牛血液および筋肉に添加した炭疽菌 DNA の直接検出

松根 渉[†]

滋賀県食肉衛生検査所 (〒523-0012 近江八幡市武佐町348-1)

(2003年3月5日受付・2003年7月3日受理)

要 約

牛血液および筋肉に炭疽菌パスツールⅡ菌株を添加し、PA遺伝子および*capA*遺伝子を標的としたnested PCRによる炭疽菌DNAの直接検出法を検討した。DNAの精製を簡易かつ迅速に行う目的で、細胞破砕機およびスピнкаラムを使用したところ、検出感度、所要時間ともに良好な結果を得た。すなわち、血液では 10^4 cfu/ml以上、筋肉では 10^5 cfu/g以上の添加菌量で、それぞれ目標とする分子量のDNA増幅産物が得られ、その判定所要時間はともに約4時間であった。本法をアスコリーテスト、ファージテスト、細菌培養等の従来の診断法と組み合わせて、牛炭疽の診断に用いることは有効と思われる。——キーワード：炭疽菌、牛、細胞破砕、nested PCR、スピнкаラム。

日獣会誌 56, 741～744 (2003)

炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は炭疽の病原体であり、グラム陽性の大型桿菌で芽胞は強い抵抗力を持つ [3-9, 11-14]。わが国では明治から昭和の初期にかけて多数の家畜に炭疽の発生がみられたが、戦後は飼養形態の変化や衛生管理の向上により散発的にみられるにすぎない [5, 8-9]。しかし、諸外国ではアメリカやイギリス、フランス、オーストラリアのような先進国でも発生があり [8-9, 12]、特に中南米、アフリカ、アジア諸国において、その被害は深刻である [8-9, 13]。

炭疽菌は自然環境から牛、馬、めん羊などの草食動物に感染して、急性敗血症死を引き起こすが、まれに雑食獣、肉食獣、人にも感染が成立する [5, 8-9]。人には汚染食肉等、動物を介して感染し、時に死に至る重篤な症状を引き起こす [5, 8-9, 11]。

と畜場で炭疽が発生した場合、と畜場閉鎖、消毒等の行政措置がとられ、公衆衛生上の危害のみならず、経済的にも大きな損失を招く。食肉を介した人への健康被害や農場における被害拡大を事前に防ぐためにも、と畜場における炭疽の迅速な診断はきわめて重要である。今回、炭疽の迅速診断の一助として、nested PCRにより牛の血液および筋肉から炭疽菌DNAを直接検出するための基礎的検討を行った。

材 料 お よ び 方 法

試験用菌株：当所保存の炭疽菌パスツールⅡ菌株 [14] (以下「Ⅱ菌株」) を用いた。

試験用菌株の調整：純培養したⅡ菌株を普通寒天培地に接種し、35℃、18時間好気培養した。培養したⅡ菌株を滅菌綿棒でかきとり、2mlの滅菌生理食塩水に浮遊させ、Ⅱ菌株浮遊原液を作成した。さらに、滅菌生理食塩水で10倍段階希釈を行った。滅菌コンラージ棒を用いて各希釈段階のⅡ菌株浮遊液100μlを普通寒天培地上に均一に塗抹し、35℃、18時間好気培養し、colony forming unit (以下「cfu」) を測定した。作成したⅡ菌株浮遊原液のcfuは 1.0×10^8 cfu/mlであった。

検体：炭疽症状の認められない健康牛血液 (以下「血液」) および耳介筋 (以下「筋肉」) を無菌的に採取して用いた。

検体の調整：Ⅱ菌株浮遊原液を10倍段階希釈し、 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/mlの各希釈浮遊液10μlを990μlの血液に接種しすみやかに混和した。同様に、各希釈Ⅱ菌株浮遊液10μlを滅菌鋏で細切した筋肉100mgと混和し、さらに生理食塩水を加えて全量を1gとした。

対照検体の調整： 2.8×10^8 cfu/mlの*Bacillus cereus* ATCC11778株浮遊液10μlを血液ならびに筋肉にⅡ菌株と同様の方法で添加し、後述のDNA抽出を行い、陰性対照とした。また、 1.0×10^7 cfu/mlのⅡ菌株浮遊原液を100℃、10分間加熱し、遠心分離後の上清を陽性対照とした。

DNA抽出：Cheunら [3]、越山ら [6] の方法を一

a) Q BIO gene, U.S.A.

[†] 連絡責任者：松根 渉 (滋賀県食肉衛生検査所)

〒523-0012 近江八幡市武佐町348-1 ☎0748-37-7037 FAX 0748-37-5854

表1 本実験に供したプライマー一覧

PCR	プライマー	配列	標的遺伝子	増幅サイズ
1st	PA8	5'-GAGGTAGAAGGATATACGGT-3'	PA	596bp
	PA5	5'-TCCTAACACTAACGAAGTCG-3'	PA	
2nd	PA7	5'-ATCACCAGAGGCAAGACACCC-3'	PA	210bp
	PA6	5'-ACCAATATCAAAGAACGACGC-3'	PA	
1st	MO11	5'-GACGGATTATGGTGCTAAG-3'	<i>capA</i>	572bp
	MO12	5'-GCACTGGCAACTGGTTTTG-3'	<i>capA</i>	
2nd	BA547	5'-GCTGATCTTGACTATGTGGGTG-3'	<i>capA</i>	267bp
	BA546	5'-GGCTTCCTGTCTAGGACTCGG-3'	<i>capA</i>	

図1 血液に炭疽菌を添加した時のPA遺伝子（上段）および*capA*領域遺伝子（下段）を標的としたPCRの結果
 レーンM, 100bp DNA ladder (宝酒造, 滋賀); レーンP, 陽性コントロール; レーン1, II苗株 10^5 cfu/ml血液;
 レーン2, II苗株 10^4 cfu/ml血液; レーン3, II苗株 10^3 cfu/ml血液; レーンN, 陰性コントロール,

部改変した。すなわち、菌体DNAの抽出を容易にする目的で、II苗株を混和した血液1mlをFast Prep^{a)}を用いて5.0m/秒、30秒の条件下で血液細胞とともに、II苗株細胞を破碎した。また、上記筋肉検体1gを血液の場合と同様に破碎し、10%乳剤を作製した。次に、Dneasy Tissue Kit^{b)}を使用して、破碎血液100 μ l、筋肉の10%乳剤100 μ lをそれぞれ、タンパク質溶解のためにproteinase K (同キットに添付)で70℃、10分間処理した後、DNA精製用のスピニングカラム (同キットに添付)に添加し、テンプレートを作成した。なお、テンプレートは最終的に100 μ lに溶出した。

プライマー: 表1に示すとおり、Cheunら [3] の用いた感染防御抗原 (以下「PA」) 遺伝子および莢膜形成に必要とされる莢膜領域を構成する遺伝子 (*capB*, *capC*ならびに*capA*) のうち*capA*を増幅対象とするプ

ライマーをカスタム合成^{c)}して用いた。

1st PCR: 1検体あたりの各プライマー量は20pmol、テンプレート量は10 μ lとし、HS Taq polymerase^{c)}とその添付試薬を使用説明書にしたがって混合し、反応液を最終的に50 μ lとした。DNA増幅にはTaKaRa PCR Thermal Cycler MP^{e)}を用い、95℃・2分で熱変性した後、95℃・15秒 (熱変性)、60℃・15秒 (アニーリング)、72℃・30秒 (伸張反応) を1サイクルとして35サイクル繰り返した後、72℃・5分で伸張反応を行った。

2nd PCR: 1st PCRの反応液1 μ lをテンプレートとし、1st PCRと同様の条件下で実施した。

電気泳動: TBEバッファー^{d)} (1N, pH 8.0) で調整し

b) Qiagen, Germany. c) 宝酒造(株), 滋賀。

d) ナカライテスク(株), 京都。 e) Molecular Probes, U.S.A.

f) FMC Bio Products, U.S.A.

図2 筋肉に炭疽菌を添加した時のPA遺伝子（上段）および*capA*領域遺伝子（下段）を標的としたPCRの結果
 レーンM, 100bp DNA ladder（宝酒造，滋賀）；レーンP, 陽性コントロール；レーン1, II 苗株 10^6 cfu/g 筋肉；
 レーン2, II 苗株 10^5 cfu/g 筋肉；レーン3, II 苗株 10^4 cfu/g 筋肉；レーンN, 陰性コントロール。

た0.1%のSYBR GREEN I®を含む2% NuSieve3 : 1 アガロース¹⁾で反応液を100V, 30分間電気泳動後, 254nmの紫外線照射下で増幅産物の確認を行った。

なお, 炭疽菌芽胞の残存による汚染を防止するため, 滋賀県食肉衛生検査所病原体等安全管理規程に従い, 試験用菌株や検体の調整, DNA抽出に用いた器具や廃液は121℃・30分の高圧蒸気滅菌を行った。

成 績

血液を検体として行ったPCRのうち, PA遺伝子及び*capA*遺伝子の泳動像を図1に示した。筋肉を検体として行ったPCRのうち, PA遺伝子及び*capA*遺伝子の泳動像を図2に示した。

血液の場合, 1st PCRではII 苗株の添加菌量が 10^5 cfu/ml以上, 2nd PCRでは 10^4 cfu/ml以上で, それぞれ目標とする分子量のDNA増幅産物が得られた。

筋肉の場合, 1st PCRではII 苗株の添加菌量が 10^6 cfu/g以上, 2nd PCRでは 10^5 cfu/g以上で, それぞれ目標とする分子量のDNA増幅産物が得られた。

DNA抽出から写真撮影までに要した時間は1st PCRで約2.5時間, 2nd PCRで約4時間であった。

考 察

本法では血液検体1ml中の100 μ lをDNA抽出に供し, 最終的に100 μ lに溶出したテンプレート10 μ lを1st PCRに用いているため, 血液1mlあたりの添加菌量の100分の1がPCR反応液中に存在していると考えられ

る。同様に, 筋肉100mgを用いて作製した10%乳剤1ml中の100 μ lをDNA抽出に供し, 100 μ lに溶出したテンプレート10 μ lを1st PCRに用いているため, 筋肉1gあたりの添加菌量の1000分の1がPCR反応液中に存在していると考えられる。すなわち, 血液および筋肉ともにPCR反応液中に1st PCRでは約 10^3 cfu, 2nd PCRでは約 10^2 cfuに相当するII 苗株由来のDNAが存在すれば, 検出が可能であった。

本法はと畜場における牛炭疽の簡易, 迅速かつ実用的な診断法を検討する目的で, 細胞破碎機, 遠心分離機, PCR機, 電気泳動槽等の機器を用いて検討した。従来, 強固な細胞壁をもつグラム陽性菌であるとともに芽胞形成菌である炭疽菌から高純度のDNAを抽出するにはSDS処理等の複雑な過程が必要であった[7]。しかし, Cheunら[3]は, 炭疽菌を添加した豚肉および豚腸管膜リンパ節を検体として破碎を行った後に, フェノール・クロロホルム処理やエタノール沈殿を行って炭疽菌DNAを精製し, PCRを実施して, 迅速に目的とする増幅産物を得ている。Mullerら[10]は溶解が困難な細胞壁や芽胞を持つ酵母や真菌を対象に細胞破碎を行った後にPCRを実施し, 従来法と比較して所要時間, 検出感度ともに良好な結果を得ている。また, 安部ら[1], 安形[2], 越山ら[6]は検体からPCR阻害物質を除去するとともに, DNAの精製をより簡易かつ迅速に行うために, 従来のフェノール・クロロホルム処理, エタノール沈殿に替えて, スピнкаラムを用いるDNA精製キットを使用している。本法でも細胞破碎, proteinase K

によるタンパク質溶解を行った後、豚材料からの炭疽菌DNA直接検出に対して良好な成績が報告されているDNA精製キット [6] を用いて炭疽菌DNAの精製を行った。その結果、感染マウス材料からの炭疽菌DNAの直接検出を行ったMakinoら [7]、豚材料からの炭疽菌DNAの直接検出を試みた越山ら [6] の成績と比較して、本法の検出感度はほぼ同程度であった。炭疽菌に対して感受性の高い牛等の動物が炭疽によって死亡する際の菌量は血液1mlあたり $10^7 \sim 10^8$ 個と言われており [8-9]、本法で得られた検出感度から、本法は牛炭疽の診断に有効と思われた。

越山ら [6] は炭疽の従来の診断法であるアスコリーテスト、ファージテストとPCRとの検出感度、所要時間の比較を行い、アスコリーテスト、ファージテストによる炭疽菌の検出感度は豚血液、脾臓、回腸、回盲リンパ節各1mlもしくは1gあたり、いずれもそれぞれ 10^8 cfuおよび 10^6 cfu程度であること、また、採材から判定までの所要時間はアスコリーテストでは30分程度だが、ファージテストでは一昼夜必要であることから、PCRが従来の診断法と比較して、検出感度および判定所要時間ともに優れていることを指摘している。Makinoら [7] はPCRの特異性を証明するとともに、アスコリーテスト、ファージテストは*Bacillus licheniformis*、*Bacillus megaterium*等で偽陽性反応が起こりうることを指摘している。また炭疽菌を含まず、*Bacillus subtilis*を含む粉末を材料としPA遺伝子を標的としたPCRにおいて、分子量が標的遺伝子のそれと区別できない非特異的増幅産物が確認された事例が報告されている [4] ことや、PCRでは対象菌の生死に関わらず、標的塩基配列が検体中に存在していれば陽性を示す可能性があることから、本法を単独で確定診断に用いるので

はなく、アスコリーテスト、ファージテスト、細菌培養等の従来の診断法と組み合わせて、総合的に牛炭疽の診断に用いることは有効と思われた。

謝辞：DNA精製およびPCRについて、貴重なご助言をいただいた帯広畜産大学牧野壯一博士に深謝する。

引用文献

- [1] 安部仁一郎, 木俣 勲, 井関基弘: 感染症誌, 76, 921-927 (2002)
- [2] 安形則雄: 日食微誌, 17, 19-21 (2000)
- [3] Cheun HI, Makino S-I, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K: J Appl Microbiol, 91, 421-426 (2001)
- [4] Fujita O, Inoue S, Tatsumi M, Kamiyama T, Akaishi S, Ootani T, Kawai T, Hirochi T, Sakamoto Y, Tamura K, Watanabe H, Yamada A: Jpn J Infect Dis, 55, 99-100 (2002)
- [5] 川名林治: 感染症誌, 76, 1-8 (2002)
- [6] 越山祐美子, 山田英清, 斎藤 聡, 大谷順子, 工藤 潔: 獣医公衆衛生研究, 5-1, 23-24 (2002)
- [7] Makino S-I, Iinuma-Okada Y, Maruyama T, Ezaki T, Sasakawa C, Yoshikawa M: J Clin Microbiol, 31, 547-551 (1993)
- [8] 牧野壯一: モダンメディア, 45, 251-257 (1999)
- [9] 牧野壯一: 日食微誌, 18, 111-119 (2001)
- [10] Muller F-MC, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock S J, Walsh TJ: J Clin Microbiol, 36, 1625-1629 (1998)
- [11] 名取徳彦: 臨床と研究, 71, 2635-2637 (1994)
- [12] Patra G, Vaissaire J, Weber-Levy M, Le Doujet C, Mock M: J Clin Microbiol, 36, 3412-3414 (1998)
- [13] Smith K L, De Vos V, Bryden H, Price L B, Hugh-Jones M E, Keim P: J Clin Microbiol, 38, 3780-3784 (2000)
- [14] Uchida I, Sekizaki T, Hashimoto K, Terakado N: J Gen Microbiol, 131, 363-367 (1985)

Direct and Rapid Detection of *Bacillus anthracis* DNA Added to Cattle Blood and Meat

Wataru MATSUNE[†]

Shiga Prefectural Meat Inspection Office, 348-1 Musa, Omihachiman, 523-0012, Japan

SUMMARY

Bacillus anthracis Pasteur II cells were added to cattle blood and meat to investigate a direct, rapid method for detecting DNA by means of nested PCR targeting the PA and *capA* genes. In preparing the samples for nested PCR, a cell disrupter and spin columns proved effective. It was possible to detect target DNA amplicons from 1 ml of blood containing 10^4 cfu and from 1 g of meat containing 10^5 cfu. DNA detection required only 4 hours. In association with such bacteriological methods as the ascoli test, the phage test, and bacterial culture, this simple, speedy system can be useful for diagnosis of cattle anthrax.

— Key words : *Bacillus anthracis*, cattle, cell disruption, nested PCR, spin column.

[†] Correspondence to : Wataru MATSUNE (Shiga Prefectural Meat Inspection Office)

348-1 Musa, Omihachiman, 523-0012, Japan TEL 0748-37-7037 FAX 0748-37-5854

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 56, 741 ~ 744 (2003)