

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業研究

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

動物由来感染症レファレンスセンター

目的：動物由来感染症の実験室診断方法の整備
バイオテロ時を含めた緊急時に迅速対応が可能な体制の整備

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所 獣医科学部 部長

衛生微生物技術協議会第39回研究会
平成30年7月5日 滋賀県大津市

動物由来感染症レファレンスセンター活動

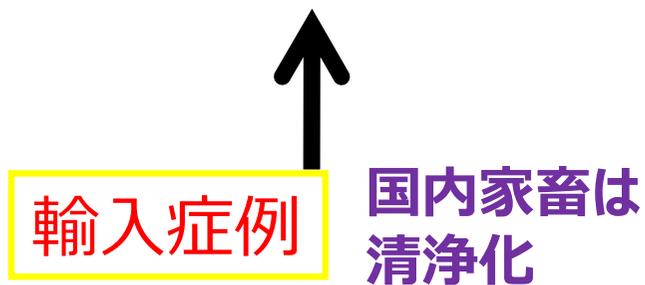
H29：ブルセラ症検査のEQA

目的：動物由来感染症の実験室診断方法の整備
バイオテロ時を含めた緊急時に迅速対応が可能な体制の整備

研究協力者（実施担当者） 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
研究協力者 鈴木道雄 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

日本におけるブルセラ症(1999.4.1 ~ 2018.6.30)

B. melitensis 感染 9例



B. abortus 感染 4例

BM or BA感染 (未同定) 1例

B. canis 感染 28例

すべて国内感染
(日本人)
2008 : 重症例 2例

| 年 | 年齢 | 推定感染地 | |
|-------|-----|------------|---------------|
| 2005 | 30代 | シリア | Travel to |
| 2006 | 50代 | エジプト | Travel to |
| 2009 | 10代 | インド | Visit from |
| 2010 | 40代 | ペルー | Visit from |
| 2011 | 40代 | 中国 | Homecoming to |
| 2014 | 40代 | 中国 | Visit from |
| 2015* | 60代 | フランス | Travel to |
| 2015 | 50代 | カメルーン、スーダン | Visit from |
| 2015 | 50代 | ソマリア | Visit from |

*抗体はB. canisのみ陽性だが、症状と地域より推定

| 年 | 年齢 | 推定感染地 | |
|------|-----|-------|---------------|
| 2006 | 20代 | エジプト | Visit from |
| 2008 | 60代 | ペルー | Visit from |
| 2016 | 60代 | タンザニア | Visit from |
| 2017 | 40代 | 中国 | Homecoming to |

| 年 | 年齢 | 推定感染地 | |
|------|-----|--------|-----------|
| 2015 | 40代 | マダガスカル | Travel to |

| 年 | 報告数 | 年 | 報告数 | 年 | 報告数 | 年 | 報告数 |
|------|-----|------|-------|------|-------|------|-----|
| 2002 | 1 | 2008 | 3 | 2012 | 0 | 2016 | 1 |
| 2005 | 1 | 2009 | 1 (1) | 2013 | 1 | 2017 | 1 |
| 2006 | 3 | 2010 | 1 | 2014 | 9 (4) | 2018 | 2 |
| 2007 | 1 | 2011 | 1 | 2015 | 2 (1) | | |

* ()内は無症状病原体保有者として届出

ブルセラ症の検査・診断

臨床症状
感染機会の有無
など

+

細菌学的検査 : 分離・同定
血清学的検査 : 抗体の測定
遺伝子の検出 : PCR など

ブルセラ症の感染症法における届出基準

| 検査方法 | 検査材料 |
|--|-------|
| 分離・同定による病原体の検出 | 血液、骨髄 |
| 試験管凝集反応による抗体の検出 (抗原がアボルタスの場合は40倍以上、 カニスの場合は160倍以上の抗体価) | 血清 |

医師は、患者の渡航歴・母国が**流行地** + **不明熱**を呈する場合は、ブルセラ症も疑いうる

ブルセラ症検査の実態（背景）

*ブルセラ症の検査については、医療機関よりの依頼が想定され、基本的に**血清抗体検査と分離培養**、もしくは**分離菌株の同定**依頼となる。

*このうち、**血清抗体検査**については、市販の抗原菌液を使用した検査も実施可能だが、民間の臨床検査センターにおいて保険診療に基づく検査を実施しているので、医療機関から当該センターに検査依頼することが可能である。

*そのため、**感染研**においては、医療機関等からの問い合わせの際には、行政検査でない場合は、まず検査センターに抗体の検査依頼をするよう伝えている。大半のケースで、抗体が検出されず、その時点でブルセラ症が否定される。

*ただし、検査センターでの**抗体検査の結果が陽性**であった、**菌（未同定）が分離**された、もしくは**患者背景**（流行地域出身の外国人、流行地への海外渡航歴、臨床症状等）から**ブルセラ症が強く疑われる**、などの場合については、原則、行政検査として、抗体検査および菌の分離培養・菌の同定検査を受けることとしている。

ブルセラ症検査EQA (抗体検出:TAT, 遺伝子検出:PCR)

感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加可能地研でモデル検体を用いた検査を試行し、検査法・手技等の検証を行う

参加地研数： 21地研

実施期間： 2017.10.3-2018.2.28

実施内容：

1. 抗体検査法：

B. abortusを抗原とした

試験管凝集反応 (TAT)の実施

2. 遺伝子検出法 (PCR)：

- 1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) での実施
- 2) 各施設で通常使用しているTaq Polymeraseでの実施
- 3) 血清からのDNA抽出とPCR
- 4、5) 感染研および各施設の方法で検体希釈列を用いた検出限界の検討

| | |
|---------------|----------------|
| 岩手県環境保健研究センター | 京都府保健環境研究所 |
| 山形県衛生研究所 | 兵庫県立健康生活科学研究所 |
| 東京都健康安全研究センター | 神戸市環境保健研究所 |
| 群馬県衛生環境研究所 | 広島県立総合技術研究所 |
| 横浜市衛生研究所 | 保健環境センター |
| 静岡県環境衛生科学研究所 | 徳島県立保健製薬環境センター |
| 富山県衛生研究所 | 香川県環境保健研究センター |
| 愛知県衛生研究所 | 長崎県環境保健研究センター |
| 名古屋市衛生研究所 | 長崎市保健環境試験所 |
| 岐阜県保健環境研究所 | 宮崎県衛生環境研究所 |
| 三重県保健環境研究所 | 沖縄県衛生環境研究所 |

抗体検出:TAT

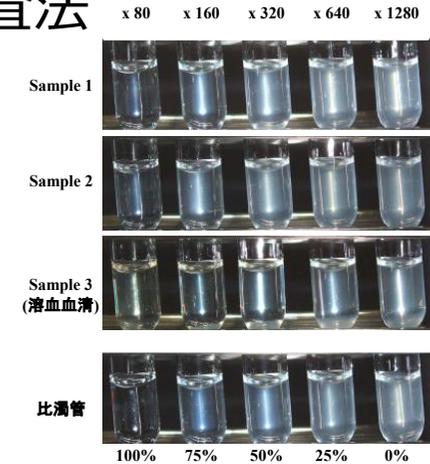
目的： ブルセラ症の診断として最も有効な方法である抗体検査法（試験管凝集反応）の実態を知る

使用（送付）サンプル等：

抗原：凝集反应用菌液（不活化B. abortus全菌体）

1. B. suis免疫ウサギ血清
2. B. canis免疫ウサギ血清
3. Y. enterocolitica O9免疫ウサギ血清

PC. B. abortus免疫ウサギ血清



結果の考察：

概ね良好な結果が得られている。

抗原にB. abortus (smooth-type) を使用しているため、B. suisは反応するが、B. canis (rough-type) は反応しない
Y.e.O9のLPSはB. abortusと類似、交差反応する

1地研、1,2,PCの価がおかしい

1地研、PCの価が高すぎる

9地研、1の価が？ -Endpoint出ていないので、640<が正しい

| | 1 | 2 | 3 | PC |
|------|---|----|----|------|
| <10 | 1 | 20 | | |
| 10 | | 1 | | |
| 20 | | | | |
| 40 | | | 4 | 1 |
| 80 | | | 15 | |
| 160 | | | 2 | 14 |
| 320 | 3 | | | 5 |
| 640 | 9 | | | |
| 640< | 8 | | | 1(?) |

遺伝子検出:PCR

使用機器（サーマルサイクラー）、アガロースが多岐にわたる — 地研間で統一性がない
アガロースの選択 — 目的サイズ（今回は 200bp前後）に合っていない

| | | | | |
|-----------|-----------------------------|-----------------|-----------------|----------|
| サーマルサイクラー | Applied Biosystems | Veriti (5) | GeneAmp9700 (3) | 2720 (2) |
| | | SimpliAmp | ProFlex | |
| | BioRad | C1000 Touch (2) | T100 | MyCycler |
| | Takara | TP600 | TP650 | TP350 |
| | Astek | GeneAtlasG02 | | |
| | 日本ジェネティクス | G-Storm GS4 | | |
| アガロース | Nusieve3:1 (3) | Agarose LO3 (4) | AgaroseS (3) | AgaroseX |
| | AgaroseME | Agarose Typel | Agarose Typell | et.al. |
| | MultiNA (マイクロチップ電気泳動、島津) | | | |
| | QIAxcel (キャピラリー電気泳動、QIAGEN) | | | |
| 染色試薬 | EtBr (15) | GelRed (3) | ミドリグリーンDirect | |

DNA polymeraseや、抽出キットは、比較的限られた物が使用されている

(未実施：1地研)

DNA polymerase

- Takara ExTaq (HotStart含む) (14)
- Promega GoTaqGreenMasterMix (3)
- puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (1)
- Takara EmeraldAmp PCR Master Mix (1)
- Takara Tks Gflex (1)

DNA抽出キット

- QIAamp DNA Mini Kit (17)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (2)
- Takara NucleoSpin Tissue (1)

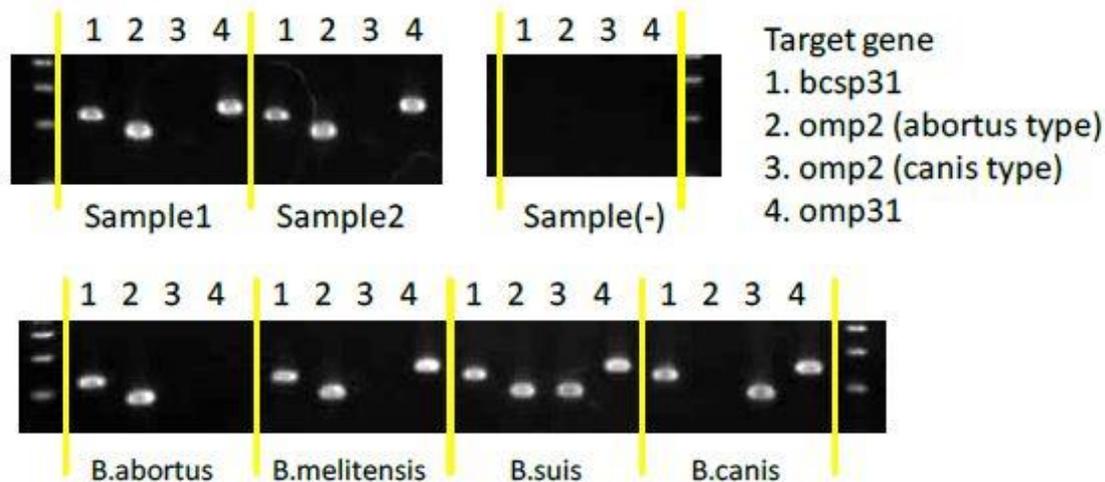
遺伝子検出:PCR

4種類のプライマーセットを組み合わせて菌種を同定する

- 1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads)での実施
- 2) 各施設で通常使用しているTaq Polymeraseでの実施
- 3) 血清からのDNA抽出とPCR

6) 泳動結果の判定

- (1) 下記、各菌種の増幅パターンより、検体の陽性・陰性、陽性の場合の菌種を同定 (B. abortus biovar 1 125 株、B. canis QE13 株、B. melitensis biovar 1 16M 株、B. suis biovar 1 1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターン。Sample1&2 は B. melitensis)



- B. abortus では、bcsp31、B. abortus 型の omp2 遺伝子。
B. melitensis では、bcsp31、omp31、B. abortus 型の omp2 遺伝子。
B. canis では、bcsp31、omp31、B. canis 型の omp2 遺伝子。
B. suis では、4 種類すべての遺伝子。

遺伝子検出:PCR

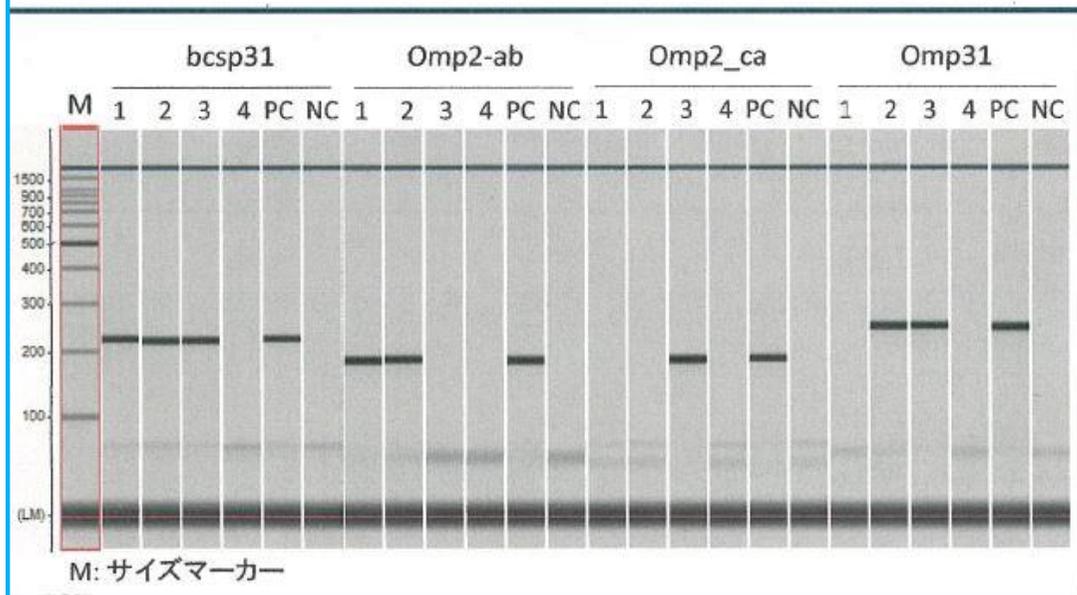
定性的な検査については、どの地研も、1) ~ 3) いずれも良好な結果が得られている

DNA抽出も問題なし

| | |
|-----|---------------------------|
| #1 | BA 544 |
| #2 | BM 16M |
| #3 | BC QE13 |
| #4 | Streptobacillus notomytis |
| #PC | BS 1330 |

| 検体番号 | 反応結果 (目的サイズの増幅) | | | | 判定結果 | |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------|----------------------|
| | bbsp31 (224bp) | omp2-ab (186bp) | omp2-ca (187bp) | omp31 (249bp) | 陽性 or 陰性 | 同定菌種名 |
| 例#0 | + | + | - | + | 陽性 | <i>B. melitensis</i> |
| #1 | + | + | - | - | 陽性 | <i>B. abortus</i> |
| #2 | + | + | - | + | 陽性 | <i>B. melitensis</i> |
| #3 | + | - | + | + | 陽性 | <i>B. canis</i> |
| #4 | - | - | - | - | 陰性 | |
| #PC | + | + | + | + | 陽性 | <i>B. suis</i> |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

(ブルセラ属菌でない場合は、“陰性”との判定)



遺伝子検出:PCR

4、5) 感染研および各施設の方法で検体希釈列を用いた 検出限界の検討

検出感度検討用BA 544 DNA希釈列

(1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01,
0.003, 0.001ng/ul, DW)

標的遺伝子はbcsp31

| # | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----|---|---|---|---|---|
| RTG | 1 | 7 | 6 | 4 | 2 |
| 他* | 1 | 8 | 4 | 5 | 1 |

検出感度は#4(0.03ng/ul)までが
多い

感度の違いはPolymeraseによる
差よりも施設による差?

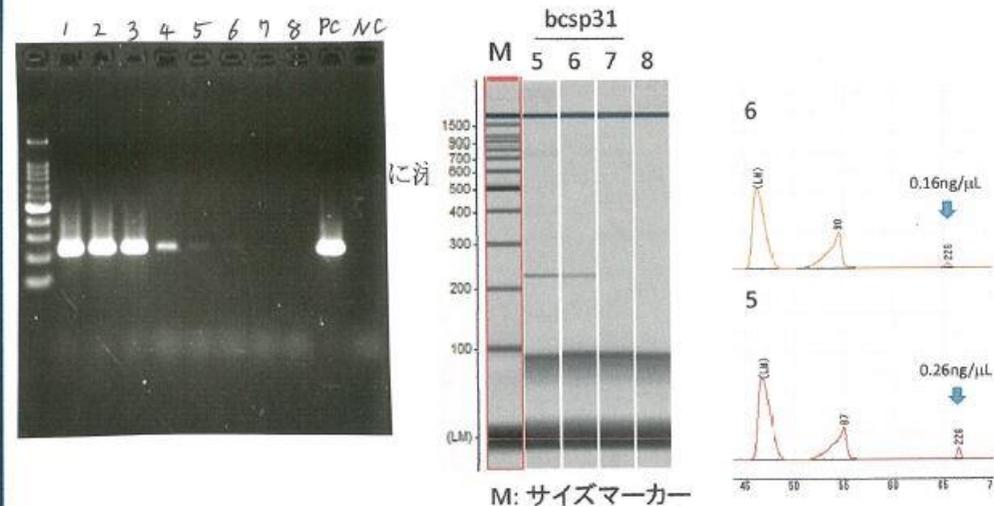
—使用機器・染色液の違い? (*未実施: 1地研)

5. 泳動結果

- エンドポイントを求める。
(特異的増幅が見られた物に「+」を記入)

| No | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | PC | NC |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| 増幅判定 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - |

PCR産物 5ul アプライ, 40分泳動 MultiNA; No.5~8 について 原液を測定



まとめ

ブルセラ症（4類感染症）の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地方衛生研究所（地衛研）でブラインド検体を用いた検査（抗体検査：TAT、遺伝子検出：PCR）について、外部精度管理（検査法・手技等の検証）を実施した。

抗体検出については、うまく結果が出なかったところや**結果の判定方法が誤っている**地衛研も認められた。

遺伝子検出に関しては、**定性試験（菌種同定）は良好**であったが、**検出感度は各地衛研により差**が大きく見られた。

これは、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間でまちまちで、感度に違いが出ているのではないかと推測された。

本来ならば、行政検査対象項目に関しては、使用機器、アガロースについて、統一を図る事が望ましいと考えられた。

ただ、全体的にみて参加21地衛研において、今回の結果のフォローを行うことで、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた

動物由来感染症レファレンスセンター 平成30年度活動予定について

炭疽菌 遺伝子検査 検出限界の算定

国立感染症研究所 獣医科学部
奥谷 晶子

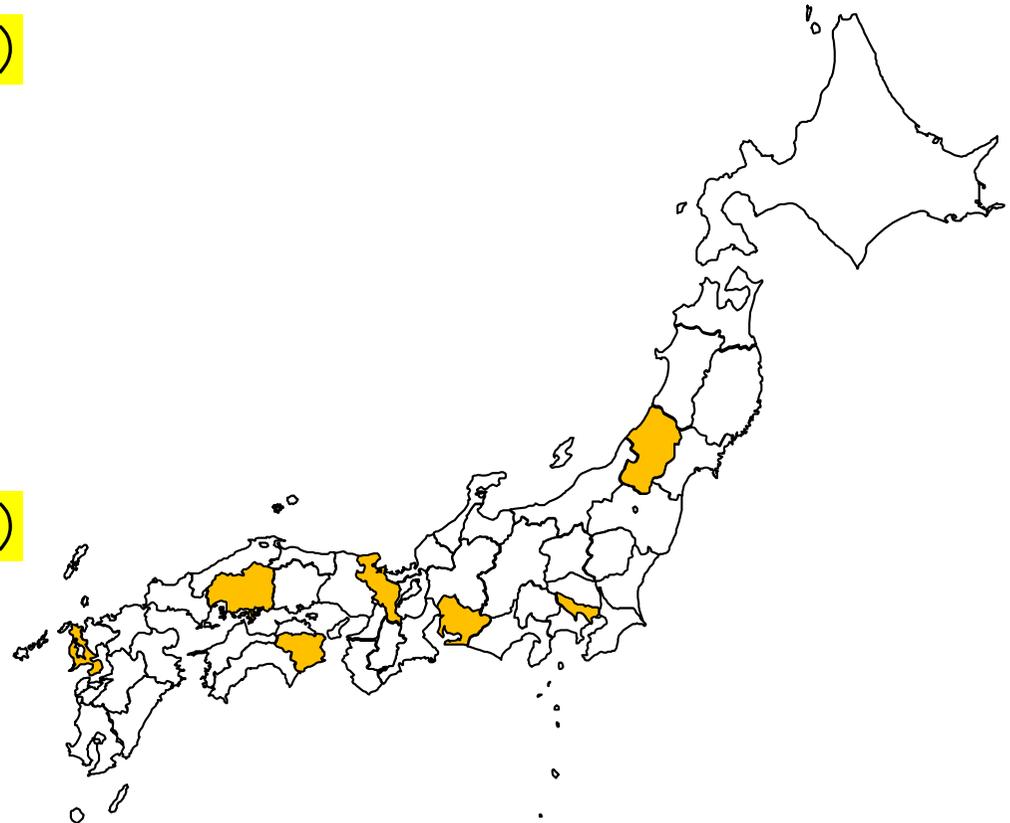
平成24年度および平成25年度 炭疽菌遺伝子検査を実施

平成24年度 参加衛生研究所(5カ所)

- ◆ 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

平成25年度 参加衛生研究所(7カ所)

- ◆ 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
- ◆ 広島県立総合技術研究所保健環境センター
- ◆ 徳島県立保健製薬環境センター
- ◆ 長崎県環境保健研究センター



平成24年度および平成25年度 炭疽菌遺伝子検査を実施

平成24年度

ブラインド・テスト

炭疽菌および近縁菌種由来のDNAを用いたconventional PCR法による遺伝子検出

目的

地方衛生研究所 自前の所有機器および試薬で検査を行えるかを確認する

平成25年度

検出限界算定

炭疽菌由来DNAの段階希釈液を用いたconventional PCR法による遺伝子検出限界の算定

目的

DNAおよびプライマーを配布して各研究所の所有機器での検出限界を算定する

今後の予定

今年度後半～

炭疽菌および近縁菌DNA溶液、PCRプライマーの配布
EQAの実施

白い粉検体の取り扱い要領の作成
アンケートなどにより改訂を加える

希望があれば

枯草菌芽胞液を配布し各研究所で
芽胞の取り扱いを実習

(DNA抽出、白い粉を模した実習、汚染度の測定など)