

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

長崎県諫早食肉衛生検査所 中島 芳恵、吉川 亮¹⁾

1)現 長崎県川棚食肉衛生検査所

はじめに

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は “ ヒトと動物の共通感染症 ” となる病原体であるとともに、Biosafety Level (以下、BSL) 3 の病原体であり、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 (以下、感染症法) 上の四類感染症 (感染力と罹患時の重篤性等に基づく分類)、二種病原体 (病原体等の管理規制に基づく分類) であることから、臨床検体及び汚染物の取り扱いならびに保管管理には “ Biosafety ” と “ Biosecurity ” の観点から十分に留意しなければならない病原体である。

また、炭疽は、と畜場で罹患した疑いのある獣畜を発見した場合、迅速確実な診断と適切な消毒等の迅速な対応が求められる疾病である。

そこで、安全性に加えて迅速性、特異性、簡便性のある PCR による遺伝子検出方法について、PCR で問題となるクロスコンタミネーションによる誤診断を防止できる遺伝子検出診断系が有用になると考えられる。

今回、国立感染症研究所と地方衛生研究所で構成される動物由来感染症レファレンスセンターの平成 24 年度及び平成 25 年度活動のなかで精度管理が行われた PCR [1] の導入を検討するとともに、クロスコンタミネーションによる誤診断防止のために作製された遺伝子組換え陽性対照 DNA [2] を用いた遺伝子検出診断系の導入を試みたので、その有用性を含め概要を説明し、今後の炭疽菌検査の進め方について提案する。

材料及び方法

炭疽菌 *B. anthracis* (毒素遺伝子欠損の弱毒株 : Davis 株、荚膜遺伝子欠損のワクチン株 : 34F2 株)、セレウス菌 *B. cereus*、枯草菌 *B. subtilis* 及び国立感染症研究所獣医科学部第二室より分与された陽性対照 DNA [2] を材料として用いた。

方法としては、前述の材料及び当所の機器・資材を用い、PCR の動作ならびに特異性の確認を行い、導入の可否を検討した。PCR に関する条件は、国立感染症研究所の炭疽検査マニュアル (第 2 版) [3] に準拠した primer sets、PCR 反応液の組成及び反応条件を用いた。条件等は以下の表 1 及び表 2 に示す。

表 1 炭疽菌莢膜 (cap) 遺伝子及び毒素 (pag) 遺伝子を検出する primer sets

| Target genes | primer names | Sequences (5'-3') | products size (PCR products size) |
|----------------|--------------|----------------------|--------------------------------------|
| 莢膜遺伝子 (cap) | CAP1234 | CTGAGCCATTAATCGATATG | 846 bp |
| | CAP1301 | TCCCACTTACGTAATCTGAG | (720 bp) |
| 毒素遺伝子 (pag) | PA5 | TCCTAACACTAACGAAGTCG | 596 bp |
| | PA8 | GAGGTAGAAGGATATACGGT | (322 bp) |

表 2 PCR 反応液の組成及び反応条件

| | volume | final conc. | temperature | time | cycles |
|---------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|--------|
| 10× EX <i>Taq</i> Buffer | 2.5 µL | | 95°C | 5 min. | 1 |
| dNTP mixture (25 mM each) | 2.0 µL | 0.2 mM each | 95°C | 30 sec. | } 30 |
| Forward primer (10 µM) | 0.5 µL | 0.2 µM | 55°C | 30 sec. | |
| Reverse primer (10 µM) | 0.5 µL | 0.2 µM | 72°C | 30 sec. | |
| TaKaRa EX <i>Taq</i> HS | 0.125 µL | 0.025 U/µl | 72°C | 5 min. | 1 |
| DW (DNase/RNase free) | 17.875 µL | | 4°C | ∞ | 1 |
| DNA template | 1.5 µL | | | | |
| total | 25 µL | | | | |

表 3 各菌 (各株) 及び陽性対照 DNA を用いた PCR 反応結果

| 菌 名 | PCR 産物の有無 | |
|--|-----------|---------|
| | cap 遺伝子 | pag 遺伝子 |
| <i>Bacillus anthracis</i> (Davis 株) | + | - |
| <i>Bacillus anthracis</i> (ワクチン株 : 34F2 株) | - | + |
| (参考) <i>Bacillus anthracis</i> (臨床分離株、野外株) | + | + |
| <i>Bacillus cereus</i> | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - | - |
| 陽性対照 DNA | + | + |
| (参考) <i>Bacillus mycoides</i> | - | - |
| (参考) <i>Bacillus thuringiensis</i> | - | - |

+ : PCR 産物あり、 - : PCR 産物なし、(参考) : 平成 24 年度のレファレンスセンター活動報告より

成績

各種検体ならびに当所の機器・資材を用いて PCR の動作及び特異性の確認を行った結果、十分に満足できる結果を得ることができた (表 3)。また、陽性対照 DNA は、炭疽菌の PCR 産物より小さい所定のサイズ (莢膜遺伝子 : 約 700 bp、毒素遺伝子 : 約 300

bp) に増幅が確認された。

考察

以上の結果から、当所において遺伝子組換え陽性対照 DNA を用いたクロスコンタミネーションによる誤診断防止を含めた当該遺伝子診断は導入可能であると結論付けた。

まとめ

今回検討した診断系は、「検出限界が芽胞 1 個から 100 個相当を示しており、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、臨床検体からの炭疽菌検査は可能」と報告されている[1]。

現在、長崎県食肉衛生検査所マニュアルの炭疽検査要領では「血液及び剖検材料の直接塗抹標本を染色(莢膜等)し炭疽菌を確認する」とし、莢膜を有する大桿菌を認めた場合、「細菌培養、アスコリー反応、パールテスト、ファージテスト及び PCR」を実施し、炭疽菌を確認する検査手順が記載されているが、細菌培養、パールテスト及びファージテストは、判定までの日数がかかり、手技や準備器材が煩雑であることに加え、平成 18 年改正の感染症法に基づくと、Biosafety の観点や BSL3 実験室はもとより安全キャビネット等の感染防御可能な施設設備が十分ではない検査所では実施困難である。

以上のことから、今後は直接塗抹標本による莢膜を有する大桿菌の確認と当該 PCR により確定診断をすることを推奨し、さらに PCR 産物を DNA シークエンサーにより塩基配列を決定し、炭疽菌遺伝子であることを確認する手順を加えれば、より確実な確定診断になりうると思われる。

今後の課題としては、臨床検体からのサンプリング方法及び DNA 抽出方法について安全性を含めた適切な取扱いの検討をしていく必要がある。

- (1) 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)
- (2) Satoshi Inoue, Akira Noguchi, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada: Preparation of a Positive Control DNA for Molecular Diagnosis of *Bacillus anthracis*, Jpn. J. Infect. Dis., 57, 29-32 (2004)
- (3) 井上智ら(国立感染症研究所獣医科学部第二室): 炭疽検査マニュアル(第 2 版), https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Anthrax_%2020121029-3.pdf (2018.12.4 アクセス)