

表4. 食品および患者由来*B. cereus* (Bc) および*B. thuringiensis* (Bt)のPCR

アニーリング温度は、第1サイクルステップ57°C、
第2サイクルステップ60°Cで行った。

菌株番号	菌株名	菌種	卵黄反応	<i>B.cereus</i> hemolysin gene *1	<i>B.cereus</i> enterotoxin gene*2	<i>B.cereus</i> enterotoxin RPLA	rpoB	Ba813	sapk
60	3951	Bt	+	+	+	+	+	-	-
61	sotto	Bt	+	+	+	+	+	-	-
62	B	Bt	+	-	ND*3	+	+	-	-
63	13865	Bt	+	+	+	+	+	-	-
64	13866	Bt	+	+	+	+	+	-	-
65	漬物54-1	Bc	+	+	-	+	-	-	-
66	漬物8-1	Bc	+	+	-	+	+	-	-
67	漬物5-1	Bc	+	+	+	+	-	-	-
68	漬物2-2	Bc	+	-	+	-	+	-	-
69	漬物2-1	Bc	+	+	-	-	+	-	-
70	漬物55-1	Bc	+	+	+	+	+	-	-
71	M牛乳	Bc	+	+	+	+	+	-	-
72	食中毒9208	Bc	+	+	ND	-	+	-	-

*1 R.-F.Wang et al: Journal of Applied Microbiology 1997,83,727-736

*2 Norio Agata et al: Microbiology 1995,141,983-988

*3 ND: Not Defined

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

試験方法の検討および細菌類の遺伝子検出技術の開発

（河川における細菌叢）

分担研究者 黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所細菌病理部
協力研究者 泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部

炭疽菌の検出システムに何らかの弊害を与えることが予想される炭疽菌に類似の細菌（*Bacillus* 属菌を中心にした好気性芽胞菌）は河川中に広く分布していることが知られている。そこで、神奈川県内の 10 河川の河川水からの分離を行い、河川水における好気性芽胞菌の分布と構成種を調査した。

A. はじめに

水道水が病原細菌を用いたバイオテロリズムの対象になることは十分に想定される。もしもこのようなテロが行われた場合に、被害を抑止あるいは最低限にとどめるためには迅速に病原体を検出することが不可欠である。検出に際し、バイオテロリズムで利用される病原体に類似の微生物が検査材料中に存在すれば、検査の正確性が損なわれる可能性がある。そこで、水道原水を含む河川水における炭疽菌に類似の細菌（*Bacillus* 属菌を中心にした好気性芽胞菌）の分布状況を調べ、炭疽菌検出システムに影響を与える可能性がある菌種の存在を調べることを目的として、河川水における好気性芽胞菌の分布と構成種を調査した。

B. 研究方法

1) 河川水

好気性芽胞菌の分離には、平成 14 年 1 月 8 日に神奈川県内の 10 河川の下流域で採

取した試料を用いた。採水した河川は、下山川、森戸川、滑川、境川、引地川、相模川、金目川、中村川、酒匂川、早川とした。河川水の採取には、採取から菌の分離に用いるまでは、試料は冷蔵保存した。保存期間は 48 時間以内であった。

2) 好気性芽胞菌の培養と性状試験

河川水 10ml を 80℃で 20 分加熱し、10 倍希釈の希釈系列を作製して各段階の 100 μ l ずつを普通寒天平板に塗布した。これを 37℃で 24 時間培養し、釣菌用とした。菌数測定用として、希釈各段階の 100 μ l を普通寒天培地 20ml に加えて混合し、37℃で 24 時間培養した後に菌数を数えた。

分離菌株について、集落の形状（形態、色など）、グラム染色像、ブロスにおける発育像、50℃における発育、5%NaCl における発育を調べ、これらの性状に基づいてグループ分けした。

2) 遺伝子レベルにおける鑑別

単離された好気性芽胞菌は、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用して型別を行った。集落を 1.5ml チューブ中の滅菌 MQ 水に懸濁し、5 分間 100°C で DNA を遊離させ、1 μ l を鋳型 DNA 溶液として使用した。鋳型 DNA 1 μ l、滅菌 MQ 水 24 μ l および 25 μ l の PCR マスターミックスを混合し、キットの手順に従い GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems) を用いて 95°C 10 分の初期解離反応、95°C 30 秒、60°C 30 秒そして 72°C 45 秒の 30 サイクル反応、72°C 10 分の最終伸長反応と 4°C の保存のプログラムを実行した。

PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、泳動像において約 500bp の DNA 断片の生成を確認した。次いで QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を用いて PCR 産物を精製した。精製 PCR 産物の 1~3 μ l、滅菌 MQ 水 4~6 μ l および 13 μ l のシーケンスミックスを混合し、キットの手順に従い GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems) を用いて 96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分の 25 サイクル反応と 4°C での保存のプログラムを実行した。反応産物は Centri-Sep スピンカラム (Princeton separations) を用いて過剰色素を除去した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (シーケンサー) を用いて塩基配列の決定を行った。以上の PCR プライマー及びシーケンスプライマーはあらかじめマスターミックスとして供給されている物を使用した。シーケンス反応にはフォワードミックス及びリバーシックスを使用し、両鎖の

塩基配列を決定した。得られた塩基配列は Blast サーチにより既存の塩基配列との比較を行った。一部の株については配列が読み取れない領域も見られたが、その場合には読み取り可能な範囲に限って配列の決定とサーチを行った。

コントロールとして大腸菌の型別を行ったが、ホモロジーサーチの結果はまずサルモネラ族菌が先頭にあり (スコア 942)、大腸菌はサルモネラより 1% スコアの低い結果となった (スコア 934)。本研究で用いた手法による同定は、スコア値が低い結果も考慮に入れて判断すべき物と考えられた。このことから、1% 程度スコアが低い値を示した菌株も可能性があるものとして同定結果に含めた。

C. 研究結果

1) 好気性芽胞菌数

好気性芽胞菌数は $2.1 \times 10^3 \sim 7.2 \times 10^4$ CFU/ml であった。

2) 好気性芽胞菌の性状

調査した 10 河川から 83 株、河川別では 1 河川につき 3~18 株の好気性芽胞菌を分離した。分離株は集落の形状により 5 グループ (便宜的に R、SL、WR、W、Y、その他)、グラム染色像により 9 グループ (A、B、C、D、E、F、L、M、その他) に分けられた。集落グループの“R”は表面が疎の集落、“SL”はムコイド様、“WR”は白色を帯びた表面が疎の集落、“W”は表面がやや滑らかな集落、“Y”は黄色を帯びた表面がやや滑らかな集落であった。集落グループ“R”はグラム染色像グループ“A”に、“W”は“E”に、“WR”は“F”に、“Y”

は“M”にそれぞれ一致していた。集落グループ“SL”にはグラム染色像グループの“A”、“B”、“C”、“D”、“L”が含まれていた。集落グループ“その他”にはグループ分けできない分離株を収め、グラム染色像でもグループ分けできない形態を示した。

ブロス中の発育像は、“細かい塊状に発育（細塊状）”、“大きな塊状に発育（大塊状）”、“管底部に凝集（底部凝集）”、“水面に膜状に発育（膜状）”、“均一に浮遊”という性状がみられた。発育像は、集落グループによりおおまかに一定の傾向がみられた。すなわち、集落グループ“R”と“SL”では“細塊状”および“膜状”、“W”では“細塊状”、“大塊状”および“底部凝集”、“WR”と“Y”では“底部凝集”、“その他”では様々な性状を示した。

分離株の各種性状は表1に示した。

3) 遺伝子レベルの鑑別

分離した好気性芽胞菌株 88 株のうち、集落の性状およびグラム染色像に基づいて分けられた各グループから代表的な菌株 38 株を選び、これらについて遺伝子レベルの解析を行った。塩基配列決定を行った結果を表2に示した。型別の結果は大きく分けると、*B. anthracis/cereus/thuringiensis* グループ、*B. subtilis / licheniformis/mojavensis* グループ、*B. megaterium*、およびその他のグループに分かれた。*B. anthracis/cereus/thuringiensis* グループには、集落の性状に基づくグループ分けの“W”および“WR”が、*B. subtilis / licheniformis/mojavensis* グループには“R”および“SL”が属していた。

D. 考察

神奈川県内の 10 河川における *Bacillus* 属菌を中心にした好気性芽胞菌の分布と構成種を調べた。好気性芽胞菌は自然界に多数存在し、河川からも分離されることが知られている。横浜市水道局の調査でも、相模川の下流域の原水中に $10^2\sim 10^3$ CFU/ml 存在し、浄水場の配水中から 10^1 CFU/100 ml 検出されることが報告されている¹⁾。今回の調査でも好気性芽胞菌は 10 河川すべてから分離され、広く分布していることが改めて確認された。

神奈川県内の 10 河川から分離された菌株は *B. anthracis/cereus/thuringiensis* グループ、*B. subtilis / licheniformis/mojavensis* グループ等の 4 グループに分かれた。この中で *B. anthracis/cereus/thuringiensis* または *B. subtilis / licheniformis/mojavensis* グループでは、今回決定した約 500bp の塩基配列内ではグループ内における種間の異同がほとんど見られず、それぞれを鑑別するには精度が不足するためにこのようなグループ分けとなった。より詳細な鑑別には他の生化学的性状等を検査する必要があると考えられた。

B. anthracis/cereus/thuringiensis グループに属する菌株の炭疽菌との確実な鑑別が極めて重要であることは明白である。*B. anthracis* (炭疽菌)、*B. cereus* (セレウス菌) および *B. thuringiensis* は分類学上極めて近い種であるとされ、特に炭疽菌とセレウス菌は同一種であるという議論もなされている²⁾。今回の河川における好気性芽胞菌の調査では、*B. anthracis/cereus/thuringiensis* グループに分けられる菌株が 10 河川中 9 河川から分離されたことから

も、炭疽菌に類似する菌株が河川中に広く分布していることがわかる。炭疽菌検出のためのシステムの開発において、迅速かつ確実な方法を選択することが必要である。

1)横浜市水道局横浜市：記者発表資料 平成13年11月15日

2)Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.N.: The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook no. 427. Washington D.C.:US Department of Agriculture. 1973.

文献

表1 河川水から分離された好気性芽胞菌株の各種性状

集落グループ	染色像グループ	ブロスでの発育性状	10%NaClでの発育	50℃での発育
R	A	細塊状	-a	+b
		膜状		
SL	A,B,C	細塊状	+b	+b
	DL	膜状		
W	E	細	-	-
		大塊状		
		底部凝集		
WR	F	底部凝集	-	-
Y	M	底部凝集	-	-
その他	A,C,D その他	細	-	-a
		大塊状		
		底部凝集		
		均一に浮遊		

a : 一部 (+) b : 一部 (-)

表2 塩基配列決定による分離株の鑑別

グループ	鑑別結果	株数	集落の性状*	染色像*
1	<i>B. anthracis</i> / <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	7	W,WR	E, F
2	<i>B. subtilis</i> / <i>B. licheniformis</i> / <i>B. mojavensis</i>	18	R,SL	A, B, C, D, L
3	<i>B. megaterium</i>	3	Y	M
4	miscellaneous.	10	その他	A,C, D, その他

* 鑑別作業を進める際に便宜的なグループ分けを行った。

病原体の薬剤耐性 - 炭疽菌芽胞の塩素耐性試験 -

分担研究者	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
協力研究者	高木 弘隆	国立感染症研究所 バイオセイフティ管理室
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は発育・生存条件によって芽胞形成し、環境に対し耐性を示す。芽胞は熱、紫外線、消毒薬などにも強い耐性を示すこととなり、炭疽菌芽胞の汚染除去を困難にしている。この試験においては水道水中に炭疽菌芽胞が混入した場合を想定し、その塩素耐性および不活性化条件を「上水試験方法 6 微生物性状試験 6.1 塩素抵抗性試験」に準拠し検討した。塩素に対する炭疽菌芽胞の抵抗性については、今回の検討で 50mg/L の塩素濃度が維持されていれば 10 分以上の接触で 10^7 CFU を不活性化できることが示唆された。塩素濃度を 10mg/L とすると不活性化効果が極端に低下することから、10~50mg/L の間に不活性化の変曲点が存在すると考えられた。

A. 研究目的

危機管理の一環として、水道水への病原微生物混入を想定した際、その対応措置として汚染病原体の迅速検出方法と汚染除去方法の確立が必須である。本研究においては、炭疽菌芽胞の混入を想定し、その除去方法を検討した。芽胞等の不活化には熱、紫外線、薬剤等の各種の処理方法が考えられるが、現行の浄水処理で塩素消毒が常用されていることを考慮すれば、汚染水道施設の消毒に塩素剤を適用することが現実的と判断される。そこで、本研究においては炭疽菌芽胞の塩素耐性について塩素処理条件を低-高濃度に分けて検討し、具体的な処理条件の確立に努めた。

B. 研究方法

【試験材料・試薬】

- (1) 使用炭疽菌： パスツール I 菌株
- (2) 残留塩素測定器： HANNA 製 HI93711 遊離・全塩素測定型
及び同社製 全塩素測定試薬
- (3) ドライバス： TAITEC 製 ドライサーモユニット DTU-1B
- (4) 低温恒温槽： TAITEC 製 低恒温バケツ ECB
- (5) マイクロ遠心器： TOMY 製 PMC-060
- (6) 細胞培養用 12well plate： IWAKI 製 Multiple well plate(code.3815-012)
- (7) 寒天培地および液体培地： 適宜、培地を選択して使用した。(不要の情報提供はテロ対策上不適当と判断されることから本報告書には培地の特定をさけた。)
- (8) ポリペプトン： 日本製薬製 ポリペプトン細粒(code.391-00821)
- (9) 次亜塩素酸ナトリウム： オーヤラクス製 ピューラックス®

【準備・方法】

これからの一連の操作について、供試菌生菌の取扱は全て P3 実験室及びクラス II B3 型キャビネットを使用した。

(1) 試験用炭疽菌芽胞浮遊液の調製

芽胞の調製法については所定の方法を用いて行った。本研究には芽胞の調製が必須であるが、芽胞産生方法を詳細に記す必要は無いものと判断した。不要の情報提供はテロ対策上不適切と判断されることから本報告書には培地、培養条件等の記載を避けた。

(2) 試験水の調製

塩素消費のない 50mM リン酸緩衝液 pH7.0±0.1 を 121℃、20 分間高圧蒸気滅菌し、これを試験水として用いた。

(3) 試験用塩素水の調製

試験水(2)を滅菌済み 50ml ディスポ遠心チューブに 10~20ml を正確にはかり取り(重量計量が望ましい)、これに有効塩素 5%以上のピューラックス®を 200±10mg/L となるよう加える。精製水にて 100 倍希釈し、全塩素測定試薬及び残留塩素計にて塩素濃度を測定し前記の濃度範囲であれば、これを塩素水原液としてさらに試験水(2)を用いて 10、50、100mg/L の試験用塩素水を調製した。

また 1mg/L 以下の試験用塩素水については、同様の方法で 10±1mg/L の塩素水原液を準備し、これを試験水(2)を用いて 0.5、1mg/L の試験用塩素水を調製した。

(4) 塩素中和液の調製

0.4M チオ硫酸ナトリウム溶液を孔径 0.22µm の滅菌済みカートリッジフィルターにて濾過滅菌したものをストック溶液として、これを Buffered peptone water(0.1%ポリペプトン、0.43%NaCl、0.0261M リン酸二水素カリウム、0.0509M リン酸水素ナトリウム pH7.0、以下 BPW)に用時 1/20 容量加え調製した。

(5) 炭疽菌芽胞浮遊液と塩素水との反応

炭疽菌芽胞浮遊液は予め寒天培地によりコロニーカウントを行い、約 10⁸CFU/ml となるよう、適宜滅菌済み生理食塩水にて希釈した。(3)で調製した試験用塩素水を 50ml 遠心チューブ 2 本に各々 10~20ml 正確に等量分取する。これを低恒温バケツトにて 20℃で予備冷却加温しておく(塩素濃度 0.5~1mg/L については 4℃での反応も実施した)。

図 1.のプロトコールに示すように、塩素水の 1/100 容量の炭疽菌芽胞浮遊液を加え、速やかに混合する(塩素反応液)。これより経時的にサンプルを採取し、等量の塩素中和液と混合したものを BPW にて 10 倍段階希釈して、菌数測定サンプルとした。なお経時的サンプリングについては、使用塩素濃度によって 50~200mg/L の場合 0.5、1、5、10 分、10mg/L の場合 5、10、30、60、120、180 分、0.5~1mg/L の場合 1、2、5、17 時間とした。

反応初発サンプル (0 time) は準備した塩素水にチオ硫酸ナトリウムストック溶液を 1/20 容量加え、これに炭疽菌芽胞浮遊液を 1/100 容量加えたものを用いた。

(6) 菌数測定方法

12well plate に作成した寒天培地を良く乾燥させ、各 10 倍段階希釈溶液を 1well 当たり 25µl、

duplicate で滴下する。これを 37℃で 18～24 時間培養し、出現したコロニーをカウントして、希釈倍率から塩素反応液 1ml 中の菌数を測定した。

また塩素濃度 50～200mg/L の場合については、一部上記の方法では検出感度が不足するため、図 2 に示すような 24well-plate を用いた Micro MPN 法及び最確数表により菌数を算出した。

(7) 塩素反応液の残留塩素測定

塩素濃度 50～200mg/L の場合は初発及び 10 分後、10mg/L の場合は初発、60、120、180 分後、0.5～1mg/L の場合は 1、5、17 時間後に反応塩素水の一部を採取し、残留塩素測定器及び全塩素測定試薬を用いて、残留塩素測定を行った。

図 1. 炭疽菌芽胞浮遊液－塩素水反応プロトコール

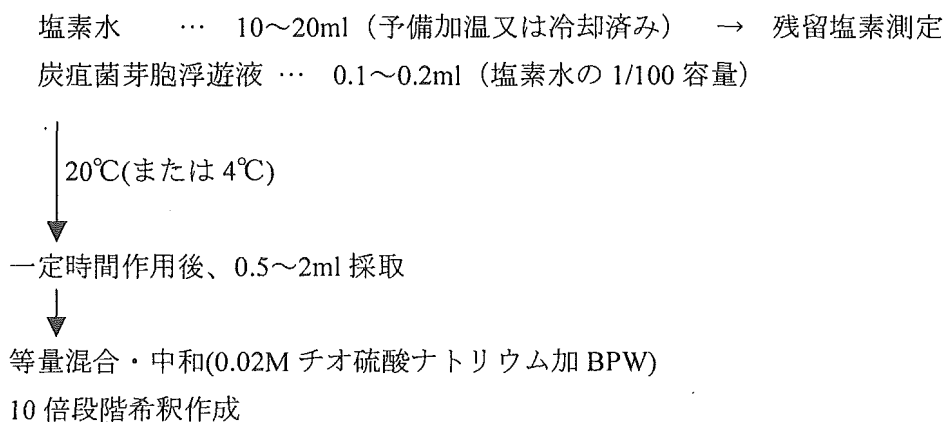
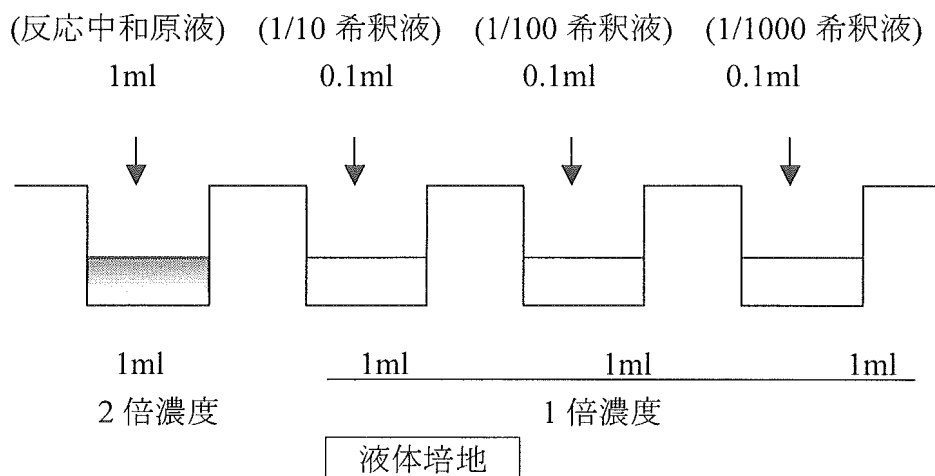


図 2. Micro MPN 法



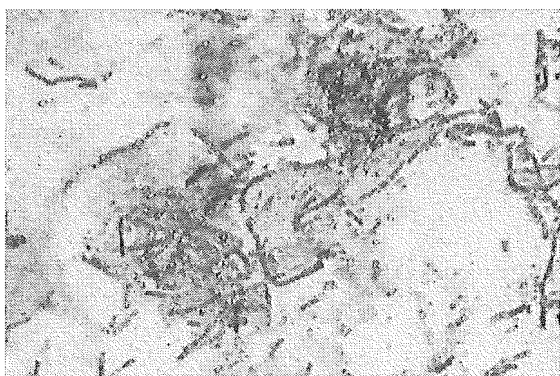
各希釈段階で $n=5$ とし、希釈液添加後 37°C 、24~48 時間培養し、菌塊の出現・増殖をもって陽性とした。陽性 well 数を試験管 5 本法用の最確数表に照らし合わせ、反応中和溶液 10ml(塩素反応液 5ml)当たりの MPN を算出する。

C. 結果

(1) 炭疽菌芽胞浮遊液の調製について

記載せず。得られた芽胞は図 3 に示した。

A 形成途中の芽



B 芽胞

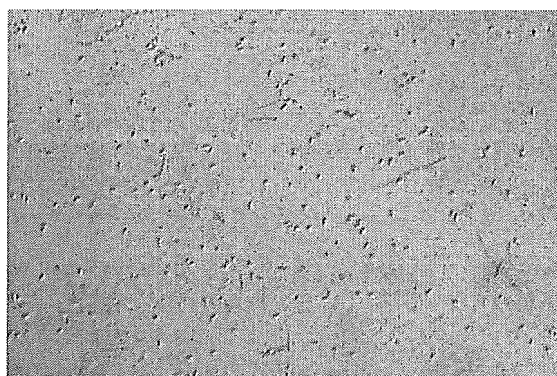


図 3 *B. anthracis* 芽胞

塩素耐性および熱耐性試験を目的として *B. anthracis* の芽胞の調製を行った。A：形成途中の芽胞を示した（メチレン青単染色）。栄養型細胞の中で形成されている多数の芽胞が観察された。B：均一な芽胞が得られた（微分干渉像）。強固な塩素耐性および熱耐性を示した。

(2) 塩素水による炭疽菌芽胞殺菌効果

(a) 塩素濃度 55~209mg/L の場合 (図 4)

塩素反応液中の初発菌 (芽胞) 数 1.3×10^6 CFU/ml において、50mg/L 及び 100mg/L では 5 分、200mg/L では 1 分の反応時間で炭疽菌が全く検出されず、Micro MPN 法では各々の反応時間で 10^7 CFU の炭疽菌芽胞が不活性化されたことが確認された。

また反応前と 10 分後の全塩素濃度は 55→50mg/L、103→83mg/L、209→169mg/L と 10~20% 減少していた。

(b) 塩素濃度 11.1mg/L の場合 (図 5)

塩素反応液中の初発菌数約 $1.8 \sim 1.9 \times 10^6$ CFU/ml において、反応 60 分後で約 60% の菌数減少が認められたが、その後 180 分までは非常にゆるやかに減少し、約 70% の菌数減少となった。

反応前と 60、120、180 分後の全塩素濃度は 11.1、6.8~7.2、6.1~6.2、5.7~5.9mg/L であった。

(c) 塩素濃度 0.55~1.2mg/L の場合 (図 6, 7)

反応温度 20℃では、塩素反応液中の初発菌数約 $1.5 \sim 1.9 \times 10^6$ CFU/ml において菌数減少は非常にゆるやかであり、17 時間後では 0.55mg/L で 26~42%、1.1mg/L で約 50% の減少となった。

反応前と 1、5、17 時間後の全塩素濃度は各々 0.55→0.56→0.42→0.38mg/L、1.1→1.08→0.74→0.56mg/L であった。

反応温度 4℃では、塩素反応液中の初発菌数約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^6$ CFU/ml において菌数減少はほとんど認められず、1.2mg/L でも反応 17 時間後で 30% 以下の減少しか認められなかった。

反応前と 1、5、17 時間後の全塩素濃度は各々 0.64→0.52→0.50→0.42mg/L、1.2→1.06→1.00→0.82mg/L であった。

圖 4.

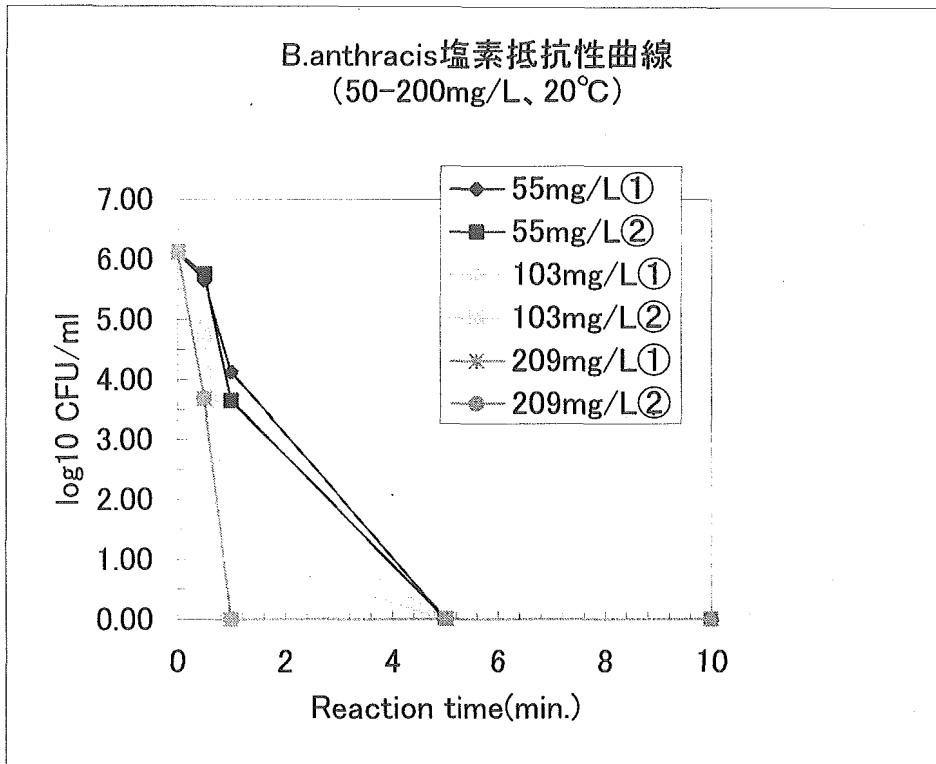


圖 5.

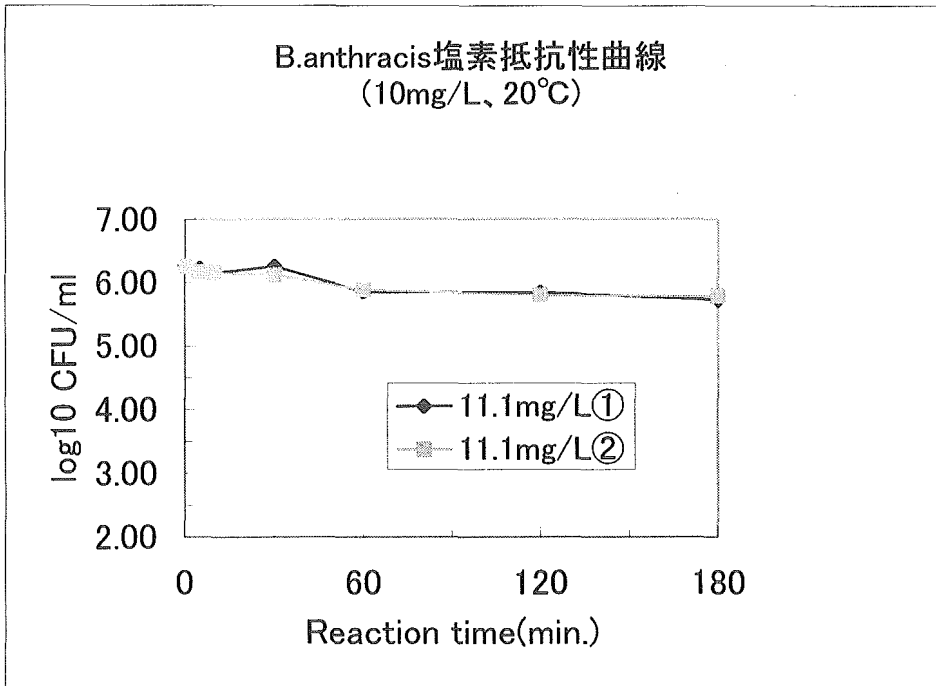


圖 6.

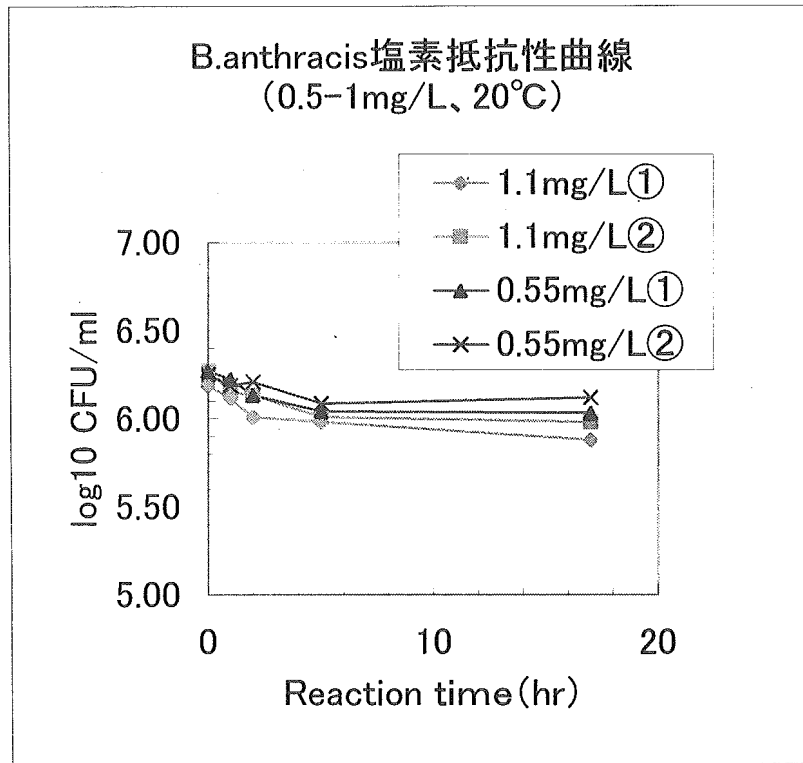
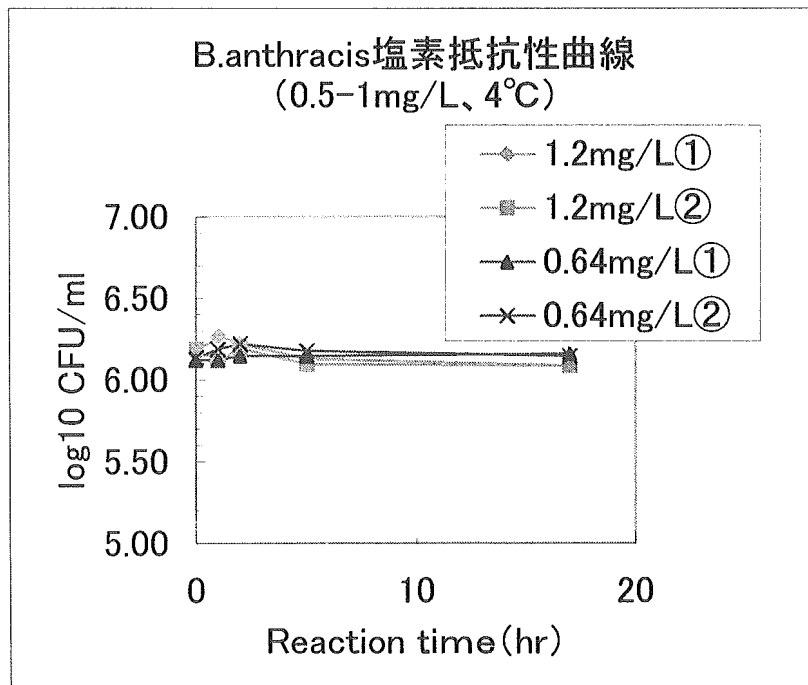


圖 7.



D. 考察および結論

炭疽菌芽胞浮遊液の調製については培養における芽胞形成が十分でない場合、生菌芽胞の回収が低く、かつ生理食塩水での浮遊保存中に死滅してゆく傾向が認められた(データは示さず)。また芽胞形成が未熟な場合には調製した浮遊液の濁度が高くても生菌数が少なく、そのほとんどがデブリ(残滓)となることも経験した。これらのことから試験を実施するに当たり、安定かつ回収率の高い培養方法で芽胞を調製する必要がある。

塩素水との反応に関しては、当初初発菌数を $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml と設定していたが、炭疽菌芽胞濃度が高いと浮遊液の粘性が高まり、取扱が困難になるとともに試験の再現性が悪化することが予測された。そして 10^6 CFU/ml 以上の濃度では目視で明らかに菌の混入が確認できることから、殺菌消毒の前段階での汚染確認が可能であることも考えられ、初発菌(芽胞)数はおおよそ 10^6 CFU/ml で試験を実施することとした。

塩素に対する炭疽菌芽胞の抵抗性については、今回の検討で 50mg/L が維持されていれば 10 分以上の接触で 10^7 CFU を不活性化できることが示唆された。しかし、10mg/L では不活性化効果が極端に低下した。すなわち、10~50mg/L の間に不活性化の変曲点が存在するものと考えられた。

追補データ：炭疽菌芽胞の耐熱性試験

約 10^7 CFU/ml の炭疽菌芽胞浮遊液をシールパッキン付き 1.5ml マイクロチューブに取り、ドライバスにて 95°C 及び 100°C で一定時間加熱し、氷冷後 BPW にて 10 倍段階希釈を行い、【準備・方法】(6)の菌数測定方法に従って、生菌数を測定した。その結果、① 95°C 15 分間の処理ではおよそ 4 log 程度の不活化にとどまり、② 界面活性剤を加えての 100°C 15 分間の処理であってもおよそ 5 log 程度の不活化にとどまった。すなわち、この程度の熱処理では芽胞の不活化を完全に行うことは出来ないものと判断された。熱処理による不活化はオートクレーブによる 121°C 30 分間程度の処理が求められる（表 1）。

表 1. 芽胞の耐熱性試験

	溶液① (CFU/ml)	溶液② (CFU/ml)
加熱処理前	1.5×10^7	9.0×10^6
加熱処理後	3.1×10^3	6.9×10^2

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

ボツリヌス毒素の塩素耐性について

分担研究者 八木田健司 国立感染症研究所寄生動物部

協力研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所細菌第二部
泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部

ボツリヌス毒素によるバイオテロの起こりうる可能性を検討するために、ボツリヌス A 型毒素を通常の塩素濃度が添加されている水道水中での安定性を検査した。A 型毒素を研究所内に配管されている水に加えて、経時的に塩素濃度とマウスに対する致死毒素活性を測定した結果、塩素濃度 0.39ppm ではボツリヌス A 型毒素は速やかに不活化された。

A. 研究の背景と目的

2001 年、米国内で発生した炭疽菌によるバイオテロ事件を契機に、天然痘、ボツリヌス毒素をはじめとする生物兵器に対する対策が行われている。ボツリヌス菌の産生するボツリヌス毒素は、破傷風、ジフテリア毒素などの細菌毒素の中でも最も強力な致死性の神経毒素として知られている。ボツリヌス毒素は、*Clostridium botulinum* type A~G 菌が産生し、菌の産生する毒素は、抗原性、免疫学的な違いにより A から G 型の 8 型に分類されている。毒素は、分子量約 15 万の神経毒素と無毒成分の複合体を形成し、分子量の違いにより、LL 毒素（分子量 90 万）、L 毒素（分子量 50 万）、M 毒素（分子量 30 万）に分類される。A 型菌は 3 種類（LL,L,M）の毒素、B,C,D 型菌は 2 種類（L,M）の毒素、E および F 型菌は M 毒素、G 型菌は L 毒素を産生する。毒素をサルに経口的に投与した場合、中毒量あるいは致死量は、毒素の型により、A,B が高く、E,F,C

および D の順で感受性が低くなる成績が得られている。

毒素を産生する菌は、世界各地の河川の泥、土壌中に芽胞として存在し、菌の分離も可能である。バイオテロを想定した場合、感染経路としては、毒素、または多量の芽胞の食品、飲料水等への混入、又は噴霧によるものが考えられる。

国内ではオーム真理教によるボツリヌス毒素の噴霧が行われたとの情報もあり、今回は毒素によるバイオテロの可能性を一般上水道に限った条件で検証した。

B. 研究方法：ボツリヌス症は、発症機序の違いから、①ボツリヌス食中毒（foodborne botulism：食生ボツリヌス症）、②乳児ボツリヌス症（infant botulism）、③創傷ボツリヌス症（wound botulism）、④腸管集落形成によるボツリヌス症（child and adult botulism from intestinal colonization）の四つの病型がある。ボツリヌス食中毒は、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

ることによって発生する。創傷ボツリヌス症は、創傷部位でボツリヌス菌芽胞が発芽し、産生されたボツリヌス毒素の作用によって起こる。乳児ボツリヌス症は、乳児の腸管内でボツリヌス菌が増殖して産生された毒素によって引き起こされる。腸管集落性ボツリヌス症とは、食中毒や創傷ボツリヌス症の証拠のないボツリヌス症で、1才以上のヒトに腸管集落形成を示すボツリヌス症である。

バイオテロを想定した場合に、多数のヒトを対象とすると貯水地への毒素混入があげられるが、大量の水源への毒素量、水中での毒素の安定性等を考えると可能性としては低いことが予想される。一方、事業体、多数入居集合住宅では上水道を入水槽で貯め置き給水するシステムが導入されている。

今回、この上水道の水にサルにも感受性の高いと報告されているボツリヌス A 型毒素を混入した場合に、一定量の塩素濃度下における毒素活性の推移を検討した。

国立感染症研究所 村山分室の研究室に供給されている水に、ボツリヌス A 型毒素を 1ml 当たり 40 または 400 致死量加えた後、室温 (23-25°C) に静置した。毒素添加直後、1 時間、3 時間および 24 時間後に、塩素濃度とマウス致死活性を測定した。

塩素濃度の測定方法：

マウス致死活性の測定方法：2 倍階段希釈した毒素の 0.2ml を 2 匹のマウス (ddy/SLC, 4 週齢, 牝) の腹腔内へ注射して、生死を 4 日間観察した。水へ投与した毒素は、あらかじめ致死毒素量を測定し、理論値を計算して添加した。毒素の希釈液は、0.2W/V%ゼラチン加 0.017M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液

(pH7.0) (以後 PBS) を用いた。なお、毒素を水へ添加後は、毒素の測定・希釈に当たり、塩素の活性を抑えるために、試験管へ小分けした希釈液を氷冷して用いた。また、希釈後の毒素は、希釈後 10 分程度ですみやかにマウスに注射した。

C. 研究結果と考察：研究室内の蛇口から直ちに採取した水道水の塩素濃度は、0.39ppm であり、10 分後では 0.31ppm、1 時間後では 0.32ppm、3 時間後では 0.21ppm および 24 時間後では 0.02ppm であった。

40 マウス致死量の毒素を蛇口から採取した水道水および対照として毒素希釈液である PBS へ添加した後、直ちに 2 倍階段希釈してマウスに注射した。水道水に添加直後に測定した原液、2-16 倍希釈すべての接種マウスは、ボツリヌス毒素特有の弛緩性の麻痺は認められず、観察期間中生残した。一方、対照として PBS に毒素を加えた直後、1 時間および 3 時間後の検体を希釈して接種したマウスは、4-8 倍希釈のマウスが 1 または 2 匹麻痺症状を呈した後、死亡した。この毒素量は、1ml 当たり 20-40MLD と計算された。

添加する毒素量を 400 マウス致死量にした結果、水道水に添加した直後の検体をマウスに注射した場合、マウスは発症せず、生残した。また、対照として毒素を PBS に添加した検体では、8-16 倍希釈でそれぞれ 2 匹中 1 匹が発症死亡した。この毒素量は 400-800MLD と計算された。

今回、蛇口から採取した約 0.4ppm 塩素濃度を含む水道水中にボツリヌス毒素を添加して、経時的に毒素を測定した結果、極めて短時間

で毒素活性は失活した。事業所等の入水槽の塩素濃度も蛇口と同様の塩素濃度のために、ボツリヌス毒素を混入させた場合、蛇口へ到達する間に毒素は不活化することが予想される。

従って、市町村の貯水槽から供給される塩素添加後の水道水にボツリヌス毒素を混入して、テロの起こり得る可能性はさらに低いと予想される。

D. 研究発表

なし。

塩素濃度の測定結果

時間	水道水 塩素濃度					
	直後	12分	60分	180分	24時間	48時間
	0.39	0.31	0.32	0.21	0.02	0.02

0	0.39	40	400
1	0.39	0	0
12	0.31	0	0
60	0.32	0	0
180	0.21	0	0
1440	0.02	0	0

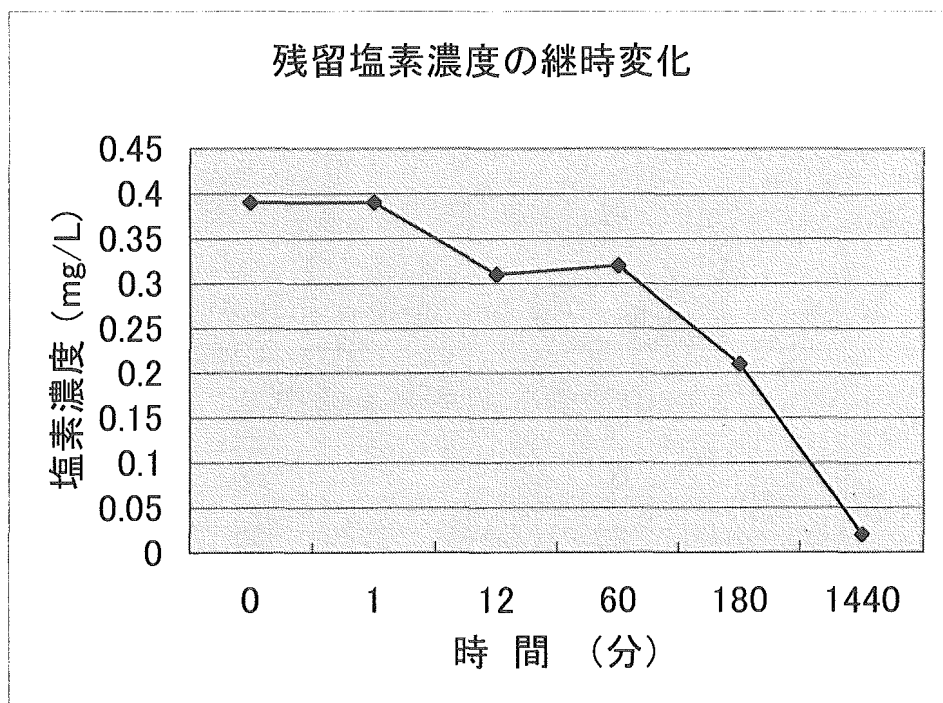


表 1 1ml当たりマウス40MLDの毒素の水道水中での安定性

		PBS 希釈倍数							水道水 希釈倍数				
分		1	2	4	8	16	分		1	2	4	8	16
直後		d1	d1	d2	d2	-	直後		-	-	-	-	-
		d1	d1	d2	-	-			-	-	-	-	-
60		d1	d1	d2	d2	-	60		-	-	-	-	-
		d1	d1	-	d2	+			-	-	-	-	-
180		d1	d1	d2	+	-	180		-	-	-	-	-
		d1	d1	d2	d2	+			-	-	-	-	-

d1:注射1日目に死亡、d2:2日目に死亡
 腹腔内に0.2ml注射
 -:無症状;+:腹部の陥没、四肢麻痺;D:死亡

結果 約40 マウスMLD/mlの毒素を、国立感染症研究所内の実験室に供給している市水に添加後、直ちに活性を測定したが、毒素活性は検出されなかった。
 一方、対照としたPBSの場合は、同じ値が3時間後まで検出された。

表 2 1ml当たり40または400MLDの毒素の水道水中での安定性

		希釈倍数 (40MLD希釈相当毒素量の確認)				
分		1	2	4	8	16
直後		d1	d1	d2	d2	d2
		d1	d1	d2	-	-

		水道水(40MLD添加) 希釈倍数				
分		1	2	4	8	16
直後		-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-

		水道水(400MLD添加) 希釈倍数				
分		1	2	4	8	16
直後		-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-

d1:注射1日目に死亡、d2:2日目に死亡
 腹腔内に0.2ml注射

結果 約400 MLD/mlの毒素を、国立感染症研究所内の実験室に供給している市水に添加後、直ちに活性を測定したが、毒素活性は検出されなかった。

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

水を標的としたテロの歴史的背景

分担研究者 金子 光美 摂南大学工学部

1. まえがき

ある物質を用いるテロリズム(以下テロ)の原型は紀元前からあったようである。BC 6世紀にアッシリアの軍隊が井戸に毒角を投げ込んだり、クリッサ朝時代には下剤性の薬草を使用したと言われる。微生物及び化学兵器使用の原型と言ってよい。その後、主として陸上用として生物及び化学物質兵器は発達し、時として使用することがたびたび起きている。一方、水の量的利用被害として、物理的な破壊も古くから見られる。この場合は、自分が水を欲しい場合と相手に水を与えないことを目的とする場合がある。わが国だけに限っても水争いは農業水利をめぐる血の雨が降ったことはよく知られている¹⁾。これは自分が水が欲しい場合であり、わが国の水争いはほとんどこれであるが。外国でも 1503 年にピサとフローレンスの争いでピサからアモ川を分離するレオナルドダビンチ・マキアベリのプランがあった²⁾。

このように争いで水を狙う場合、相手の生命・生活を混乱させる攻撃手段として水を狙う場合と資源として水を確保しようとする場合がある。前者の場合はさらに生物あるいは化学物質を投入して水を汚染させる場合と施設を破壊して物理的に水の利用を不可能にする場合がある。

2. テロとは何か

相手を攻撃する形式であるテロと戦争の区別をしにくい場合が多い。テロリズムを「目的」のために、暴力あるいは何らかの脅威を与える行為とすると、この目的に政治、宗教、遊びなどがある。また目的を持っている場合でも正面切って争う場合はテロではないとしても、何を以って「正面切って」と言うのか難しい。昨年の米国の同時多発テロも政府の宣戦布告はないけれど、攻撃すると公言されていた。と言う事は国間の正式な宣戦布告がない非政府組織の攻撃に限定すべきか。しかしブッシュ大統領は同時多発テロを受けた直後に「これは戦争である」とテレビを通じて語っていた。戦争時に小部隊で攪乱戦法を取る場合は一般にゲリラという。

テロと感知されるのは攻撃される側が通常に生活する一般市民であり、争うために準備や武装をしていない集団であると言ってよい。もっとも第2次世界大戦においてわが国が焼夷弾攻撃を受けた場合は、被害はほとんど一般市民であるがテロ攻撃とは言われない。それは宣戦布告した戦争であるからである。多くの民族紛争に見られるように、軍隊ではなくても一般市民が敵意を剥き出しにした争いは戦争と言ってよい。