

動物由来感染症レファレンスセンター 平成26年度活動報告

○動物由来感染症レファレンスセンター 世話人

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

野口 章 獣医科学部 主任研究官

※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

研究分担者 森川 茂

獣医科学部長

ネットワークに参加している衛生研究所



○ 動物由来感染症レファレンスセンター(7)

山形県、東京都、愛知県、京都府、
広島県、徳島県、長崎県

○ 連携している自治体 (16)

北海道、岩手県、新潟県、富山県、
千葉県、長野県、名古屋市、三重県、
滋賀県、兵庫県、広島県、姫路市、
愛媛県、福岡県、熊本県、沖縄県

● レファレンスセンターを活用した狂犬病ネットワークに参加して検査法等を共有している自治体 (31)

北海道・青森県・岩手県・山形県・栃木県・埼玉県・千葉県・東京都・神奈川県・越谷市・新潟県・富山県・長野県・静岡県・愛知県・三重県・滋賀県・京都府・兵庫県・奈良県・名古屋市・岡山県・広島県・姫路市・徳島県・高知県・福岡県・長崎県・熊本県・宮崎県・沖縄県

● 動物由来感染症レファレンスセンターの活動

- (1) 衛生研究所との活動(EQA等)
- (2) 診断用陽性対照を作成(希望する地衛研に配布)
細菌： 野兔病、ブルセラ症、炭疽、類鼻疽。
ウイルス： 狂犬病、SFTS
- (3) 動物由来感染症レファレンスネットワークの構築

※衛生研究所と保健所・愛護相談センターの連携を支援

H25年度報告：

炭疽菌 遺伝子検査の検出限界

奥谷晶子(獣医科学部)

平成25年度

検出限界算定

材料

炭疽菌臨床分離株の芽胞からのDNA抽出(フェノール・クロロフォルム抽出)

DNA溶液 10倍階段希釈列の作成

芽胞 10⁶個相当から10⁻¹個相当の希釈

(DNA濃度が低い溶液中のDNA分解を防ぐためSalmon sperm DNA(10ng/uL)を添加。非特異増幅は出ないことを確認済み)

PCRに用いるプライマーは当部より配布した。

方法

配布したDNA検体およびプライマーを用いて、各地方衛生研究所所有の機器とPCR関連試薬を用いて増幅後、電気泳動して検出限界濃度を算定。



DNA Polymerase とサーマルサイクラー

	山形県	愛知県	徳島県	京都府	広島県	長崎県
DNA Polymerase	Ex Taq HS (TaKaRa)	TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version	Ex Taq (TaKaRa)	TaKaRa EX Taq	TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa)	TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa)
サーマルサイクラー	My Cycler (BIO-RAD)	TaKaRa PCR Thermal PC-818-02 (ASTEC) Cycler Dice® Gradient		Gene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMERE)	GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)	T100 Thermal Cycler (BIO-RAD)

- Taqは全てTaKaRa製品であった。
- Taqとサーマルサイクラーが全く同じ組み合わせの機関はなかった。



		PCR反応					
		山形県	愛知県	徳島県	京都府	広島県	長崎県
pag遺伝子:							
(a) 熱変性		94 °C 2分	95 °C 5分				
(b)熱変性		94 °C 30秒	95 °C 30秒				
アニーリング		50 °C 30秒	52 °C 30秒	55 °C 30秒	52 °C 30秒	55 °C 30秒	55 °C 30秒
伸長		72 °C 30秒					
サイクル数		30	30	30	30	30	30
(c)伸長		72 °C 5分	72°C 5分	72°C 5分	72°C 5分	72 °C 5分	72 °C 5分
cap遺伝子:							
(a) 熱変性		94 °C 2分	95 °C 5分				
(b)熱変性		94 °C 30秒	95 °C 30秒				
アニーリング		50 °C 30秒	55 °C 30秒				
伸長		72 °C 30秒					
サイクル数		30	30	30	30	30	30
(c)伸長		72°C 5分					

赤で示した箇所は他の機関と異なる条件で行った部分。



		PCR反応					
		山形県	愛知県	徳島県	京都府	広島県	長崎県
pag遺伝子:							
(a) 熱変性		94 °C 2分	95 °C 5分				
(b)熱変性		94 °C 30秒	95 °C 30秒				
アニーリング		50 °C 30秒	52 °C 30秒	55 °C 30秒	52 °C 30秒	55 °C 30秒	55 °C 30秒
伸長		72 °C 30秒					
サイクル数		30	30	30	30	30	30
(c)伸長		72 °C 5分	72°C 5分	72°C 5分	72°C 5分	72 °C 5分	72 °C 5分
cap遺伝子:							
(a) 熱変性		94 °C 2分	95 °C 5分				
(b)熱変性		94 °C 30秒	95 °C 30秒				
アニーリング		50 °C 30秒	55 °C 30秒				
伸長		72 °C 30秒					
サイクル数		30	30	30	30	30	30
(c)伸長		72°C 5分					

赤で示した箇所は他の機関と異なる条件で行った部分。



まとめ

- ◆ 検出限界濃度は、ばらつきが見られたものの芽胞個数換算で1個から100個であった。

発症患者あるいは患畜検体では通常 10^6 個以上の菌血症となっているので

臨床検体からの検出には問題は無いと思われる。

環境検体の場合はPCR阻害物質やDNA抽出法により遺伝子検出が難しいと思われるが、培養検査を併用することで菌の検出は可能と思われる。

(遺伝子検査と培養検査両方の結果を勘案することが重要である。)

- ◆ pag遺伝子(pX01由来)の方がcap遺伝子(pX02)よりも検出限界濃度が低かった。

これは抽出時のプラスミド・コピー数に差があったものと思われる。

pag遺伝子をコードするpX01の方がpX02よりも数倍から数百倍コピー数が多い株が報告されている。ただし、非常に低い濃度での増幅は濃度依存的でなく確率的な増幅も考えられる。

炭疽疑い環境検体等の対応に関して

これまで、各自治体で経験された対応の経緯・経験を取りまとめて共有する(京都府等から資料提供)

安全に芽胞菌を取扱う手技等について

※検体処理のプロトコル作成(DVD等)

※芽胞からのDNA抽出手技(他の芽胞菌を利用)

※簡易グローブボックス等の紹介

H26年度活動:

狂犬病 遺伝子検査等の検証

○目的:

各衛生研究所で使用されている試薬・機器等を使用して検査マニュアルの検証を行う。

○方法等:

病原体検査マニュアル(感染研HP)」に準じて行う(検体RNAと遺伝子検出用のプライマーを送付)。

1. 遺伝子検査のブラインドテスト(RT-PCR)

- ◇ RNAサンプル 3本
(RNAstable tube 使用時まで室温保存可)
- ◇ Positive control RNA 1本
(RNAstable tube 使用時まで室温保存可)
- ◇ プライマー(100pmol/ul in TE) 9本

2. 脳組織からのRNA抽出法の検証

- ◇ 脳乳剤からのRNA抽出効率の検証
 - ・TRIzol Reagent(Life Technologies)
 - ・RNeasy Kit(QIAGEN)
- ◇ 脳組織: イヌ・アライグマ・タヌキ等を検討
 - ・GAPDH増幅プライマー使用(イヌ 226bp)

(3) 動物由来感染症レファレンスネットワークの構築

※衛生研究所と保健所・愛護相談センターの連携を支援

平成25年度に行われた厚生労働科学特別研究について

我が国における動物の狂犬病モニタリング調査手法に係る緊急研究を受けて行われる自治体の担当部局(生活衛生課等)との連携

『動物の狂犬病調査ガイドライン』

を利用した検査・調査への衛生研究所による技術・助言等の支援

※研究班に参加した自治体:

北海道、青森県、栃木県、千葉県、東京都、
新潟県、富山県、滋賀県、兵庫県、岡山県、
徳島県、愛媛県、福岡県、熊本県、宮崎県、
鹿児島県、沖縄県、小樽市、岡崎市