

第 81 回麻布獣医学会 一般演題 2

炭疽の迅速スクリーニング法の検討

高杉 幹男¹, 小林 真也², 齋藤 立³¹山形県庄内食肉衛生検査所, ²山形県内陸食肉衛生検査所, ³山形県庄内総合支庁生活衛生課

〔はじめに〕

炭疽は人獣共通感染症のひとつであり, 感染症新法では四類感染症, 家畜伝病予防法では家畜伝染病に指定されている。

炭疽菌 *Bacillus anthracis* は感染力が強く, ヒトに感染すると重篤な疾病を起こすため, バイオセーフティーレベル 3 に分類されている。わが国での炭疽発生は稀であるが, と畜場で疑わしい症例に遭遇した場合を想定し, より迅速で高感度な診断を行うための検査体制を確立しておくことは必須である。

今回, バイオセーフティーに配慮した検体処理を行いつつ, アスコリーテストに PCR 法を併用した検査法の検討を行ったので, その概要を報告する。

〔材料および方法〕

実験操作は全てバイオセーフティーレベル 2 で管理された実験室内に配備されたクラス II A 安全キャビネット内で行った。

(1) 検査法

初動検査に求められる要件①迅速性②実用上問題のない感度③バイオセーフティーに配慮, の 3 点を考慮し, 検査法を設定した。最も汚染を拡散する可能性のある臓器の破碎はグラインディングチューブを使用した。グラインディングチューブで腸間膜リンパ節 (以下, リンパ節), 脾臓及び血液の 5 ~ 10 倍乳剤を作成し, 0.1 ml を DNA 精製キットに供し, テンプレート作製後, PCR を行った。一方, グラインディングチューブの残量全て (0.9 ml) はアスコリーテストに用いた。

DNA 精製の際に行う酵素処理については, 通常 30 分を要するが, 時間の短縮を図るため, あらかじめ

予備調査を行った。その結果を踏まえ, リゾチーム処理を振とうしながら 37℃ 15 分, プロテイナーゼ K 処理を 70℃ 15 分とし, 以降の処理は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) のグラム陽性菌検出用プロトコールに従い各試料から精製した。

ア) PCR 法

Cheun ら¹⁾の方法に準じ, 常染色体上に存在する S-layer 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いた。用いたプライマーは SL-U1 (5'-CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT-3') と SL-D1 (5'-TTCTGAAGCTGGCGTTACAAAT-3') であり, 反応条件は前熱変性 95℃ 5 分, 熱変性 95℃ 30 秒, アニール 55℃ 30 秒, 伸長反応 72℃ 1 分, 最終伸長 72℃ 5 分で反応サイクル数は 35 とした。(増幅サイズ; 639 bp)

PCR 後, 染色時間を節約するため, エチジウムブロマイド入り 1% アガロースゲルで電気泳動を行った。

イ) アスコリーテスト

乳剤をそのままブロックヒーターにより 100℃ 20 分加熱し, 12,000 rpm 3 分遠心後の上清を抗原液とした。先端を密栓したパスツールピペットに炭疽沈降素血清を分取し, 各抗原液を重層後, 1 分以内に接触面に白輪が現れたものを陽性とした。

(2) 添加回収試験

添加する菌株は無莢膜弱毒株である 34F2 株を用い, 添加する試料は健康豚の脾臓, リンパ節及び血液とした。血液は放血血液をガラスビーズ加 50 ml 遠心管に採り, 脱線血とした。脾 0.1 g, リンパ節 0.2 g, 血液 0.2 ml を空のグラインディングチューブに秤取し, 滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈した菌液

を添加し、上記検査法に従って処理し、検出感度を確認した。添加した菌液の菌数は普通寒天培地に塗抹して37℃24時間培養後に算定した。

〔成績〕

(1) PCR法

反応に要する菌量は、脾臓及びリンパ節で 10^5 cfu/g以上、血液では 10^4 cfu/g以上の添加量で判定に要した時間は3時間30分であった。

(2) アスコリーテスト

反応に要する菌量は、脾臓、リンパ節及び血液とも 10^8 cfu/g以上の添加量で判定に要した時間は30分であった。

表 検出感度と判定に要した時間

方法	検出感度	検査時間
PCR法 { リンパ節・脾臓 血液	$> 10^5$ cfu/g $> 10^4$ cfu/g	3時間30分
アスコリーテスト	$> 10^8$ cfu/g	30分

〔まとめ〕

冒頭に示した3つの要件について以下のとおり達成することができた。

迅速性については、PCR法の判定に要する時間が3時間30分であり、アスコリーテストの30分には劣るものの、酵素処理時間及びゲル染色時間の短縮により、通常より1時間近く短縮することができた。また、アスコリーテストを補助診断用として併用した。

検出感度については、両者の検出感度を比較すると、脾臓及びリンパ節は 10^3 倍、血液では 10^4 倍PCR

法の方が優っていた。

アスコリーテスト、ファージテスト及びパールテストに臓器乳剤を直接用いた場合、非特異反応や感度の問題、他菌による汚染等により判定しづらい事例に遭遇することが過去の対応事例の中で多く報告されている。今回示したPCR法では検出感度が 10^4 cfu/g以上であることに加え、PCR法の特異性を考慮すると、従来法に比べ信頼性はより高いものと思われた。

バイオセーフティーへの配慮については、病原体拡散リスクが最も高い組織破碎をグラインディングチューブ内で行った。また、1本のグラインディングチューブからのDNA抽出用乳剤作製とアスコリーテスト用抗原液の調整を実現し、組織破碎の回数を減らすことにもつながった。

以上から、本検査法は炭疽菌検出に十分実用的であり、本法の導入により、高い確率で炭疽と判断し、その後の対応を効果的かつ効率よく行うことが可能となった。

今後は本検査法の導入を前提とした危機管理体制の再整備について、さらなる検討をしていきたい。

〔謝辞〕

今回の検討に際し、ご指導・ご協力いただいた北海道衛生研究所の山口敬治先生、北見保険所の越山祐美子先生に深謝します。

〔引用文献〕

- 1) Cheun et al: A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue, Journal of Applied Microbiology. 2001; 91: 421-426.