

迅速性とバイオセーフティを考慮した炭疽診断導入の検討

長崎県川棚食肉衛生検査所 ○吉川亮、嶋田育美、樋渡佐知子

長崎県諫早食肉衛生検査所 中島芳恵、寺道拓郎

長崎県諫早食肉衛生検査所国見支所 須田龍介（現、長崎県県央保健所）

はじめに

昨年度の本研究発表会において、誤診断防止可能な PCR（増幅サイズが異なる遺伝子組換え陽性対照 DNA の活用）による炭疽菌遺伝子検出による診断系を報告した[1]。

今回、本県の検査マニュアルに記載された炭疽検査手順を見直すことを目的に、上記診断系の前段階となる前処理および DNA 抽出について、迅速性および安全性等を念頭において臨床検体からの炭疽菌遺伝子の抽出方法を確立するとともに、各所（当所、諫早食肉衛生検査所および国見支所）で当該方法を試行し、導入の可否を検討した。

材料および方法

既報[1]の炭疽菌遺伝子を検出する PCR について、各所での導入を評価する特異性試験および感度試験、ならびに臨床検体から炭疽菌遺伝子を検出する方法および安全性等を検討する添加回収試験を以下のとおり実施した。

1 特異性試験

各所で当該 PCR の動作確認を実施するため、炭疽菌 *Bacillus anthracis* ワクチン株（34F2 株：荚膜遺伝子（以下、*cap* 遺伝子）なし）と弱毒株（Davis 株：毒素遺伝子（以下、*pag* 遺伝子）なし）の 2 株、炭疽菌と同属の *Bacillus* 属のセレウス菌 *B. cereus*、*B. mycoides* および枯草菌 *B. subtilis* の 3 菌種の計 5 種類の DNA を用い、国立感染症研究所（以下、感染研）の炭疽検査マニュアル（第 3 版）[2]に準拠して PCR を行い、特異性を確認した。プライマーセットは表 1 に示す。

< 表 1 > 使用するプライマーセット（2 種類）

Target genes	primers name	Sequences (5' -3')	Products size (PC size)
荚膜遺伝子	CAP1234	CTGAGCCATTAATCGATATG	846 bp
<i>cap</i> gene	CAP1301	TCCCACTTACGTAATCTGAG	(720 bp)
毒素遺伝子	PA5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	596 bp
<i>pag</i> gene	PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	(322 bp)

また、陽性コントロール（PC）は既報[1]のとおり交差汚染防止のため感染研より分与された遺伝子組換え陽性対照 DNA（*cap* 遺伝子および *pag* 遺伝子の PCR 増幅産物はともに小さくなる：表中下線部）を使用した。

2 感度試験

実施者間および各所の機器の違いによる影響を確認するとともに、添加回収によるロスを把握するため、炭疽菌 34F2 株ストック原液 (1.07×10^8 cfu/mL) を 10 倍段階希釈し、原液から 10^8 倍希釈した菌液からそれぞれ抽出した DNA を用い、PCR の検出限界を *pag* 遺伝子で確認した。今回は炭疽菌 Davis 株が使用できなかったため PCR は *pag* 遺伝子のみ実施した。

3 添加回収試験

臨床検体から炭疽菌を直接検出する診断系を確立するため、臨床検体（血液 900 μ L および滅菌 PBS (-) 700 μ L に脾臓 200 mg 添加したもの）に炭疽菌 34F2 株の原液（栄養型： 1.07×10^8 cfu/mL もしくは芽胞菌： 1.79×10^8 cfu/mL）および原液を 10 倍～ 10^8 倍希釈した菌液を 100 μ L 添加し、前処理（100°C、15 分加熱処理後、破碎処理を行い、12,000 rpm で 3 分遠心）した上清 200 μ L から DNA 抽出キット（QIAGEN、DNeasy Blood & Tissue Kit）により添付プロトコルに準拠して DNA を抽出後、これら抽出 DNA を用いて PCR を実施し、感度試験と同様に検出限界を *pag* 遺伝子により確認した。

また、前処理段階における安全性および操作性等を向上するため、加熱および破碎処理による炭疽菌不活化について併せて検討した。

成 績

1 特異性試験

実施者 5 名は炭疽菌に特異的な *pag* 遺伝子および *cap* 遺伝子を問題なく検出した。

2 感度試験

実施者 5 名は $10 \sim 10^4$ cfu/mL 相当となる菌量の DNA から *pag* 遺伝子を検出した。

3 添加回収試験

今回検討した臨床検体からの炭疽菌遺伝子検出方法（加熱と破碎処理後、抽出キットによる DNA 抽出、既報[1]の PCR による遺伝子検出）により実施者 5 名において添加菌量 100 μ L の血液で $10^2 \sim 10^7$ cfu/mL、脾臓で $10^3 \sim 10^6$ cfu/mL 相当、すなわち血液では $10 \sim 10^6$ cfu/mL、脾臓では $10^2 \sim 10^5$ cfu/mL 相当となる *pag* 遺伝子が検出された。

また、加熱等の前処理により栄養型は原液（ 1.07×10^8 cfu/mL）、芽胞は原液（ 1.79×10^8 cfu/mL）の 10 倍希釈まで不活化された。

考 察

1 特異性試験

各所の異なる機器等の条件においても既報[1]の PCR が実施可能であること、および PCR の経験が異なる職員においても実施できたことから、当該 PCR は各所で炭疽診断に活用できることが確認された。

2 感度試験

炭疽発症患者もしくは発症動物では、通常 10^6 cfu/mL 以上の菌量 [3] であることから、各所において実施した既報 [1] の PCR は臨床検体から十分に検出可能な検出感度を保持していることが確認され、各所において導入の可能性が示された。一方で検出感度に想定 (10~100 倍差) 以上の差がみられたが、これは実施者の手技 (経験の差)、機器の違い、使用した DNA の保存状態の悪化等複数の要因が考えられ、導入を否定するまでの要因にはならないと判断した。

3 添加回収試験

今回検討した前処理および DNA 抽出方法は検出限界にはバラツキがみられるものの、概ね臨床検体 (血液および脾臓) から十分に検出可能な検出感度であることから、臨床検体からの炭疽菌遺伝子の抽出方法を確立できたと判断した。また、使用機器等の異なる各所においても実施可能であることが証明された。検出限界のバラツキは感度試験同様の要因が考えられ、特に破碎処理工程の影響は大きいと推察された。

さらに、前処理の工程により炭疽菌が不活化されることが確認されたことから、処理後は感染防御および汚染拡大防止について過度な対応をすることなく、安全かつ簡易に取り扱いができ、迅速かつ簡便に処理することが可能となった。

まとめ

昨年度報告した PCR [1] を含め、今回検討した臨床検体からの DNA 抽出は、と畜場における炭疽診断に十分に耐えうるものと考えられ、迅速性および安全性の観点からも有用である。特に判定に数日要する現行法に比べ、4~5 時間程度判定できる当該方法は、と畜場の再開に向けた消毒を早期に開始ができるメリット等は非常に大きいと考えられる。また、各所においても実施可能であることが証明されたことから、本県検査マニュアルの炭疽検査手順について今年 2 月に改定を行った。

引用文献

- 1) 中島芳恵, 吉川亮: 遺伝子組換え陽性対照 DNA による誤診断防止可能な炭疽菌遺伝子検出 PCR の導入, 令和元年度第 48 回九州地区食肉衛生検査所協議会大会誌, 101-102 (2019)
- 2) 奥谷晶子, 井上智, 前田健 (国立感染症研究所獣医科学部): 炭疽検査マニュアル (第 3 版), <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Anthrax20191216.pdf> (2020. 6. 30 参照)
- 3) 奥谷晶子, 井上智, 森川茂「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: 炭疽菌 DNA の PCR 検査における検出限界の算定, 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業), 動物由来感染症レファレンスセンター平成 25 年度活動報告 (2013)