度、時間の設定を行うべきである。廃棄物はオートクレーブ処理後に、それぞれの機関の規定に従って医療または感染性廃棄物として廃棄する。

## 2) 毒素不活化液

ボツリヌス毒素はアルカリや酸化剤で速やかに失活するので、0.1M 水酸化ナトリウム (NaOH) あるいは、0.5% (5,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)を調製し、毒素の不活化に使用する。

## 3) ボツリヌス毒素で汚染した場合の処置

汚染された場所に、推定される毒素量の少なくとも 15倍量以上の 0.1M水酸化ナトリウムまたは 0.5%(5,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムを注ぎ、ペーパータオル等をかぶせる。約10分後にふき取り、ペーパータオル等は滅菌処理する。さらに汚染表面を NaOHまたは次亜塩素酸ナトリウム液で丁寧に清拭する。

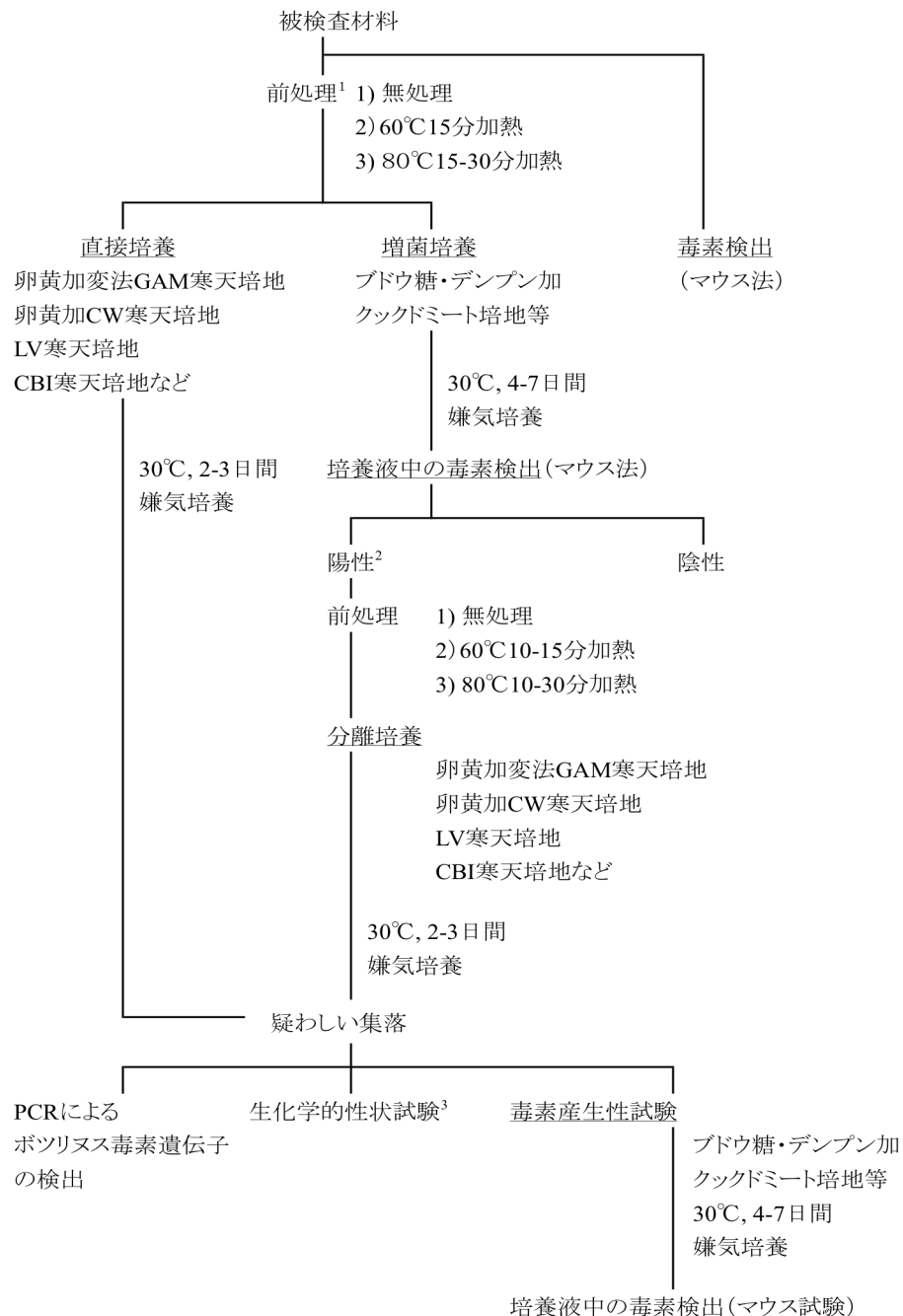
### <<参考情報>> 検査作業環境のボツリヌス芽胞汚染の除去

「ボツリヌス菌の芽胞は *Bacillus* 属の芽胞と比較すると、熱や消毒薬によりやや不活化されやすい。検査時に作業台や安全キャビネット内など平滑な表面に付着した芽胞であれば、0.1% (1,000 ppm)次亜塩素酸消毒液に浸したペーパータオルや布などを数分間付着させることで、除去効果が期待できると報告されている(Oie, 2011)。」

### 3. 検査手順

ボツリヌス症の細菌学的検査としては、検体中のボツリヌス毒素の検出検査、ボツリヌス菌の分離・同定検査に大別される（図1）。

図1 ボツリヌス症の細菌学的検査



<sup>1</sup> 増菌培地に接種してから前処理(加熱)してもよい

<sup>2</sup> ボツリヌス菌陽性と判定

<sup>3</sup> ボツリヌス菌は、毒素産生と毒素型の決定により主に同定され、菌の生化学的性状試験は補助的試験である。



ボツリヌス症の細菌学的診断では、患者由来の検体中においてボツリヌス毒素を検出することが最も重要である。ボツリヌス毒素の検出、確認法として広く使われている検査法は、マウスに対する毒性を見る試験とボツリヌス抗毒素による毒性中和試験であり、数十 pg のボツリヌス毒素を検出できる。臨床的にボツリヌス症が疑われる場合、ボツリヌス毒素の検出検査とともに、通常は培養によるボツリヌス菌の分離を行う。また、PCR法等によるボツリヌス毒素遺伝子の検出も行われる。

#### 4. ボツリヌス毒素の検出検査

現在、ボツリヌス毒素の検出検査は、マウスを使用した検査法が最も一般的である。マウスを使わない *in vitro* の検査法も近年、多数報告されてきているが、感度と特異性を総合的に評価すれば、マウス法よりも信頼性のある一般的な方法はまだない。マウス法では検査開始後、数時間から1日程度で結果が得られる。検査方法は、毒素の存在を検出しようとする検体（患者血清、患者便、原因食品、菌の培養液など）を前処理（懸濁やろ過）した後、マウスの腹腔に接種する。検体中に毒素が存在すれば、マウスにボツリヌス中毒の症状が出現するので、これを観察することによって、数十 pg 程度の毒素の存在が検出できる。

##### (1) 使用する試薬や器具や動物など

###### ・試験用の試薬

ゼラチン希釈液：

リン酸一水素ナトリウム（4 g）を精製水（1,000 mL）に溶解し、塩酸で pH6.2に調整する。この溶液にゼラチン（2 g）を加え、121℃で 15分間滅菌する。必要に応じて、300Uのペニシリンや 0.5mg/mLのストレプトマイシンを添加する。

トリプシン溶液：

検体中の毒素の活性化に使用する（注）。トリプシン（活性1:250）は10%にゼラチン希釈液に溶解し、結晶トリプシンの場合には 0.001N塩酸に 2mg/mLの濃度に溶解して使用する。

（注）I群菌（A、Bおよび F型のタンパク分解菌群）が産生するボツリヌス毒素は、トリプシン等のタンパク分解酵素によって活性化されないが、II群菌（タンパク非分解性 B、Eおよび F型の菌群）の産生した毒素は、タンパク分解酵素処理により毒素活性が著しく上昇する（E型毒素は 500倍以上）。食品や便中の毒素は、混在菌が産生する酵素により毒素が活性化された状態で存在していると考えられるが、念のためにトリプシン処理後に試験を行う。

ピクリン酸溶液：

適当量をエタノールに溶解し（飽和状態）、マウスのマーカールに使用する。マウスの頭、頸、背中、尾、左右前足、左右後足等に標識して識別する。

- ・ 診断用抗毒素血清

ボツリヌス診断用抗毒素血清は、国立感染症研究所細菌第二部から分与可能である。なお、以前市販されていた抗毒素は、A、B、F型の抗毒素血清の1 IU（国際単位）は、約10,000マウス ipLD<sub>50</sub>（腹腔内注射で求める50%致死量）、E型抗毒素血清の1国際単位は約5,000マウス ipLD<sub>50</sub>のボツリヌス毒素を中和する。抗毒素の単位付けについては文献（Hatheway, 1994）を参照。

- ・ 標準精製ボツリヌス毒素

以前は研究用試薬として A～F型毒素の市販品（和光純薬）が入手できたが、現在は販売中止となっている。通常、ボツリヌス症の診断目的の検査では毒素を使用することはない。

- ・ マウス

15～20gのマウス（系統や雌雄は問わない）を使用する。

## (2) 検体の調製

### 1) 血清

患者血液を遠心分離し、血清は希釈せずにそのまま試料原液とする。トリプシン処理は行わない。

### 2) 糞便

検体 10gに等量～数倍量のゼラチン希釈液を加え、ストマッカーや乳鉢等で乳剤化した後、必要量を 3,000 rpmで 20分間遠心し、上清を 0.45μm のメンブランフィルターでろ過する。便懸濁液中の成分によってフィルターが目詰まりすることがあるので、目詰まりした場合はフィルターを取り替えて、何度かろ過操作を繰り返す。トリプシン処理は、1/10容量のトリプシン溶液を加え、37℃で 30分～1時間反応させる。可能な限り、トリプシン処理しない群も用意する。糞便中のボツリヌス毒素以外の成分（他の菌が生産した毒素や毒性物質など）によって、マウスが非特異死を起こすことがあるため、糞便は5～10倍希釈したものを試料原液とする。

### 3) 食品

検体 25～50 g とほぼ等量のゼラチン希釈液（または滅菌生理食塩水）を加え、ストマッカーや乳鉢等で乳剤化する。食品によっては有形の残渣や粘度を生じることがあるので、フィルター付きストマッカー袋を使用すると便利である。フィルター内側から懸濁液を分取し、必要量を3,000 rpmで 20分間遠心し、上清を 0.45μm のメンブランフィルターでろ過して試料原液とする。以下、糞便検体の場合と同様にトリプシン処理群と、必要に応じて無処理群を用意する。フィルター付きストマッカー袋が利用できない場合、可能な限り有形の残渣が混入しないよう注意深く懸濁液を分取する。缶詰や容器包装詰食品等の開缶あるいは開封は、エアロゾルの発生を防止するために、アルコールで表面を消毒した後にプラスチック製袋等の中で行う。

缶詰や容器包装詰食品が膨張している場合、金属製のパンチなどでガス抜きを行った後に、開缶・開封する。これらの操作は安全性に配慮して、安全キャビネットの中で実施する。

#### 4) 菌の培養液

糞便や食品など検査検体の培養液は、攪拌した後、卓上遠心機の最高回転数で 5～10分間遠心し、菌体が完全に沈殿した後、上清を採取する。上清を 0.45 $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過し、ろ過液を試料とする。必要に応じてゼラチン希釈液で 5倍希釈したものを試料原液とする。また、糞便検体と同様にトリプシン処理群、無処理群を用意する。

### (3) マウス試験

ボツリヌス毒素が含まれる検体をマウスに接種すると、マウスには中毒症状が生じる。ボツリヌス中毒の特有な症状は、筋弛緩による腹部の陥没、腹壁の振動、後肢麻痺、呼吸困難などである（写真1）。

写真1 ボツリヌス中毒症状を起こしたマウス



1 マウス ipLD<sub>50</sub>（腹腔注射による半数致死量）の毒素量がマウスに注射されれば、24時間以内に確実にマウスに症状が現れる。数千 マウス ipLD<sub>50</sub> 以上の投与量になると、マウスは数時間で死亡する。毒素量が少ない場合、症状出現の有無の判定には、多少の習熟を要するので、必要があれば検査を習得している者から指導を受ける。

マウス試験には、マウス 2匹以上を1群として、次の5群を準備する（表4）。

**表4 マウス試験における接種方法**

第1群	試料原液をそのまま 0.5mLずつマウス腹腔内に接種する
第2群	試料原液を 100℃、10分間加熱処理し、0.5mLずつをマウス腹腔内に接種する
第3群	試料原料と、A型ボツリヌス抗毒素血清（1-10 IU/mL）を等量に混合し、37℃、15-30分間反応させ、0.5 mLずつをマウス腹腔内に接種する。中和反応の方法としては、あらかじめ抗毒素血清をマウスに接種し、その後、試料原料を注射する方法でもよい。
第4群	操作は第3群と同様で、抗毒素血清にはB型を用いる
第5群	操作は第3群と同様で、抗毒素血清にはE型を用いる

接種後24時間までは、1、2、4、8、12、18時間目など、可能な限り頻繁に観察する。ボツリヌス毒素が陽性の場合、第1群のマウスはほとんどが24時間以内に死亡するが、毒素量が少なければ致死までの時間が延長するため、最終4日目まで観察する。

第1群がボツリヌス毒素による特有の症状（腹壁の振動と陥没、後肢麻痺、呼吸困難）を呈して死亡し、第2群が生存し、かつ第3群から第5群のうちのいずれか1つの群が生存した場合、生存群に使用した血清型に相当する毒素の存在が証明される。5つの群のマウスが全部死亡した場合、ボツリヌス毒素以外の耐熱性毒物の存在が示唆される。

しかし、第1群がボツリヌス毒素による特異的症状を呈して死亡し、第2群が生存したにもかかわらず、他の群のマウスが全部死亡した場合は、試料の毒素量に対して用いた抗毒素血清の力価が不十分か、A、BあるいはE型以外のボツリヌス毒素の存在が示唆される。この場合には、試料原液をさらに希釈して試験するか、他の毒素型（C、DおよびF型）の抗毒素血清による中和試験を試みる（表5の第6群～第8群）。

表5 ボツリヌス毒素検出試験

マウス群	検体量	ゼラチン希釈液、 生理食塩水など	抗毒素血清 (1-10 IU/mL)	そのほかの処理など
1 群	0.7 mL	0.7 mL <sup>1</sup>	-	
2 群	0.7 mL	0.7 mL <sup>1</sup>	-	100°C 10 分加熱処理 <sup>2</sup>
3 群	0.7 mL	-	A 型 0.7 mL	
4 群	0.7 mL	-	B 型 0.7 mL	
5 群	0.7 mL	-	E 型 0.7 mL	
6 群	0.7 mL	-	C 型 0.7 mL	
7 群	0.7 mL	-	D 型 0.7 mL	
8 群	0.7 mL	-	F 型 0.7 mL	

<sup>1</sup>検体量が充分多い場合は、希釈液を加えずに注射してもよい。

<sup>2</sup> 80°C 20 分の処理でもよい。

上記に従って試料を調整し、各群2匹ずつのマウスに0.5 mLずつ腹腔内投与する。

### (3) 毒素量の定量

ボツリヌス毒素が検出された場合には、検査材料 (1g、1mL) 中の毒素量を定量する。この成績は、患者の毒素摂取量、血清や糞便中の毒素量を推定するために有効であり、ヒトの中毒量、致死量を推定するのに貴重な資料となる。

毒素量の定量方法は、試料を段階的に希釈して1段階の濃度につき4匹以上のマウスに腹腔内注射し 1 マウス ipLD<sub>50</sub> となる濃度 (半数のマウスが死亡する濃度) を求める

(Hatheway, 1994)。あるいは静脈内注射後のマウスの死亡時間から毒素量を換算する方法がある。

## 5. ボツリヌス菌の分離・同定検査

### (1) 培地

#### 1) 増菌培地：ブドウ糖・デンプン加クックドミート培地

ブドウ糖 (0.3%) および可溶性デンプン (0.2%) を精製水に加熱溶解し、クックドミート培地 (Difco) 1.5g (12 mLの分量/試験管) を入れた試験管に 12 mLずつ分注し、121°C で 15分間滅菌する。滅菌後直ちに急冷して使用する。増菌培地は、出来る限り使用時に調製するのがよいが、調製後直ちに使用しない場合には、可能であれば嫌気条件下で冷蔵保管する。使用直前に溶存酸素を除去するために、沸騰水中で10分間加熱後、流水中で急冷して使用する。

#### 2) 分離培地：卵黄加変法GAM寒天培地または卵黄加 CW寒天培地

変法GAM寒天 (日水製薬) または CW寒天 (カナマイシン不含、日水製薬、または栄研化学) を精製水に加熱溶解後、滅菌し (変法GAM 寒天は 115°Cで15分、CW寒天は 121°Cで15分)、恒温槽等を使用し50°Cにする。これに、50%卵黄・滅菌精製水溶解液を

10%の割合で加え、泡をたてないように静かに攪拌しながら混合し、シャーレに 20mL ずつ分注して固める。III群菌の分離には、変法GAM寒天にシステインを 0.1%加え（この場合には pHの再調整が必要）、嫌気パウチ等を使用して予備還元した後に使用する。

A型、B型およびE型菌では変法GAM寒天より CW寒天の方が集落の観察がしやすい。しかし、CW寒天はC型やD型菌では良好な発育が認められず、C型やD型菌では変法GAM寒天を用いなければならない。

I群菌の分離には抗菌薬を添加した CBI寒天培地(Dezfulian, 1981)が有効な場合もある。

#### 変法CBI寒天培地

卵黄加CW寒天培地または卵黄加変法GAM寒天培地に抗菌薬を添加し、ボツリヌス以外の細菌の増殖を抑制することにより、ボツリヌス菌を効率的に分離することも可能である。

D-サイクロセリン	250 µg/mL	
スルファメトキサゾール	76 µg/mL	
トリメトプリム	4 µg/mL	を添加して用いる。

抗菌薬は、ポアサイズ 0.45µmの滅菌フィルターでろ過し、50°Cに冷やした滅菌済み基礎培地に卵黄液とともに添加する。

### 3) LV寒天培地 (Lecitho vitellin agar) (Cowan, 1965)

滅菌生理食塩水 1,000mL に珪藻土を 25g 添加して高圧滅菌し、冷却後これに鶏卵 4個分の卵黄を添加して十分に攪拌し、1,000rpmで 10分間遠心後、上清をそのまま、あるいは無菌的にろ紙 (Whatman<sup>®</sup>, DE81) でろ過して卵黄液 (LV液) とする。次に、LV 液 100mL を 55°C に保温した滅菌ハートインフュージョン寒天培地 (原法では普通寒天培地) 900mLに混合し、クリスタルバイオレットを 1.43mg/L 加えて 20mLずつシャーレに分注し、十分に乾燥する。LV 液は1ヶ月程度であれば冷蔵、それ以上の期間であれば -20°C 以下での冷凍保存が可能であるが、冷凍の場合には解凍により卵黄が粒子状になりやすいため用事調製が望ましい。

卵黄添加培地を用いて G型以外のボツリヌス菌を 30°Cで 48時間嫌気培養を行った場合、菌が産生するリパーゼ (lipase)により、集落直下に乳濁帯、集落周辺表面に明瞭な「真珠様」層を形成し、ボツリヌス菌を疑う集落の判定が極めて容易である。ただし、*C. sporogenes* と *C. novyi*、そして、自然界の土壌等に多い無毒のボツリヌスE型菌類似菌 (Boticin Eなどのバクテリオシン産生菌および非産生菌) もリパーゼ産生性であるため、本培地では、ボツリヌス菌と誤判定し易い。ボツリヌス菌と疑われた菌については毒素産生の確認が必要である。



**写真2 リパーゼ反応**  
A型ボツリヌス菌62A株の卵黄加ブルセラHK培地上のコロニー。  
寒天平板の表面に光があたるようにすると、コロニー周辺の真珠様層(pearly-layer)を観察しやすい。

## (2) ボツリヌス菌の分離

ボツリヌス菌は偏性嫌気性菌であるために、寒天平板培地の培養には嫌気パウチまたは嫌気ジャーの使用、あるいは嫌気チャンバーの使用による嫌気培養が必須である。

### 1) 増菌培養

「ボツリヌス毒素の検出検査 (2)検体の調製 2 糞便」の過程で、遠心分離した沈渣 0.5mL~1mLを増菌培地 3本の深部にパスツールピペットあるいは駒込ピペットで静かに移植し、1本目はそのまま、2本目は 60℃で10~15分、3本目は 80℃で10~30分間加熱後、それぞれ 30℃で 4~7日間培養する。加熱処理は、芽胞の発芽を促進するとともに、非芽胞性の混在菌を除く効果がある。

培養 4日目および 7日目に、培養液中のボツリヌス毒素の有無を調べる(マウス試験)。ボツリヌス毒素が検出されれば、ボツリヌス菌陽性とし、ボツリヌス菌の分離を行う。この際、80℃で 15~30分間加熱後培養した増菌培地以外の培養液中に毒素が検出されても、沈渣中のボツリヌス毒素の移行が推測されるので、供試材料中にボツリヌス毒素が証明された検体では考慮を要する。

### 2) 分離培養

毒素が証明された培養試験管の深部液を分離培地に画線し、30℃で 48時間、嫌気培養する。芽胞非形成菌が多い場合には、増菌培養液 2mLに等量のエタノールを添加し、25℃で1時間処理する方法も有用である(Johnston, 1964)。ボツリヌス菌は、リパーゼを産生(G型菌は非産生)するため、卵黄添加寒天培地上で卵黄中の脂肪を分解し、培地上のコロニーの周りに限局して pearly layer あるいは oil-on-water と呼ばれる真珠色の光沢リングを呈する。ボツリヌス菌が疑われる集落をなるべく多く釣菌して、ブドウ糖・デ

ンブン加クックドミート培地に接種し、30℃で4日間培養する。次に、培養液から「マウス試験」の記載に従ってボツリヌス毒素を検出し、ボツリヌス毒素型が決定されれば、当該毒素型のボツリヌス菌が分離されたことになる。分離株は、生化学的性状検査や16S rRNA 遺伝子などの分析によっても同定が行われるが、本菌の同定には、毒素産生と毒素型の決定が重要である（生化学性状や遺伝学的分析からボツリヌス菌に類似した菌と同定されても、毒素産生性がなければボツリヌス症の原因とはならない）。

採取した検体から菌が分離された場合は、感染源・感染経路について調査する必要がある。特に乳児ボツリヌス症の場合は、患児便中のボツリヌス菌で、発病後に自宅内が汚染されている可能性もあるので、環境等から分離された菌が感染源であるかどうかは慎重に判断する必要がある。また、分離菌株の比較解析は、遺伝学的な手法 [PFGE法 (pulsed-field gel electrophoresis)、MLST法 (Multi locus sequence typing)、MLVA法 (Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis)、毒素遺伝子の塩基配列分析など]により行うことができる。

#### <<参考情報>> パウチ法によるボツリヌス菌の分離

「クックドミート培地などの培養液中にボツリヌス毒素が証明されたとしても、その培養液中にボツリヌス菌が多数存在するとは限らず、圧倒的多数の夾雑菌の中に極少数のボツリヌス菌が存在する可能性がある。そのような場合、培養液の1白金耳量のみを平板培地で分離培養しても、ボツリヌス菌を分離することはできない。LV等の培地に「mL単位」の培養液を混合して培養する「パウチ法」が非常に有効なことがある。以下にその検査事例を記す。

土壌や食品からのボツリヌス菌の分離は、夾雑菌のために困難を極める場合がある。実際、秋田県で発生した自家製イモノコ（里芋）缶詰を原因とするA型ボツリヌス菌による食中毒の検査において、ボツリヌス毒素の存在がマウス試験により証明されたイモノコの培養液から平板培地を使用してA型ボツリヌス菌を分離・同定することは極めて困難であった。しかし、「パウチ法」により当該培養液からA型ボツリヌス菌を分離・同定することに成功した。なお、パウチ法の詳細は「ボツリヌス菌の簡易検査法」、阪口玄二・大石 巖、食品衛生研究 Vol.25 (10), p.11-21.に記載されている。本法に使用するパウチは、酒見医科機器舗から販売されているPTパウチ（TEL:06-6781-7532、E-Mail: [mt7n-skm@asahi-net.or.jp](mailto:mt7n-skm@asahi-net.or.jp)）あるいは同等品が利用できる。

##### 1) 使用培地

培地にはLV寒天培地（前記3））にL-システイン（和光純薬）を0.1%加えた変法LV培地を使用した（「青森県におけるボツリヌス中毒とボツリヌス菌の分布」、大友良光・豊川安延、青森県衛生研究所 編集・発行、1981）。

##### 2) 培養方法

マウス試験によりボツリヌス毒素の存在が証明された培養液、その他の検体に必要に応じて加熱処理を施し、その1mLをパウチに注入し、保温しておいた変法LV培地15mLを加えて混合した。気泡を追い出した後に実験台上などで寒天を固化させ、パウチ上部をヒートシールした後、30℃で24～48時間培養した。ボツリヌス菌は変法LV培地中で卵黄反応によるハ



ローを伴うコロニーを形成するため、該当するコロニーを釣菌して純培養となるまでさらに分離培養を実施した。なお、釣菌に際してはコロニー前面のパウチを滅菌メスで切り開いた後、白金線により目的とするコロニーを釣菌した。」

## 6. ボツリヌス毒素遺伝子の検出 (PCR 法)

PCR法によるボツリヌス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。またマウスと抗毒素による中和試験を行わなくても、菌の毒素型を簡易的に知ることが出来る。しかし、ボツリヌス毒素遺伝子の中には、サイレント遺伝子（ボツリヌス毒素の遺伝子だが、変異によって機能が損なわれており、実際に毒素の産生は起こさないもの）の存在が知られている。特に、B型のサイレント遺伝子をもつ A(B)型菌は比較的頻繁に検体から検出される。従って、厳密には PCR法による毒素遺伝子検出単独ではボツリヌス毒素産生能の有無を判定できず、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法によるボツリヌス毒素遺伝子の検査法の概略を示す。

### (1) テンプレートの作製

- 1) 疑わしい集落をブドウ糖・デンプン加クックドミート培地あるいは TPGY培地に接種し、30℃で 1～2日間培養する。
- 2) 培養液 0.2 mLを 1.5 mLのエッペンドルフチューブに採取し、12,000 rpm、4℃で10分間遠心する。
- 3) ピペットマン等を用いて上清を捨て(毒素が含まれる可能性が高いので注意を要する)、0.2 mLの TE-0.1% Tween 20 を加える。
- 4) 沈渣をボルテックスで均一に懸濁し、100℃で10分間加熱する。この処理によって、毒素が失活するとともに遺伝子も抽出される。
- 5) 12,000 rpm、4℃で 10分間遠心し、上清を PCR に供する。フィルター濾過を行うことにより、芽胞除去が確実になる。

### <<NOTE>>

分離培地上の疑わしい集落を少量の TE-0.1% Tween20等に懸濁し、100℃で10分間加熱、遠心することにより、テンプレートを作製する方法もある。この場合は集落のレプリカを作製する必要がある。

### (2) PCR反応

市販の PCR 用試薬を用い、添付マニュアルに従って行う。  
使用するプライマー配列の例などを参考情報に記す。

<<参考情報>> ボツリヌス毒素遺伝子検出用プライマー

ボツリヌス毒素遺伝子検出用の PCR 用プライマーの例として以下のようなものがある。ここに記載するのは例示であり、他に多くのプライマー配列が報告されている。

ボツリヌス毒素遺伝子検査用プライマー例 (Takeshi, 1996)

A 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約280 bp)

F プライマー: 5'- TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT -3'

R プライマー: 5'- TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC -3'

B 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約320 bp)

F プライマー: 5'- CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG -3'

R プライマー: 5'- CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT -3'

C 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約290 bp)

F プライマー: 5'- ATA CAC TAG CTA ATG AGC CTG -3'

R プライマー: 5'- TGG AGT ATT GTT ATT CCC AGG -3'

D 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約500 bp)

F プライマー: 5'- GTG ATC CTG TTA ATG ACA ATG -3'

R プライマー: 5'- TCC TTG CAA TGT AAG GGA TGC -3'

E 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約270 bp)

F プライマー: 5'- CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A -3'

R プライマー: 5'- ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC -3'

F 型毒素遺伝子検出用 (増幅産物サイズ 約330 bp)

F プライマー: 5'- CAA TAG GAA CGA ATC CTA GTG -3'

R プライマー: 5'- ATC AGG TCC TGC TCC CAA TAC -3'

上記のプライマーを使用する場合は、陽性対照として、TaKaRa から販売されている陽性対照用 DNAも使用できる。しかし、この陽性対照から増幅されるPCR 産物のサイズはボツリヌス毒素遺伝子から得られる増幅産物と異なっており、使用時は注意が必要である (タカラバイオ 特殊細菌検出用 Positive Control Template 総合カタログ2011 C-13)。ボツリヌス菌株から抽出したゲノムDNAは国立感染症研究所から分与可能である。

G 型毒素遺伝子検出用としては以下のような プライマーの使用が考えられる。

G 型毒素遺伝子検出用

F プライマー : 5'- TAG TAA TTT AAC TAT AAA TT-3'

R プライマー : 5'- TTT ATA AAA GAC AGT ATT GT-3'

このプライマーは G型毒素遺伝子 (GenBank Accession No. X87972) の 3071番目から 3620番目までの 550 bp の塩基配列を増幅する。

また、A、B、E、F 型の検出に限られるが、Lindström, 2001の文献に記載された方法は Multiplex PCR であるため施行が簡易である。国立感染症研究所 細菌第二部で試用した範囲では、検出感度と特異度とも上述のTakeshiらにより報告された方法と大きな違いはなかった。

C型と D型の遺伝子には両者の配列が混在した C/D、D/C 型 (モザイク型) の遺伝子も存在している。これらの遺伝子の検出、型別を行うには、Takeda, 2005らにより報告された PCR 法が有用である。ヒトのボツリヌス症疑い検査で C型と D型のボツリヌス毒素遺伝子が問題になることはまれだが、C型と D型の検討が必要な事例が発生した場合は、陽性対照 DNAについては国立感染症研究所より分与可能である。

### III ボツリヌス症の診断基準

ボツリヌス食中毒の診断に際して、弛緩性の麻痺をともなう臨床所見とともに「患者の喫食した残りの食品、又は同一ロットの製品から、ボツリヌス毒素又はボツリヌス菌が検出された場合」には、糞便または血清から毒素が検出されない場合でもボツリヌス食中毒と診断する。また、ボツリヌス症の診断に際して、糞便からボツリヌス毒素が検出されても、ボツリヌス菌が分離できない事例もあることから、臨床所見とともに「糞便、血清中或いは創傷部等の患者材料からボツリヌス毒素が検出された場合」や「抗毒素治療が施され顕著な治療効果が認められた場合」にはボツリヌス症として診断することを提唱する。

下記に感染症法に基づくボツリヌス症の届け出基準を記す。この中の記載では、病原菌が分離された場合、PCR による毒素遺伝子の検出がなされれば、毒素産生の確認がなくても、ボツリヌス症の診断基準をみたす記載となっている。多くの場合は、これでも問題はないが、本マニュアルにも記載したように、ボツリヌス毒素遺伝子の中には実際に毒素産生を起こさないサイレント遺伝子も知られているので、この点は留意しておく必要がある。

#### 感染症に基づくボツリヌス症の届け出基準

感染症法の第12条第1項および第14条第2項に基づく医師及び獣医師の届出の基準としては、下記のように定められている。

<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-32.html>

#### (1) 定義

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が産生するボツリヌス毒素、又は *C. butyricum*、*C. baratii* などが産生するボツリヌス毒素により発症する神経、筋の麻痺性疾患である。

#### (2) 臨床的特徴

ボツリヌス毒素又はそれらの毒素を産生する菌の芽胞が混入した食品の摂取などによって発症する。潜伏期は、毒素を摂取した場合（食餌性ボツリヌス症）には、5時間～3日間（通常12～24時間）とされる。

神経・筋接合部、自律神経節、神経節後の副交感神経末端からのアセチルコリン放出の阻害により、弛緩性麻痺を生じ、種々の症状（全身の違和感、複視、眼瞼下垂、嚥下困難、口渇、便秘、脱力感、筋力低下、呼吸困難など）が出現し、適切な治療を施さない重症患者では死亡する場合がある。

感染経路の違いにより、以下の4つの病型に分類される。

(ア) 食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス中毒）

食品中でボツリヌス菌が増殖して産生された毒素を経口的に摂取することによって発症

(イ) 乳児ボツリヌス症

1歳以下の乳児が菌の芽胞を摂取することにより、腸管内で芽胞が発芽し、産生された毒素の作用によって発症

(ウ) 創傷ボツリヌス症

創傷部位で菌の芽胞が発芽し、産生された毒素により発症

(エ) 成人腸管定着ボツリヌス症

ボツリヌス菌に汚染された食品を摂取した1歳以上のヒトの腸管に数ヶ月間菌が定着し毒素を産生し、乳児ボツリヌス症と類似の症状が長期にわたって持続

### (3) 届出基準

ア 患者（確定例）

医師は、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見からボツリヌス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、ボツリヌス症患者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

イ 無症状病原体保有者

医師は、診察した者が(2)の臨床的特徴を呈していないが、次の表の左欄に掲げる検査方法により、ボツリヌス症の無症状病原体保有者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

ウ 感染症死亡者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、ボツリヌス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、ボツリヌス症により死亡したと判断した場合には、法第12条第4項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

エ 感染症死亡疑い者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、ボツリヌス症により死亡したと疑われる場合には、法第12条第4項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

検査方法	検査材料
ボツリヌス毒素の検出 分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における次の(1)、(2)いずれかによるボツリヌス毒素の確認 (1) 毒素産生の確認 (2) PCR法による毒素遺伝子の検出	血液、便、吐物、腸内容物、創部の浸出液
原因食品からのボツリヌス毒素の検出	原因食品
ボツリヌス抗毒素抗体の検出（数か月後）	血清

## ボツリヌス症発生届

都道府県知事（保健所設置市・特別区長） 殿

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第12条第1項（同条第6項において準用する場合を含む。）の規定により、以下のとおり届け出る。

報告年月日 平成 年 月 日

医師の氏名 \_\_\_\_\_ 印 \_\_\_\_\_  
(署名又は記名押印のこと)

従事する病院・診療所の名称 \_\_\_\_\_

上記病院・診療所の所在地(※) \_\_\_\_\_

電話番号(※) ( ) - \_\_\_\_\_

(※病院・診療所に従事していない医師にあっては、その住所・電話番号を記載)

1 診断（検案）した者（死体）の種類 ・患者（確定例） ・無症状病原体保有者 ・感染症死亡者の死体 ・感染症死亡疑い者の死体					
2 当該者氏名	3 性別 男・女	4 生年月日 年 月 日	5 診断時の年齢(0歳は月齢) 歳 ( か月)	6 当該者職業	
7 当該者住所 電話 ( ) -					
8 当該者所在地 電話 ( ) -					
9 保護者氏名	10 保護者住所 (9、10は患者が未成年の場合のみ記入) 電話 ( ) -				

病 型		18 感染原因・感染経路・感染地域
1) 食餌性(食中毒)、2) 乳児、 3) 創傷、4) 成人腸管定着、5) 不明		①感染原因・感染経路 ( 確定 ・ 推定 )
11 症 状	・弛緩性麻痺 ・複視 ・眼瞼下垂 ・嚥下困難 ・口渴 ・便秘 ・筋力低下 ・呼吸困難 ・その他 ( ) ・なし	1 経口感染 (飲食物の種類・状況 : ) 2 創傷感染 (創傷の部位・状況 )
12 診断方法	・検体から直接のボツリヌス毒素の検出 検体：血液・便・吐物・腸内容物・創部の浸出液 ・その他 ( ) ・分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における次の①、②いずれかによるボツリヌス毒素の確認 (①毒素産生、②PCR法による毒素遺伝子) 検体：血液・便・吐物・腸内容物・創部の浸出液・ その他 ( ) ・原因食品からのボツリヌス毒素の検出 原因食品 ( ) ・ボツリヌス毒素に対する血清抗体の検出 (数か月後) ・その他の方法 ( ) 検体 ( ) 結果 ( )	3 その他 ( )  ②感染地域 ( 確定 ・ 推定 ) 1 日本国内 ( 都道府県 市区町村) 2 国外 ( 国 詳細地域 )
13 初診年月日	平成 年 月 日	19 その他感染症のまん延の防止及び当該者の医療のために医師が必要と認める事項
14 診断（検案(※)）年月日	平成 年 月 日	
15 感染したと推定される年月日	平成 年 月 日	
16 発病年月日 (*)	平成 年 月 日	
17 死亡年月日 (※)	平成 年 月 日	

(1, 3, 11, 12, 18 欄は該当する番号等を○で囲み、4, 5, 13 から 17 欄は年齢、年月日を記入すること。)

(※)欄は、死亡者を検案した場合のみ記入すること。(\*)欄は、患者（確定例）を診断した場合のみ記入すること。

11, 12 欄は、該当するものすべてを記載すること。)

この届出は診断後直ちに行ってください

#### IV 引用文献

1. Cato, E. P., George, W. L. and Finegold, S. M. : Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23<sup>A L</sup>, In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. p.1141-1200, Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
2. Hatheway, C. L. : *Clostridium botulinum* and other Clostridia that produce botulinum neurotoxin. In Hauschild, A.H.W. Dodds. K.L. eds. *Clostridium botulinum* : Ecology and Control in foods. New York, Marcel Dekker Inc. p3-20 (1992)
3. Suen, J.C., Hatheway, C.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D. J. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. Int J Syst Bacteriol 38:375–381 (1988)
4. 国立感染症研究所細菌・血液製剤部 編集・発行：ボツリヌス症の手引き・資料集、平成13年9月
5. <http://www.infantbotulism.org/>
6. Koepke, R., Soebel, J., Arnon, SS. Global occurrence of infant botulism, 1976-2006. Pediatrics 122:e73-e82 (2008)
7. Centers for Disease Control and Prevention : Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, Clinicians, and laboratory workers. p1-25 (1998)
8. [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism\\_surveillance.html](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism_surveillance.html)
9. Oguma, K., Yokota, K., Hayashi S., *et al.* Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin. Lancet 336, 1449-1450. (1990)
10. Abe, Y., Negasawa, T., Monma, C., and Oka, A. Infantile botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin. Pediatr Neurol 38:55-59 (2008)
11. Brook, I. Botulism: the challenge of diagnosis and treatment. Rev. Neurol. Dis. 3, 182-189 (2006)
12. Oie S, Obayashi, A., Yamasaki, H., *et al.* Disinfection methods for spores of *Bacillus atropheus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*. Biol Pharm Bull. 34:1325-1329. (2011)
13. Hatheway, C. and Dang, C. In Ch. 8, Immunogenicity of the neurotoxins of *C. botulinum*. pp. 93-107 in *Therapy with Botulinum Toxin*, Jankovic, J. and Hallet, M. eds., Marcel Dekker, NY/Basel/Hong Kong (1994)
14. Cowan, S. T. and Steel, R.J. :Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge, 119



(1965)

15. Dezfulian, M., McCrosky, L.M., Hatheway, C.L. and Dowell, V.R. Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. J. Clin. Microbiol. **13**, 526-531 (1981)
16. Johnston, R., Harmon, S., and Kautter, D. Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. J. Bacteriol. 88: 1521-1522 (1964)
17. Takeshi, K., Fujinaga, Y., Inoue, K. *et al.* Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. 40:5-11 (1996)
18. Lindström, M., Keto, R., Markkula, A., *et al.* Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5694-5699 (2001)
19. Takeda, M., Tsukamoto, K., Kohda, T. *et al.* Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. Avian Dis. 49:376-381 (2005)
20. 阪口玄二：ボツリヌス症－病因、病態、発病機序、診断と治療．病原微生物検出情報、21、51-52（2000）
21. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-32.html>

## V 検査相談先及び連絡先

### (地方衛生研究所等)

秋田県健康環境センター 細菌班 八柳 潤  
〒010-0874 秋田市千秋久保田町6番6号 TEL: 018-832-5034

東京都健康安全研究センター 微生物部 門間千枝  
〒169-0073 東京都新宿区百人町3丁目24番1号 TEL: 03-3363-3231

滋賀県衛生科学センター 林 賢一  
〒520-0834 大津市御殿浜13番45号 TEL: 077-537-3050

兵庫県立健康環境科学研究所 感染症部 辻 英高  
〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29 TEL: 078-511-6640

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課 河合高生  
〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69 TEL: 06-6972-1321

広島市衛生研究所 生物科学部  
〒733-8650 広島市西区商工センター4丁目1番2号 TEL: 082-277-6575

福岡県保健環境研究所 病理細菌課  
〒818-0135 太宰府市大字向佐野字迎田39番地 TEL: 092-921-9944

### (国立機関および大学／大学院)

国立弘前大学法人弘前大学大学院 保健学研究科 医療生命科学領域 大友良光  
〒036-8564 青森県弘前市本町66-1 TEL: 0172-39-5970

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 五十君静信  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 TEL: 03-3700-9164

国立感染症研究所 細菌第二部 第三室 加藤はる  
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 TEL: 042-561-0771

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科感染症制御学講座 小崎俊司  
〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1 TEL: 072-254-9504

大阪大学微生物病研究所  
付属感染症国際感染センター／感染細胞生物学研究グループ 藤永由佳子  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1 TEL: 06-6879-4250

## VI 執筆者一覧

(アイウエオ順)

浅尾 努	大阪府立公衆衛生研究所 感染症部
石黒 靖尚	福岡県保健環境研究所 病理細菌課
岩城 正昭	国立感染症研究所 細菌第二部
内村 眞佐子	千葉県衛生研究所 細菌研究室
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター 微生物部
小崎 俊司	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第二部
林 賢一	滋賀県衛生科学センター
堀川 和美	福岡県保健環境研究所 病理細菌課
門間 千枝	東京都健康安全研究センター 微生物部
八柳 潤	秋田県衛生科学研究所 微生物部

### 平成24年 改訂版執筆者

(アイウエオ順)

石村 勝之	広島市衛生研究所 生物科学部
岩城 正昭	国立感染症研究所 細菌第二部
小笠原 準	大阪市立環境科学研究所 調査研究課
加藤 はる	国立感染症研究所 細菌第二部
河合 高生	大阪府立公衆衛生研究所 感染症部
見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部
坂本 綾	広島市衛生研究所 生物科学部
林 賢一	滋賀県衛生科学センター
門間 千枝	東京都健康安全研究センター 微生物部
八柳 潤	秋田県健康環境センター 細菌班

編集・発行

国立感染症研究所 レファレンス委員会  
地方衛生研究所全国協議会

発行年月日 平成24年12月07日