

コンベンショナルPCRによる豚丹毒の迅速診断について

堀口 萌・後藤郁男

宮城県食肉衛生検査所

要 約

と畜検査において、豚丹毒の診断には分離培養法が用いられるが、判定までに数日を要する。このため、迅速診断法の構築が求められており、今回、病変部由来検体から豚丹毒菌のDNAを直接抽出することで、短時間で判定可能なコンベンショナルPCRを用いた方法について検討した。その結果、心内膜炎型および蕁麻疹型では、分離培養法に対する感度は100%であり検査方法として十分実用可能であると考えられた。一方、関節炎型では関節液を遠心分離し集菌した場合の感度が77.3%であり、一部で分離培養法による判定と異なる例も認められたものの、ほぼ実用可能であると思われた。

以上より本法は、関節炎型において検証すべき課題はあるものの、分離培養法と比較して手技の簡便さ、所要時間の短縮等のメリットから検査開始当日に診断に供することができる実用性が高まったと考えられた。

I. はじめに

豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix*属菌) の感染によって起こり、その病型により敗血症型、蕁麻疹型、心内膜炎型および関節炎型に分類される¹⁾。また、本病は人獣共通感染症であり、人に皮膚疾患や敗血症を起こすことから公衆衛生上も重要な疾病である²⁾。当所が管轄すると畜場では、関節炎型を主体とする慢性型症例が多く発見され、これらは分離培養法による陽性判定により全部廃棄処分とされる。判定を行うまでの数日間、当該枝肉は出荷保留となり冷蔵庫内で保管される。分離培養の結果、陰性判定となった枝肉においても数日後に出荷することとなることから、品質保持の観点において、保留期間短縮に向けた迅速な診断法の構築が求められている。

そこで今回、病変部由来検体から豚丹毒菌のDNAを直接抽出する、簡便かつ迅速な方法を検討し、汎用されるPCR (コンベンショナルPCR) を用いて、その感度と特異度を評価した。また、当所に

おける豚丹毒精密検査件数の推移と判定に要した日数を把握するため、過去の検査記録について調査したので併せて報告する。

II. 材料および方法

1 豚丹毒精密検査状況の調査

2011年から2015年までの豚丹毒検査記録により、精密検査件数および全部廃棄件数、ならびに判定までに要した日数について集計した。

2 PCR法

(1) 検体

当所において2015年4月から2016年3月に豚丹毒を疑い精密検査を実施した豚85頭 (関節炎型56頭、心内膜炎型16頭、蕁麻疹型13頭) を対象とした (ただし、関節炎型は2015年12月まで)。検体は関節炎型では無菌的に採取した関節液、心内膜炎型では疣贅部、蕁麻疹型では皮膚または皮下組

組織を用いた。また、関節液200μlを12,000rpmで10分間遠心分離し、上清180μlを抜去後の残液20μlを遠心集菌液とした。

(2) 豚丹毒菌のDNA抽出

DNA抽出試薬 (MightyPrep reagent for DNA、Takara) に病変部由来検体20μl (心内膜炎型および蕁麻疹型においては細切した組織片適当量) を混合し、95℃で10分間加熱後12,000rpmで2分間遠心した。

(3) コンベンショナルPCR

Makinoらの方法³⁾ に準拠し *Erysipelothrix* 属を標的としたPCR法⁴⁾ を実施し、407bpのDNA断片が特異的に増幅された検体をPCR陽性と判定した。

3 PCR検出限界

DNA抽出試薬の抽出効率が不明であったため、PCR検出限界を以下により算定した。

はじめに、当所において過去に分離した豚丹毒菌株を用いて、生菌数が 1×10^6 CFU/mlの菌液を調整し、これを原液とした。この原液を10倍から 10^5 倍まで生理食塩水を用いて段階希釈し、同様に、豚丹毒菌陰性の関節液についても段階希釈を行った。これらの各希釈液を用いて上記2-(2)(3)と同様のPCR法を実施した。なお生菌数は、各希釈液を血液寒天培地に塗抹し、48時間培養後にコロニー数を計測することにより求めた。

4 PCR法の感度と特異度

分離培養法に対するPCR法の感度 (PCR陽性件数/分離培養法陽性件数)、特異度 (PCR陰性件数/分離培養法陰性件数) および一致率 (分離培養法とPCRの結果が一致した件数/全件数) を算出した。

Ⅲ. 結 果

1 当所における豚丹毒精密検査状況について

2011年から2015年までに本病を疑い精密検査を実施した件数は年々増加傾向にあり、2015年は2011年の3倍以上 (計107件) に及び、全部廃棄となった件数においては約6倍の49件に達していた (図1)。また、判定に要した日数は平均4.1日であった。

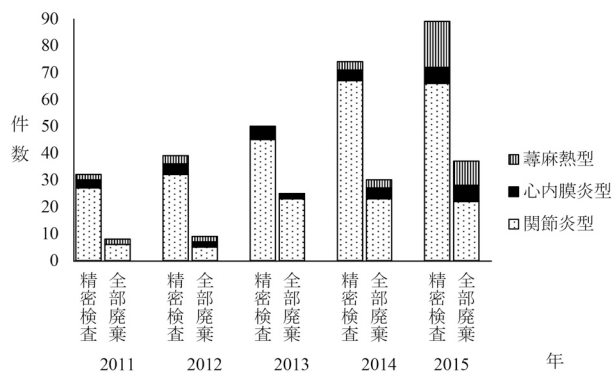


図1 当所における2011年から2015年までの豚丹毒精密検査件数および全部廃棄件数

2 PCR検出限界

PCR検出限界は、生理食塩水を用いた希釈で 1×10^1 CFU/mlの菌数まで、関節液を用いた希釈で 1×10^2 CFU/mlの菌数までであった (図2)。

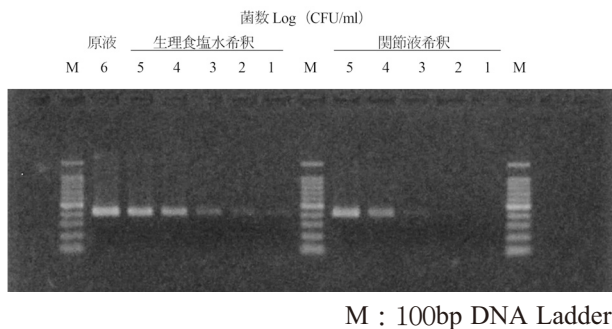


図2 PCRの検出感度試験

3 PCR法の感度と特異度

分離培養法に対するPCR法の感度、特異度および一致率を表1に示す。

表1 各病型の分離培養法に対するPCR法の感度と特異度

病型	感度 [%]	特異度 [%]	一致率 [%]	検体数
関節炎型 (関節液)	18.2 (4/22)	100 (34/34)	67.9 (38/56)	56
関節炎型 (遠心集菌液)	77.3 (17/22)	88.2 (30/34)	83.9 (47/56)	56
心内膜炎型	100 (16/16)	— (0/0)	100 (16/16)	16
蕁麻疹型	100 (7/7)	100 (6/6)	100 (13/13)	13

Ⅳ. 考 察

本法は、病変部由来検体からDNAを直接抽出でき、短時間で判定できることが大きなメリットである。心内膜炎型および蕁麻疹型においては、検体数

が少ないものの、分離培養法に対するPCR法の感度は100%であった。特異度についても蕁麻疹型では100%であり検査方法として十分実用可能と考えられた。

一方、関節液を検体とした場合の感度は18.2%にとどまり、検討の必要性を認めた。そこで、DNA抽出効率が不明であった新しいDNA抽出試薬のPCR検出限界を算定した結果、関節液を用いた希釈で 1×10^2 CFU/mlの菌数まで検出できることが確認された。このことは、各種のDNA抽出法を検討した高橋らの報告⁵⁾と同様であったことから、抽出効率に問題はないことが示された。さらに、関節炎型罹患豚の関節液1 ml中には豚丹毒菌が生菌数として $10^1 \sim 10^3$ CFU程度しか存在しないと報告されていることから²⁾、より一層感度を高めるために関節液を遠心集菌した結果、感度は77.3%まで大きく改善され、検査方法としてほぼ実用レベルにまで達したと考えられた。しかし、分離培養法で陽性、遠心集菌後のPCRで陰性と、結果が相異なる例が認められたため、今後要因を特定すべく検証も必要である。

また一般に、タンパク質濃度が高い検体や血液を含む検体の場合、PCRは検体中の阻害物質の影響を

受けるとされているが、今回使用したDNA抽出試薬は血液を含む体液や組織の影響を受けることなく、PCR効率は優れていることが確認された。

以上により本法は、関節炎型において検証すべき課題はあるものの、分離培養法と比較して、手技の簡便さ、所要時間の短縮等のメリットから精密検査開始当日に診断に供することができる実用性が高まったと考えられた。今後はさらに枝肉の商品価値の保持および、と畜検査の迅速化・効率化等の有用性をふまえ、行政処分に供する検査法として確立されるべく詳細な方法を検討していきたい。

引用文献

- 1) 高橋敏雄、澤田拓士 (1999) 豚病学第四版－生理・疾病・飼養－柏崎守ら編、342-352
- 2) 岡谷友三アレシャンドレ、加藤行男、林谷秀樹 (2007) 豚丹毒とは－古くて新しい人獣共通感染症－、モダンメディア、53、231-237
- 3) Makino S, Okada Y, Maruyama T et al. (1994) Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR, J Clin Microbiol, 32, 1526-1531
- 4) 全国食肉衛生検査所協議会微生物部会 検査実施標準作業書 (2011改訂)、40-47
- 5) 高橋敏雄、高木裕、新田早人ら (2007) PCR法による関節炎型豚丹毒罹患豚の関節液からの豚丹毒菌の迅速検出、JVM、60、311-316