

平成28-30年度
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28-30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	今岡 浩一	獣医科学部 第一室長
	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
	堀田 明豊	獣医科学部 主任研究官
	藤田 修	獣医科学部 主任研究官

研究要旨

平成28年度から30年度において、動物由来感染症レファレンスセンターでは下記の項目について

- (1)野兔病菌の抗体検査・PCR検査のEQA
- (2)ブルセラ症の抗体検査・PCR検査のEQA
- (3)炭疽菌のPCR検査のEQA

を地方衛生研究所等で実施し、成績をまとめ問題点を確認した。

各年度における検査における検出感度は全参加機関において概ね良好であり、地方衛生研究所等において野兔病菌、ブルセラ症、炭疽菌の検査が可能であることが明らかとなった。

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。

対象とする疾病は複数該当するが、平成28年度から平成30年度においては、

- 野兔病について凝集反応試験による抗体検査および16S rRNA領域と野兔病菌特異的領域を標的とした遺伝子検査
- ブルセラ症について凝集反応試験による抗体検査および遺伝子検査による菌種同定

- 炭疽菌について炭疽菌特異的病原性遺伝子である *pag*、*cap* 遺伝子の検出

を目的とした外部品質保証を行い、地方衛生研究所等における検査成績の評価および信頼性の向上について検証した。

B．研究方法

1. 野兔病菌検査

1. 血清学的検査（微量凝集反応）

フォルマリン不活化野兔病菌（Yama株）抗原液、抗原染色液（サフラニン溶液）、陽性対照ウサギ血清、陰性対照ウサギ血清および擬似3検体をEQA参加地方衛生研究所に冷蔵送付した。また野兔病の行政検査に使用している検査手順書（SOP）も配布した。擬似3検体No.1、2および3の内容

はそれぞれ陽性対照ウサギ血清とウマ血清を、1:33、1:3、1:15の比で混合した。各機関にて送付した陽性対照ウサギ血清を陽性対照(強)、陽性対照ウサギ血清と陰性対照ウサギ血清の7:1の混合液を陽性対照(弱)として供試した。ピペット、チップ、96穴プレート、インキュベーターなどは各機関所有の物品を供試した。各機関はSOP通りに必要事項を記入しながら対照3検体と共に、模擬3検体の凝集力価を測定し、反応像を写真撮影した。これら試験結果は国立感染症研究所獣医科学部に集計された。

2. 遺伝子検査 (conventional PCR)

16srRNA および *fopA* 領域増幅用プライマーセット、陽性対照野兔病菌核酸 (LVS由来 100pg/μl) および擬似3検体(各100pg/μl)を国立感染症研究所で実施している野兔病の行政検査用のSOPと共にEQA参加地方衛生研究所に冷蔵送付した。擬似3検体No.1、2、3の内容は、*Francisella novicida* U112株由来核酸、*Francisella philomiragia* 029株由来核酸、*Wolbachia* sp. 由来核酸とした。ピペット、チップ、サーマルサイクラー、電気泳動装置、撮影装置などは各機関所有の物品を供試することとした。各機関はSOPに従い、陽性対照核酸を10倍段階希釈し、各PCR系における検出感度を確認した。また、擬似3検体について、PCRによる16srRNAおよび*fopA*領域の増幅の有無と、およその分子量を電気泳動により確認した。配布したSOP通りに必要事項を記入し、泳動像などの写真とともに結果を国立感染症研究所獣医科学部に報告した。

2. ブルセラ症検査

1. ブルセラ症検査 EQA

表1に示す21地衛研から参加希望があった。参加希望地衛研に対して、ブラインド検体および凝集反应用菌液、試薬、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads、試験管など感染研の方法で実施するのに必要な物を送付した。実施方法については、感染研で実施しているSOPに準じた実施手順書を作成し、これに沿って実施し、結果を報告することを求めた。

なお、実施内容は以下の通りである。

2. 抗体検出

ブルセラ病診断用菌液 (*B. abortus* 用: 農業・食品産業技術総合研究機構、*B. abortus* 99もしくは125株 (*B. melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125)の加熱死菌液))を用いた試験管凝集反応により実施した。方法は、抗原添付のプロトコル(感染研SOPも同じ)に従った。

検査検体には適宜希釈したウサギ免疫血清 (TAT-1: *B. suis*、TAT-2: *B. canis*、TAT-3: *Yersinia enterocolitica* O9、TAT-PC: *B. abortus*)を用いた。なお、*Y. enterocolitica* O9のLPSは家畜ブルセラ菌と相同性が高いことから、当該免疫血清は家畜ブルセラ属菌に交差反応する。今回はその事象を経験してもらうために検体の1つに加えた。ただ、現実的には、臨床症状がブルセラ症とは異なるので、検査診断上問題になる懸念はないと思われる。

3. 遺伝子検出

遺伝子検出については次の5つの検討を実施した。1)感染研の方法(puReTaq Ready-To-Go PCR Beads使用)での実施、2)各地衛研にて通常使用しているDNA Polymeraseを使用して実施、3)血清からのDNA抽出とPCRによる同定、4・5)感染研および各地衛研の方法で検体希釈列を用いた検出限界の検討、である。

1~3)のPCRでは、4セットのプライマーに

よる増幅パターンの違いから、ヒトに感染しうる主要 4 菌種の鑑別同定ができるかどうかを実施、検証した。4・5)では、*bcs31*-PCR のみ実施した。

検査検体は、1・2)の PCR では、# 1: *B. abortus*、# 2: *B. melitensis*、# 3: *B. canis*、# 4: *Streptobacillus notomytis*、# PC: *B. suis* より抽出した DNA (1ug/ml)を用いた。また、3)のスパイクテストは、FBS に *B. abortus* 死菌体を添加した物を使用した。4・5)は、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ng/ul (# 1~7)の *B. abortus* および DW (# 8)を8連 PCR チューブに入れた物を用いた。どのプライマーや検体も、ロット差をなくすために、1つのチューブでまとめて作成し、これを各地衛研用に小分けした。

3.炭疽菌検査

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。

C . 研究結果

1. 野兎病菌検査

1.血清学的検査 (微量凝集反応)

配布した抗原液の OD₅₆₀ 値は測定機器を有す 11 地方衛生研究所において 0.94~1.3 であった。全 24 機関で使用された 96 穴ブ

レートは品番不明も含め 16 種以上であった。各機関における凝集力価は陽性対照(強)が 320 または 640 倍、陽性対照(弱)が 40 または 80 倍、陰性対照は全てで 10 倍未満であった(図 1)。擬似検体 No.1 は 10 倍未満が 1 機関、10 倍が 12 機関、20 倍が 10 機関、40 倍が 1 機関と異なった。擬似検体 No.2 は 80 倍が 18 機関、160 倍が 6 機関、擬似検体 No.3 は 20 倍が 13 機関、40 倍が 11 機関であった(図 2)。報告された SOP を確認したところ、不鮮明さにより、凝集の有無の判定の正確性が確認できない写真がいくつか確認された。

2. 遺伝子検査 (conventional PCR)

全 24 地方衛生研究所における 16srRNA を標的とした PCR の感度は 1pg-1fg/μl (10^{-2} から 10^{-5} 希釈) 以上で、*fopA* では 10pg-10fg/μl (10^{-1} から 10^{-4} 希釈) 以上であった(図 3)。擬似検体における 16srRNA および *fopA* を標的とした PCR の結果は、No.1 が+/+, No.2 が+/-、と全 24 機関が同じ結果であったが、No.3 については 23 機関が-/-、1 機関が-/+であった(表 1)。擬似検体 No.3 が-/+と報告した機関は再検査においても同じ結果であり、反応酵素として Fast PCR 用酵素を使用していたことがわかった。また多くの機関が SOP に遺伝子増幅の有無を記載するのみであり、2 つの PCR の結果から想定される各擬似検体に含まれる菌種について記述していた機関は少なかった。全機関で 6 種の反応酵素が使用されていて、Takara 社の ExTaq HS および ExTaq がそれぞれ 11、10 機関と多かった。PCR 産物の電気泳動には 4 機関が既成のゲル泳動システムを利用していた。

2. ブルセラ症検査

2. 1. 実施状況

参加希望の 21 地衛研のうち、1 機関で、当該地衛研で通常使用している DNA polymerase を用いた検討が未実施だったが、それ以外の機関および検査に関しては、全て実施され、結果が報告された。

2. 抗体検出(表 1)

1 地衛研で、陽性となるべき検体 (TAT-1) が陰性であり、TAT-PC の価も 40 倍と低くなっていた。また、別の地衛研で TAT-PC が 640<と高くなっていた。それ以外については、ほぼどの地衛研も想定していた結果が得られた。ただ、検査は 10~640 まで、7 試験管を用いて行われている。そのため、最終の試験管で陽性の場合には 640<、陰性の場合には 320 となる。9 地衛研で 640 と判定していたが、今回の検査では、640 の判定は不可能で、これは 640<としなくてはならない。その他、抗体価を、最終陽性となった試験管の次の倍率で提示している 1 地衛研があった。このように、21 地衛研のうち、10 地衛研で判定方法に誤りが見られた。

3. 遺伝子検出

1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) および 2) 各地衛研の DNA Polymerase を使用して実施、いずれの方法でも正しく菌種の同定がなされていた。また、3) 血清からの DNA 抽出と PCR による同定でも、菌種の特定がされており、いわゆる定性試験は問題なく実施されていた。

4・5) の、感染研および各地衛研の方法による検出限界の検討では、各地衛研間での感度の差が大きく認められた(表 2)。ただ、それぞれの地衛研内では、RTG-PCR beads やその他 DNA polymerase による感度の違いは少なく、使用するサーマルサイクラーやアガロースの組み合わせの違いによると推測される。

そこで、各地衛研で使用している機器、試薬等を表 6 にまとめた。サーマルサイクラーは、

ABI Veriti が最も多かったが、使用機器は5メーカー、13機種にも及んだ。アガロースも多くの種類が使用されており、さらに、標的増幅産物のサイズ(今回は 186-249bp)が小さいにもかかわらず、1,000bp 以上の分離に適している Agarose L03 を使用するなど、不適切なアガロースの選択が多く認められた。染色については、エチジウムブロマイドを用いた後染色が多かった。

通常、地衛研で使用している DNA polymerase や DNA 抽出キットは、機器やアガロースの多様性と異なり、Takara Ex Taq、Qiagen QIAamp DNA Mini Kit が大半を占めた。

3. 炭疽菌遺伝子検査

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

1. 野兎病菌について

回収した SOP と検査結果を確認したところ、使用した試薬などのメーカー名、品番、開封日などに記入不備が多かった。また凝集反応の結果の写真は、解像度やピント等の調整不備により、凝集像確認には不適であった。PCR の泳動像データは泳動装置など使用している機器の相異により、機関間で異なったが、全て鮮明であったことから、検査者の幾人かは専用の撮影装置以外の検査結果の写真撮影に不慣れであったと考えられた。今後、EQA 実施時には SOP への記入例や結果報告方法についての説明書を配布する必要があるだろう。

血清学的検査については、低力価の模擬検体 No.1 が 10 倍未満～40 倍と機関間で異なった。40 倍とした 1 機関は 96 穴プレートに一般的なポリスチレン製とは異なるポリエチレンテフタレート製を使用していたため、プレートの材質の違いが凝集反応に影響した可能性がある。本 EQA では使用プレートは指定しなかったが、今後プレートの材質の凝集反応の結果への影響を確認する必要があるかもしれない。一方、野兎病の血清診断において単一血清で陽性と判断される 80 倍以上の凝集力価を有す擬似検体 No.2 と、それを 4 倍希釈した擬似検体 No.3 の凝集力価が機関間で大きな差がなかったことから、野兎病の血清診断は参加全期間で適正に実施可能と考えられた。

PCR における感度が 24 地方衛生研究所間で 1,000 倍異なった事は、使用酵素やサーマルサイクラーの性能、検査者の手技の相異などに起因する可能性がある。検体の核酸濃度が少なくとも 10pg/μl (600 copies/μl 相当) 以上であれば、適正に検出可能と考えられたため、今後、病原体の核酸精製や核酸の濃度測定についての EQA を実施する必要があるかもしれない。

Francisella 属菌に最も近縁とされる *Wolbachia* の核酸 (擬似検体 No.3) から *fopA* 領域を増幅させる PCR にて野兔病菌と同程度の分子量の PCR 産物が増幅された原因は不明だが、当該機関のみが Fast PCR 用の酵素を使用し、一般の酵素用のプログラムで反応させていたことが一因と考えられる。今後、擬似検体 No.3 から増幅された遺伝子産物のシーケンス解読などの検証を試みたい。いずれにしる 16srRNA と *fopA* を標的とした PCR では、+/+の場合、*F. tularensis* または *F. novicida*、+/-の場合、*F. tularensis* と *F. novicida* 以外の *Francisella* 属菌、-/-の場合、*Francisella* 属菌以外の菌と判定され、-/+の場合は判定不能となり、再検査を要する。本 EQA において、PCR の結果から検体の菌種判定を記述した機関は少なかった。このため各検査者に検査の目的と結果の意味について十分理解してもらう必要がある。今後、病原体検出マニュアルや SOP の改変時には、明快な説明や、PCR の結果からの菌種の判定の記入欄を追加するなどして改善するべきである。

近年、血液培養機器などにより野兔病菌以外の *Francisella* 属菌など、病原性や増殖性が乏しい環境菌が臨床検体から偶発的に分離されることがある。本 EQA の実施により多数の自治体において病院検査室などで

認められた野兔病菌疑い菌のスムーズな確認検査が可能となるだろう。

2. ブルセラ症について

感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地衛研でブラインド検体を用いた検査 (抗体検査:TAT、遺伝子検出:PCR) について、外部精度管理 (検査法・手技等の検証) を実施した。

現状、抗体検査については、市販の抗原菌液を使用して実施することも可能だが、民間の臨床検査センターにおいて保険診療に基づく検査を実施しているので、医療機関から当該センターに検査依頼することができる。そのため、我々 (国立感染症研究所獣医科学部) は、医療機関等からの問い合わせの際には、通常は、民間の臨床検査センターに抗体の検査依頼をするよう伝えている。結果、大半のケースで、抗体が検出されず、その時点でブルセラ症が否定される。ただし、1) 検査センターでの抗体検査の結果が陽性であった、2) 菌 (未同定) が分離された、3) 患者背景 (流行地域出身の外国人、流行地への海外渡航歴、臨床症状等) からブルセラ症が強く疑われる、などの場合については、原則、行政検査として、抗体検査および菌の分離培養、菌の同定検査を受けることとしている。今回は、ブルセラ症では診断意義がきわめて大きい抗体検査について、その原理と方法を理解してもらうために EQA 実施項目に入れた。結果、手技については、1 地衛研を除き問題は無いと考えられたが、抗体価の判定方法に誤りが認められた地衛研が半数近く認められ、フォローが必要である。

遺伝子検出については、特に定性試験に関しては、問題なく実施されたと思われる。ただ、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間でまちまちで、場合によっては、感度や特異性

に影響を及ぼすことが推測された。行政検査対象項目に関しては、結果の共有を行うためにも、可能な限り使用機器やアガロースについて、地衛研間で統一を図ることが望ましいと考えられた。

3.炭疽菌検査について

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える。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、First screening としての 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える。

E . 結論

平成 28 年度から 30 年度にかけて行った野兔病、ブルセラ症、炭疽の EQA の結果、各地方衛生研究所においては、各病原体で必要な血清学的検査および遺伝子検査のいずれも実施可能であり、検査成績についても問題なく評価可能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

1. Yamamoto K, Kato Y, Mutoh Y, Kutsuna S, Imaoka K, Ohmagari N. Photo Quiz: A Traveler from Africa with Fever and Aggravated Chronic Back Pain. Clinical Infectious Diseases, 66(5):805-807, 2018
2. 今岡浩一. ブルセラ症. in: JBSA ニュースレター, 日本バイオセーフティ学会, 7(1): 7-13, 2017

学会発表

1. 今岡浩一. 教育講演9:ブルセラ症とバイオセーフティ. 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 岐阜, 2018年2月

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

1. 野兔病検査結果

表1 遺伝子検査における疑似検体の結果分布と解釈

疑似検体 No.	PCRの結果		回答 地衛研数	結果の解釈
	16srRNA	<i>fop A</i>		
1	+	+	24	<i>F. tularensis</i> まは <i>F. nvicida</i>
2	+	-	24	<i>F. tularensis</i> 、 <i>F. nvicida</i> 以外の <i>Franseilla</i> 属
3	-	-	23	<i>Franseilla</i> 属以外
	-	+	1	判定不能、再検査

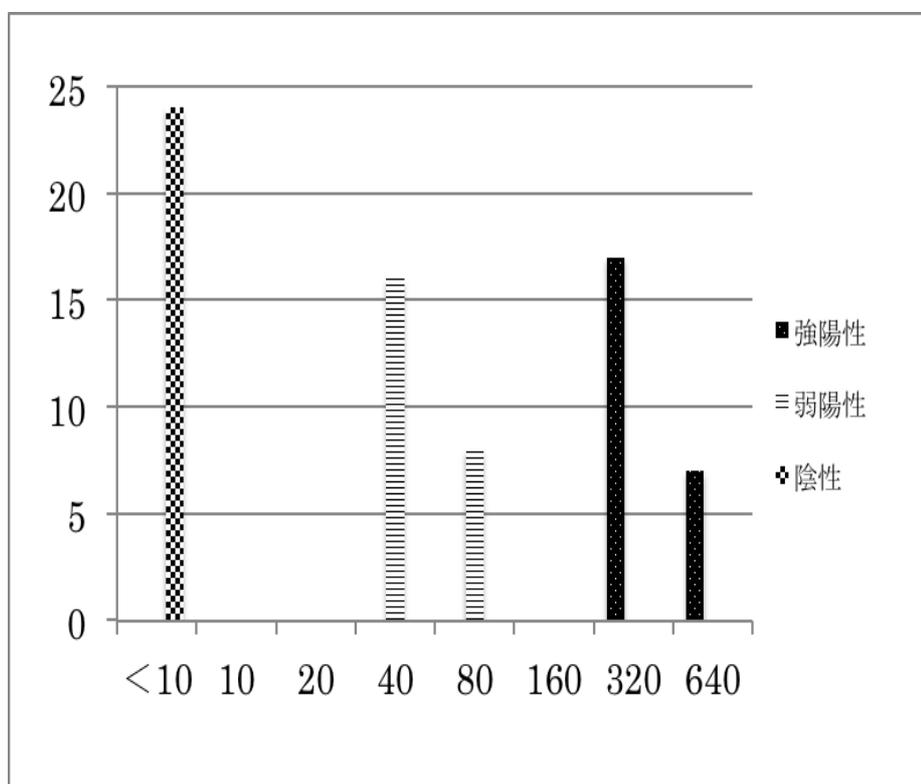


図1 抗野兔病菌対照血清の凝集力価の差（縦軸：地方衛生研究所数、横軸：凝集力価）
陰性対照は全機関が10倍未満と判定し、陽性対照（強および弱）の凝集力価は1管の差であった。

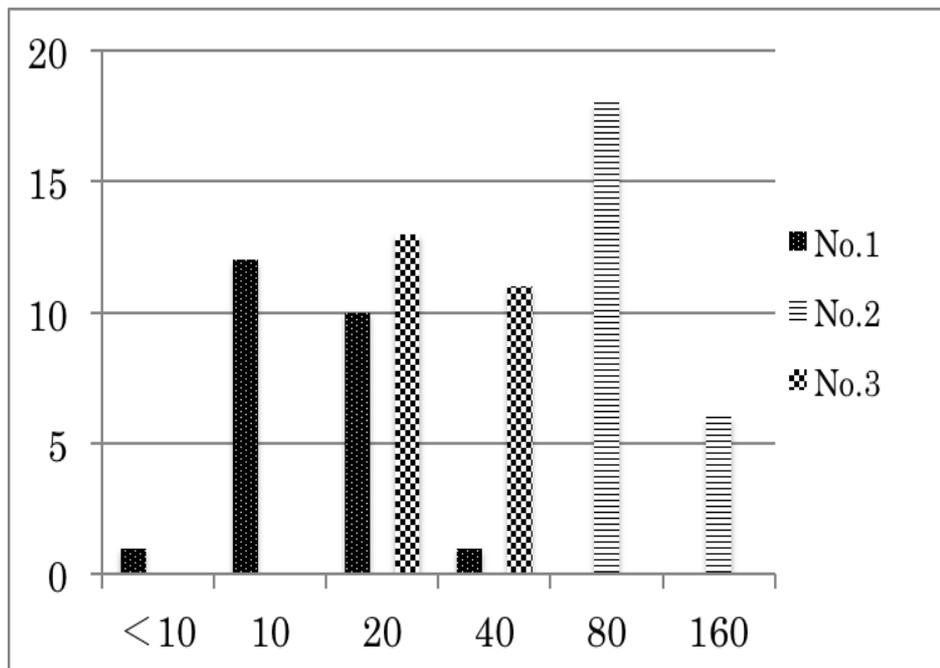


図2 血清学的検査用擬似3検体の凝集力価(縦軸:地方衛生研究所数、横軸:凝集力価)
 低力価の擬似検体No.1は機関間で差があったが、擬似検体No.2および3では差は1管であった。

2. ブルセラ症検査結果

表1.) 各地方衛生研究所における抗体検査結果

	1	2	3	PC
<10	1	20		
10		1		
20				
40			4	1
80			15	
160			2	14
320	3			5
640	9			
640<	8			1

表2.) 各地方衛生研究所におけるPCR検出感度検査結果

#	3	4	5	6	7
RTG	1	7	6	4	2
他*)	1	8	4	5	1

*) 1地研未実施

3. 炭疽菌検査結果

表1) 参加37機関における炭疽菌*pag*遺伝子/*cap*遺伝子のconventional PCRにおける検出限界濃度

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