

PCR法を利用した豚丹毒の補助診断について

四日市市食肉衛生検査所 平田 真貴子 東山 陽子 氏家 隆久

1 はじめに

豚丹毒は主に豚丹毒菌によって起こり、当所でも豚の全部廃棄処分となる主要な疾病となっており、現在、保留日より3日目に菌形やコロニー形態により判定を行っている。しかし、菌形での判定が難しい菌が分離される場合があること 同定は生化学性状検査によって行っているが、保留畜判定の後になること PCR法等の迅速検査法を導入する食肉衛生検査所が増えてきていることなどから、豚丹毒の診断法を再検討する必要があると考えられた。そこで今回より迅速、かつ正確に豚丹毒を同定するための補助診断としてPCR法を用いて検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

2 材料及び方法

(1) 検体

平成19年3月から平成20年2月にA食肉センターに搬入され、と畜検査で豚丹毒の疑いで保留検査対象となった豚122頭の病変部を材料とした。関節炎型(66頭)は関節液、蕁麻疹型(47頭)は皮膚病変部3ヶ所、心内膜炎型(9頭)は疣状病変部を材料とした。

(2) 細菌培養検査

検査手順を図1に示す。増菌培地にはGKブイヨン(トリプトソイブイヨンにトリスヒドロキシメチルアミノメタン、Tween80、窒化ナトリウム、クリスタルバイオレット、ゲンタマイシン、カナマイシンを加えた培地)を、分離培地には5%羊血液加寒天培地を使用した。分離菌はグラム染色および各種生化学性状検査により豚丹毒菌と同定した。

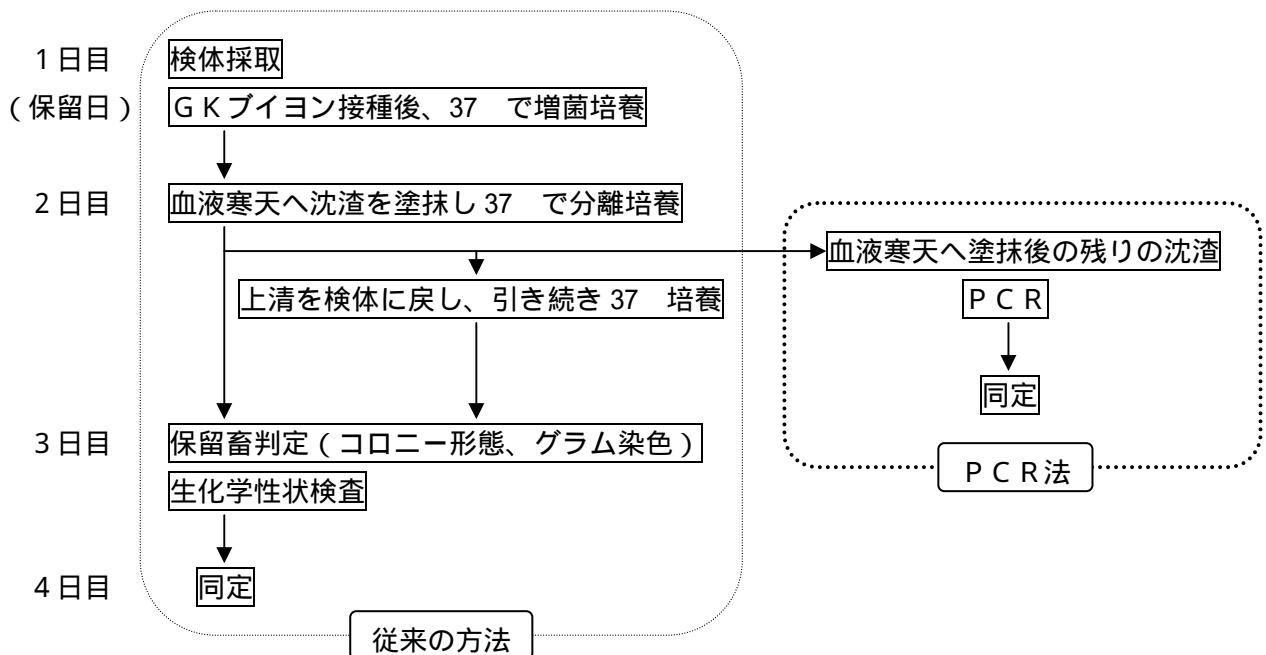


図1 豚丹毒検査フローチャート

(3) PCR法

牧野らの方法(1994)に準拠し、豚丹毒菌に属特異的なPCRを実施した。37℃1日の増菌培養後のGKブイオンを3000rpm、15分で遠心分離し、沈渣を血液寒天培地に塗抹した後、残りの沈渣を滅菌蒸留水500μlで浮遊させた菌液を検体とした。これを12000rpm、5分遠心し、上清を除去した後、ペレットをInstaGene Matrix(Bio-Rad)200μlに再浮遊させ、56℃、30分加熱した。ボルテックスで10秒混和した後、100℃、8分加熱し、氷冷、再混和後、12000rpm、5分遠心して得られた上清をテンプレートDNAに用いた。使用したプライマーの塩基配列を表1に、PCR反応液の組成を表2に示す。反応液は事前に調整し、-20℃で凍結保存していたものを使用した(調整済反応液)。調整済反応液に添加するテンプレートDNA量が1μlの方法を牧野法1、添加テンプレートDNA量が10μlの方法を牧野法2とした。94℃1分反応後、94℃1分、54℃2分、72℃2分の反応を30サイクル行い、最後に72℃7分の反応を実施した。PCR後、エチジウムブロマイドを添加した3%アガロースゲルで電気泳動を行い、407bpのDNA断片が特異的に増幅された被検材料をPCR陽性と判定した。

表1 使用したプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列(増幅サイズは407bp)
M0101	5' -AGATGCCATAGAACTGGTA-3'
M0102	5' -CTGTATCCGCCATAACTA-3'

表2 PCR反応液の組成

成分	用量(25μl中)	
	牧野法1	牧野法2
滅菌蒸留水	17.675μl	8.675μl
10×PCR buffer	2.5μl	2.5μl
25mM MgCl ₂	1.5μl	1.5μl
各2.5mM dNTP mix	2.0μl	2.0μl
プライマー M0101(50pmol/μl)	0.1μl	0.1μl
プライマー M0102(50pmol/μl)	0.1μl	0.1μl
AmpliAq DNAポリメラーゼ(5U/μl)	0.125μl	0.125μl
計	24μl	15μl
テンプレートDNA	1μl	10μl

3 成績

細菌培養検査とPCR法の結果を表3に示す。

牧野法1では、122検体のうち112検体(91.8%)で細菌培養とPCR法の成績が一致した。しかし、菌が分離されたにもかかわらず、PCRでは陰性の例が10検体あった。これらのうち7検体はGKブイオン1日培養後の沈渣を塗抹した血液寒天培地の1日培養ではコロニーを形成せず、GKブイオン

2日培養後の沈渣のグラム染色標本の鏡検で菌体が確認され、豚丹毒と判定された。残りの3検体は血液寒天培地上にコロニーを形成したが、その数は少数であった。

牧野法2では111検体のうち107検体(96.4%)で細菌培養とPCR法の成績が一致した。牧野法1で菌分離陽性、PCR陰性となった10検体のうち、牧野法2では8検体でPCR陽性となったが2検体ではPCR陰性であった。

また、牧野法2ではPCRは陽性であるが、菌が分離されなかった例が2検体あった。

なお、検出限界値は、牧野法1では 10^4 個/ml、牧野法2では $10^2 \sim 10^3$ 個/mlであった。

表3 細菌培養検査とPCR法結果

	菌培養(+)	菌培養(-)		菌培養(+)	菌培養(-)
PCR(+)	61	0	PCR(+)	65	2
PCR(-)	10	51	PCR(-)	2	42
牧野法1 (検体数 122)			牧野法2 (検体数 111)		

4 考察

細菌培養検査で菌が分離されたにもかかわらずPCR法では陰性の検体は、PCR法の検出感度以下であったと考えられた。しかし、牧野法2の検出感度は牧野法1より10~100倍高いため、牧野法1でPCR陰性であった10検体のうち、牧野法2では8検体で陽性になった。

また、牧野法2でPCR陽性、菌分離陰性となった2検体のうち1検体を保留畜判定後もGKブイヨンで37~8日間継続培養したが、菌は分離されなかった。このことから、この2検体では損傷菌または死菌のDNAをPCR法により検出した可能性が高いと考えられた。

しかし、どちらの方法ともPCR法と細菌培養検査成績との一致率は90%を超えており、PCR法を補助診断として利用することで保留畜判定時までに同定結果が得られ、より精度の高い確実な判定結果が得られる検査手順が確立できると考えられた。

現在、当所では通常の検査手順の中にPCR法を導入することを検討中であるが、牧野法1では反応液に添加するテンプレートDNAが $1\mu\text{l}$ とごく微量であるために、手技によって検査結果にばらつきが出やすい欠点がある。当所のように試験室検査が専任ではなく、多人数が当番制で担当するような検査体制の場合は、安定した結果が得られ、細菌培養検査とPCR法の結果の一致率もより高い牧野法2の方が適していると思われる。しかし、牧野法2は今回の試験でも、111検体中2検体(1.8%)で菌分離陰性、PCR陽性となったように、判定に混乱をきたす恐れがあるため、牧野法2を利用する場合には「豚丹毒の保留畜判定は、細菌培養検査の結果によるべきであり、PCR法は同定目的の補助診断」という基本方針を試験室担当者全員が理解している必要があると考えられた。

5 引用文献

- (1) 牧野 壮一ら J.Clin.Microbiol.32,1526-1531 (1994)