

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書

動物由来感染症レファレンスセンター 平成30年度活動報告

研究分担者 森川 茂 獣医科学部長

研究協力者 井上 智 獣医科学部 第二室長
奥谷 晶子 獣医科学部 主任研究官

研究要旨 炭疽菌の遺伝子検出（conventional PCR）について外部品質保証（EQA）を行った。計37箇所の地方衛生研究所に各検査に必要な試薬、陽性および陰性対照、模擬検体ならびにSOPを送付し、各機関における検査結果を集計した。遺伝子検出では機関間で感度に1,000倍の差が認められたが、全ての参加機関が模擬検体から適切に遺伝子検出可能であった。検出感度を算定した結果、芽胞に換算すると芽胞100個にあたる核酸濃度があれば、炭疽菌核酸の検出、判定が可能と考えられた。これらの成績から、炭疽菌の検査は殆どの地方衛生研究所において適切に実施可能と考えられた。

A．研究目的

本研究班の目的は、衛生微生物協議会の動物由来感染症レファレンスセンターに所属する7地方衛生研究所（山形県、東京都、愛知県、京都府、広島県、徳島県および長崎県）において、重要な動物由来感染症に関して検査法、検出法等の標準化を行うことである。一昨年度は、野兔病について凝集反応試験による血清学的検査、16srRNAおよび*fopA*領域を増幅させるPCR法による野兔病菌特異的遺伝子配列の検出および判定を、7地方衛生研究所を含む24地方衛生研究所を対象に実施し、血清学的検査および遺伝子検査が適切に実施可能であることを確認した。昨年度は、ブルセラ病の血清学的検査および遺伝子検査の外部品質保証（EQA）を実施し、7地方衛生研究所を含む21地方衛生研究所で、ブルセラ病の血清疫学が実施可能であることが明らかとなった。本年度は7地方衛生研究所へのアンケート調査の結果、炭疽菌の検査に関するEQAを行うこととなった。

炭疽菌は一般に培養検査や遺伝子検出の

結果から診断される。国立感染症研究所では炭疽菌の行政検査として、羊血液寒天培地を用いた培養試験並びに、毒素遺伝子*pag*および莢膜遺伝子*capB*を増幅させるPCR法による炭疽菌特異的病原性遺伝子配列の検出および判定を実施している。

以上のように国内の炭疽菌検査法について、本年度7月に開催された衛生微生物協議会にて説明し、EQAへのアドホック参加を募ったところ、レファレンスセンターに所属する7地方衛生研究所の他、あわせて37機関でEQAを実施することとなった。

B．研究方法

炭疽菌検査 EQA

1. 遺伝子検査

1-1. 供試菌株について。

炭疽菌は臨床分離株 BA103 株を、陰性対照(明示しない)用のセレウス菌は GTC2903 株を使用した。BA103 株は、病原性プラスミド pXO1(*pag* 遺伝子をコード)および pXO2(*cap* 遺伝子をコード)の保持を確認済

みである。- 80 芽胞液ストックを LB ブロスに懸濁して、37℃一晩好気培養した。芽胞数を計測するために培養液から 10 倍階段希釈液(10^{-1} から 10^{-5})を作成し LB 寒天培地に塗沫 37℃一晩好気培養後、コロニー数を計測した。同じ培養液を 50ml × 2 本の LB ブロスに 100 分の 1 量(500uL)添加し、37℃一晩好気培養を行い DNA 抽出した。

DNA 抽出は培養液 50ml × 2 本の遠心後のペレットに Lysis Buffer (0.2% SDS、1.2% Triton、2mM EDTA pH 8.0、20mM Tris HCl pH8.0)、lysozyme 処理、proteinase K 処理後、フェノール・クロロフォルム処理を 2 回を行い、エタノール沈殿で精製した。抽出した DNA は TE buffer に懸濁した。処理後の DNA 溶液に感染性の芽胞が混入していないことを確認するため DNA 溶液 10uL を羊血液寒天培地にスポットして 37℃で 7 日間培養し、コロニーが発育しないことを確認した。

DNA 溶液の 10^{-1} から 10^{-7} 階段希釈液を作成して検査用 DNA とした。また、明示しない陰性対照としてのセレウス菌 DNA も同方法で抽出し、DNA 溶液原液を同様に検査用 DNA として配布した。

低濃度の DNA の分解を防ぐため、キャリア DNA として断片化鮭精子 DNA(10ug/uL 相当)を加えて - 20℃で 7 日間保管後の DNA を用意した。DNA を template とした *pag* 遺伝子および *cap* 遺伝子の検出 PCR を病原性検出マニュアルのプロトコール通りに行い、各 DNA の安定性を事前に確認した。

2. 粉検体を想定した閉鎖系(グローブボックス)を用いた検査マニュアルの配布および意見聴取

炭疽菌芽胞の混入した粉検体からの DNA 調製、培養試験を安全に行うための検査マニュアル試案を作成した。安全キャビ

ネット内で簡易グローブボックスを使用した方法を提案し、参加機関からの質問や要望を受け付けた。また疑似芽胞検体として市販の枯草菌芽胞液(栄研化学)を配布し、各機関での模擬訓練用の検体としての使用(任意)を依頼した。

3. 参加衛生研究所への検体送付および検査成績のまとめ

参加衛生研究所へは各希釈 DNA 溶液、PCR 用プライマー、および陰性対照セレウス菌 DNA、陽性対照 DNA を梱包し、冷蔵宅急便にて送付した。各施設で行った PCR の結果については成績を記載した PDF ファイルの作成とメール送信(あるいは郵送)による回答を依頼した。

C. 研究結果

1. 遺伝子検査 参加衛生研究所の検査成績

各施設での成績は一覧にまとめた(表 1)。使用したサーマルサイクラーおよび DNA ポリメラーゼも複数の組み合わせが報告された。検出限界の濃度は施設間で差がみられた。*pag* 遺伝子、*cap* 遺伝子ともに施設により芽胞数に換算すると 1 個から 100 個の検出限界を示した。また、*pag* 遺伝子をコードする pXO1 と *cap* 遺伝子をコードする pXO2 で検出限界に差がみられた。また、*pag* 遺伝子の増幅では、陰性対照であるセレウス菌で非特異的なサイズでの PCR 増幅が一部の機関で確認された。

2. グローブボックスによる粉検体からの検査試料調製について

参加機関からは

➤ グローブボックスの使用場所の選定基準について、安全キャビネットが使用できない場合の個人防護衣(PPE) につい

て

- 粉検体の静電気防止用器具の選定基準、入手方法について
- 試料調製後の残余検体の取り扱い方法について

質問があった。

また、試案マニュアルによる模擬訓練の実施の要望があった。

D．考察

各参加機関の間でみられた conventional PCR 検査系での検出限界の差は、使用したサーマルサイクラーの違い、低濃度 DNA での増幅に影響する要因（例えば使用酵素の活性や PCR 反応条件の違い）、増幅産物の確認方法によるものと考えられる。

今回、施設間で検出限界濃度の差が認められたものの、炭疽発症患者あるいは動物由来の検体中には非常に多くの炭疽菌(通常 10^6 CFU/ml 以上)が存在していることから考察すると、これらの検体からの検査においては、今回検証された検出限界の検査系で検出は可能であると考え。過去に生物テロで使われた芽胞粉末（いわゆる白い

粉)の場合も一定数以上の芽胞個数が含まれることが見込まれるため、PCR 検査系としてはどの機関も十分な検出限界を有していると考え。

E．結論

今回参加した各地方衛生研究所の conventional PCR 検査系で示された検出限界は、現在想定される炭疽菌検体の検出に有効な範囲であることが示された。

F．健康危険情報 該当なし

G．研究発表 論文発表 なし

学会発表 なし

H．知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1．特許取得

該当なし

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし

表 1) 炭疽菌*pag*遺伝子/*cap*遺伝子のconventional PCRの検出限界濃度

参加機関数別の検出限界 (DNA 希釈濃度)

標的遺伝子	10 ⁻⁵ 希釈	10 ⁻⁶ 希釈	10 ⁻⁷ 希釈
<i>pag</i> 遺伝子	3	17	17
<i>cap</i> 遺伝子	3	15	19