

衛生微生物協議会・第34回研究会プログラム(平成25年7月11日、木・12日、金)

- ◇レファレンスセンター等関連会議 (7月11日、木、10:00-11:10)
- ◇レファレンスセンター等報告 (7月12日、金、15:10-16:40)

平成24年度 炭疽菌の遺伝子検査 結果報告

動物由来感染症レファレンスセンター
国立感染症研究所 獣医科学部

基幹となる地衛研の一覧

- ◇ 山形県衛生研究所
- ◇ 東京都健康安全研究センター
- ◇ 愛知県衛生研究所
- ◇ 京都府保健環境研究所
- ◇ 長崎県環境保健研究センター

※ 現行の対応疾病: 野兔病、ブルセラ症、炭疽

動物由来感染症レファレンスセンター関連会議(次第)

1. 関連会議参加 地衛研

2. H24年度の取り組みについて意見集約

1) 陽性対照DNAを利用した炭疽菌PCRの検証

- ・ ブラインドテストについて
- ・ 配布した陽性対照DNAについて

2) 炭疽を疑う検体の対応に関する現状調査

3. H25年度の取り組みについて

(1) 陽性対照DNAを利用した炭疽菌PCRの検証

◇ 使用菌株（炭疽菌を含む5菌種、6株）

- 炭疽菌 (*B. anthracis* 臨床分離株および市販ワクチン34F2株)
- セレウス菌 (*B. cereus*)
- チュリンゲンシス菌 (*B. thuringiensis*)
- 枯草菌 (*B. subtilis*)
- マイコイデス菌 (*B. mycooides*)

※ *Bacillus subtilis*以外は*Bacillus cereus* groupに属する。

◇ 検査法： 病原体検出マニュアル

◇ PCR陽性の判断

標的遺伝子	鋳型の増幅遺伝子	増幅サイズ
• <i>pag</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>596bp</u>
	陽性対照DNA	⇒ <u>322bp</u>
• <i>cap</i> 遺伝子	<i>B. anthracis</i> 由来DNA	⇒ <u>846bp</u>
	陽性対照DNA	⇒ <u>720bp</u>

地衛研で使用している異なる機器・試薬・反応条件でも炭疽菌DNAに特異的なPCR増幅を確認できた

	札幌	仙台	新潟	金沢	福岡
・使用サーマルサイクラー	BIO-RAD	Applied Biosystems Verti	PCR Thermal Cycler Dice® Gradient	Thermal cycler 480 TAKARA	C-1000/S-1000 BIO-RAD
・オリゴ合成（メーカー名）	Invitrogen	グライナージャパン	Invitrogen	SIGMA	Invitrogen
・DNA Polymerase	TaKaRa ExTaq	TaKaRa ExTaq	TaKaRa Ex Taq Hot Start Version	TaKaRa ExTaq	TaKaRa Ex Taq Hot Start Version
・PCR 反応液の組成					
滅菌蒸留水	37.8μl	16.9	18.0	34.0	17.875
Buffer	5.0μl	2.5	2.5	5.0	2.5
MgCl ₂	-	-	-	3.0	-
dNTPs (2.5mM each)	4.0μl	2.0	2.0	4.0	2.0
sense primer (10μM)	1.0μl	0.5	0.5	1.0	0.5
anti-sense primer (10μM)	1.0μl	0.5	0.5	1.0	0.5
DNA Polymerase (5unit / μl)	0.2μl	0.1	0.5	1.0	0.125
template DNA	1.0μl	2.5	1.0	1.0	1.5
Total	50μl	25	25	50	25
・泳動した PCR 産物の液量	1μl	5	2	1	2
・PCR 反応の条件					
a) 熱変性	94 C、 2m	95C、 5m	95 C、 5m	95 C、 5m	95 C、 5m
b) 熱変性	94 C、 30 s	95C、 30s	95 C、 30s	95 C、 30s	95 C、 30s
アニーリング	50 C、 30 s	55 or 52C、 30s		55 C、 30s	55 C、 30s
pag			52 C、 30s		
cap			55 C、 30s		
伸長	72 c、 30 s	72 C、 30 s	72C、 30s	72C、 30s	72C、 30s
(繰り返し回数)	(30 cycles)	(35cycles)	(30 cycles)	(30 cycles)	(30 cycles)
c) 伸長	72 C、 5 m	72、 5 m	72C、 5m	72C、 5m	72C、 5m

検討課題について

(1) 陽性対照DNAについて（感染研から配布）

- ◇ 陽性対照DNA ⇒ 増幅サイズを小さくしてある
- ◇ サイズマーカー ⇒ 検体の増幅サイズ判定用マーカー



使用継続

注： 新規担当者に陽性対照・サイズマーカーの使用方法を正確に引き継ぐ。

※ 陽性対照DNA： コンタミネーションによる擬陽性を特定可能。

※ サイズマーカー： 1) PCR産物の電気泳動の際にサイズマーカーとして使用する。
2) 非特異増幅の判別に利用できる。
3) PCRの際に検体にコンタミしても増幅されない。
4) 大腸菌由来でPCR陽性時の増幅サイズと同じサイズとなるようにデザインされている。

(2) 炭疽菌の遺伝子検査の確定について

◇ PCR反応



◇ 電気泳動で陽性を疑う検体が出た場合



◇ 塩基配列の解読を行って陽性を判断する

※PCR産物の塩基配列解読について

普段、国内で発生のない炭疽菌のPCR判定では塩基配列を解読して、確実に炭疽菌由来であることを確認する。

将来、頻発に事例が発生した場合には、電気泳動のみの同定や、陽性対照DNAとの競合的PCRなどを検討する必要がある。

(2) 炭疽菌の遺伝子検査の流れについて

◇ 炭疽を疑う検体の対応に関する現状調査

添付の調査票に必要事項を記載して
メールで返信。

平成17年度以降は炭疽疑い検体の検査依頼は少ないが、検査に携わった経験者がいなくなっているため、今回を契機にマニュアル等を参考に整備したい。

白い粉等の未確認検体の場合には、安全を確保するため、特に、化学系毒物の恐れを排除しつつ検査を進めている。

炭疽菌が疑われる検体は、BSL3実験室で検査を行っている。

※ バイオテロ疑い(白い粉等)の検査受け入れにおける課題について

- ◇ 化学・核・爆弾の可能性を警察で否定してからの検体搬入が望ましい。
⇒ 地衛研と警察との事前打ち合わせと連携の継続が大切である。
- ◇ 炭疽疑い事例は希少であり、疑い時には感染研と相談できる体制をとりたい。
⇒ レファレンスセンターの構成を全国の各ブロックからとりたい。

※ 病原体検出マニュアルについて

- ◇ 感染研での確定検査を可能にするために、疑い検体の搬送方法を病原体検出マニュアルに記載する。
⇒ 確定前の検体は、二種病原体でなく、臨床検体として対応が可能である。
・ PCRの結果を見て、必要であれば感染研に臨床検体扱いで送付する。
- ◇ バイオテロ疑い検体の採材方法と注意点をマニュアルに記載する。
⇒ 他の病原体検出にも支障のない方法がよい。

平成25年度の取り組みについて

(1) 動物由来感染症の病原体診断

◇ 炭疽菌のPCR検出における感度を検証（環境検体を想定）

・感染研からDNA検体を送付

◇ 狂犬病ウイルスの抗原・遺伝子検査（ブラインドテスト）

・狂犬病レファレンスネットワークの構築

※ 参加を希望する地衛研は御連絡ください。

連絡先： 感染研・獣医科学部（井上 sinoue@nih.go.jp）
基幹地衛研（山形・東京・愛知・京都・長崎）

(2) 関連会議で話し合われた事項

◇ 「鼻疽菌/類鼻疽菌」の診断系について

⇒ 感染研・細菌第二部で検査系を維持

◇ 炭疽菌の病原体検出マニュアルについて

※ コンタミの防止策をマニュアルに盛り込む。

※ 検体に応じた検査整備を検討する。

(患者由来検体と環境由来検体では求められる検出感度が異なる)

※ レファレンスセンターの取り組みを反映させる。

◇ センターで得られた成果の地衛研との共有について

※ 希望があれば、感染研・基幹地衛研から入手できる。

※ 基幹地衛研以外も、取り組みに参加できる。