

研 究

新規に設計したプライマーを用いたPCR法による
関節炎型豚丹毒の迅速診断法の検討高橋 巧[※]・荻原 康則

宮城県食肉衛生検査所

※現所属 宮城県東部保健福祉事務所

要 約

と畜検査で関節炎型豚丹毒の診断は分離培養法により行われているが、判定まで数日を要するため、迅速診断法が求められている。このため、新規に設計したプライマーを用いて、PCR法による関節炎型豚丹毒の診断を試みた。その結果、リアルタイムPCRで豚丹毒菌DNAコピー数を定量し、200コピー／ウェルを基準に判定すれば、豚丹毒菌培養陽性関節液の83.3%がPCR陽性、豚丹毒菌培養陰性関節液の100%がPCR陰性と高い割合で培養法とPCR法の結果が一致した。

新規に設計したプライマーを用いたリアルタイムPCR法は、関節炎型豚丹毒の迅速診断に寄与するものと考えられた。

Ⅰ. はじめに

豚丹毒は、豚丹毒菌（*Erysipelothrix*属菌）による感染症である。敗血症型、心内膜炎型、蕁麻疹型、関節炎型を示すことが知られており、と畜検査で全部廃棄の原因の上位を占めている¹⁾。豚丹毒菌はヒトにも類丹毒と呼ばれる疾患のほか、心内膜炎をまれに引き起こすため、公衆衛生上も重要である²⁾。

関節炎型豚丹毒の検査は、細菌培養により行われ、行政処分に至るまで4～5日を要する。この間、対象となった枝肉は保管されるため、最終的に合格判定となる場合、枝肉の衛生保持に問題を残し、迅速な検出法が望まれている。このため、筆者らはリアルタイムPCR法を用いることを視野に入れ、豚丹毒菌を検出するプライマーを新規に設計した³⁾。今回、これらのプライマーについて、実際に細菌を用いて検出範囲および特異性を確認するとともに、コンベンショナルPCR法およびリアルタイムPCR法による豚関節液からの豚丹毒菌遺伝子検出および豚丹毒診断について検討したので概要を報告する。

Ⅱ. 材料および方法

1 供試菌株

当所の検査で分離培養された豚丹毒菌野外株8株を用いてPCR法の豚丹毒菌遺伝子検出の可否により適用の範囲を検討した。この8株は過去の検討により出現したRAPDパターン全て（5パターン）を網羅し、互いに異なる農場に由来した。また、豚丹毒菌以外で豚の敗血症や関節炎の原因菌を含む7種7株の細菌についても試験に供し、検出の特異性について検討した（表1）。

表1 豚丹毒菌以外に検討した細菌

菌名	由来
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Streptococcus suis</i>	豚由来野外株
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19112、宮城県保健環境センター提供
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	由来不明、宮城県仙台家畜保健衛生所提供
<i>Haemophilus parasuis</i>	豚由来野外株、宮城県仙台家畜保健衛生所提供
<i>Pasteurella multocida</i>	豚由来野外株、宮城県仙台家畜保健衛生所提供

2 関節液

関節炎を呈した豚の関節液のうち、培養検査で豚丹毒菌陽性を示した検体（以下培養陽性検体）12検体、陰性を示した検体（以下培養陰性検体）12検体を試験に供した。これらの関節液10μlに市販のDNA抽出試薬（Mighty prep；タカラ社）90μlを加え、100℃で5分加熱、14000rpmで2分遠心し、上清をDNAテンプレート溶液としてPCRに供した。

3 プライマー

豚丹毒菌野外株の16S-23S rRNAスペーサー領域の塩基配列に基づき設計されたER16S-23S SF、SRおよびER16S-23S TF、TRを用いた³⁾（表2）。

表2 プライマー

プライマー名	配列(5'→3')	増幅産物
ER16S-23S SF	GAGAGTCCGTTGGAATCTCAAG	189bp
ER16S-23S SR	GCTTTGATTGCTTACTTAATTGCTTAAGTTACTG	
ER16S-23S TF	GTAAGCAATCAAGCAAACACACAGC	89bp
ER16S-23S TR	CACATGTAATTCGCGCCC	

4 コンベンショナルPCR

反応溶液はTaKaRa Ex Taq®（タカラ社）を用いて調整した。反応液量は25μl／チューブとし、dNTP各200nM、プライマー各500nM、テンプレートDNA溶液1μlで調製した。反応条件は95℃1分の初期変性後、変性98℃10秒、アニーリング55℃30秒、伸長72℃1分を30サイクル、最終伸長反応を72℃4分間とした。反応後、アガロースゲル電気泳動を実施し、増幅産物のバンドが出現しているものを陽性とした。

5 リアルタイムPCR

市販のプレミックス（SsoAdvanced Universal Inhibitor-tolerant SYBR Green Supermix；バイオラッド社）を用いたインターカレーション法により実施した。各ウェルの反応液量は10μlとし、プレミックス5μl、プライマー各250nM、テンプレートDNA溶液2μlで調製した。リアルタイムPCR装置はEco（イルミナ社）を用い、反応条件は初期変性98℃2分後、変性98℃10秒、アニーリング・伸長60℃20秒

を40サイクル、最終伸長反応60℃1分間とした。反応終了後、融解曲線分析によりPCR増幅産物を確認した。また、同一検体を3ウェル同時に反応・測定し、その平均値をデータとして用いた。

今回用いるプライマーにより増幅されるコピー数が既知のDNA溶液を用いて、 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^7$ コピー／ウェルの範囲で検量線を作成し、関節液検体のDNAコピー数を定量した。また、蛍光強度を測定し、40サイクル終了時の値が0.2以上を陽性、0.2未満を陰性として判定した。

Ⅲ. 結 果

1 プライマーの検出範囲および特異性の検討

コンベンショナルPCRでプライマー ER16S-23S SF、SRおよびER16S-23S TF、TRのいずれを用いた場合でも、8株の豚丹毒菌は全て陽性、7種の豚丹毒菌以外の細菌は全て陰性を示した（図1）。リアルタイムPCRにおいても、8株の豚丹毒菌は全て陽性、それ以外の細菌では全て陰性を示した。

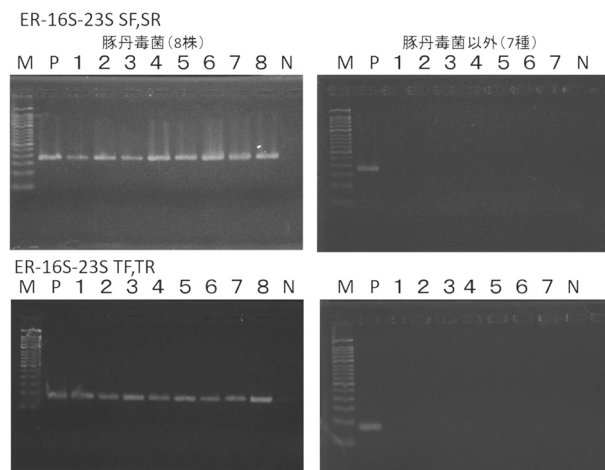


図1 コンベンショナルPCRにおけるプライマーの検出範囲および特異性の検討

2 PCRによる関節液検体の検討

(1) コンベンショナルPCR

コンベンショナルPCRでは、いずれのプライマーを用いた場合でも、培養陽性検体の検出率は16.7%（2/12）、培養陰性検体の検出率は0%（0/12）であった（表3）。

(2) リアルタイムPCR

関節液検体を定量したところ、いずれのプライマーを用いた場合でも、培養陽性検体は培養陰性検体と比較してDNAコピー数が高い傾向であった（図2）。また、プライマー ER16S-23S SF、SRを用いた場合、培養陽性検体では2×102コピー/ウェル以上の割合は83.3%（10/12）、培養陰性検体で2×102コピー/ウェル未満の割合は100%（12/12）であった。プライマー ER16S-23S TF、TRを用いた場合、培養陽性検体では2×102コピー/ウェル以上の割合は58.3%（7/12）、培養陰性検体で2×102コピー/ウェル未満の割合は91.7%（11/12）であった（図2）。蛍光強度により判定したところ、プライマー ER16S-23S SF、SRを用いた場合、培養陽性検体のPCR陽性率は100%（12/12）、培養陰性検体のPCR陰性率は58.3%（7/12）であった。プライマー ER16S-23S TF、TRを用いた場合、培養陽性検体のPCR陽性率は91.7%（11/12）、培養陰性検体のPCR陰性率は8.3%（1/12）であった。

表3 コンベンショナルPCRによる関節液検体の検討結果

ER16S-23S SF, SR		
	培養陽性	培養陰性
PCR陽性	16.7%(2/12)	0%(0/12)
PCR陰性	83.3%(10/12)	100%(12/12)

ER16S-23S TF, TR		
	培養陽性	培養陰性
PCR陽性	16.7%(2/12)	0%(0/12)
PCR陰性	83.3%(10/12)	100%(12/12)

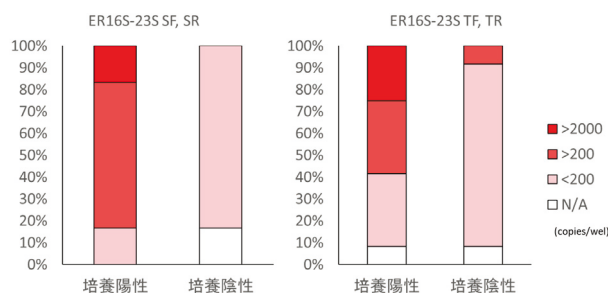


図2 リアルタイムPCRによる関節液検体の豚丹毒菌遺伝子の定量成績

IV. 考 察

今回、新規に設計したプライマーの検出範囲および特異性を検討したところ、豚丹毒菌野外株を幅広く検出する一方、豚の敗血症や関節炎の原因とされる菌を含む他の細菌は検出しないことが確認され、豚丹毒診断に用いることが可能であるとわかった。

コンベンショナルPCRでは培養陽性検体からも豚丹毒菌遺伝子検出率は2割未満であった。これは既存のプライマーを用いた堀口らの報告と同様であり⁴⁾、PCRによる関節液検体中の豚丹毒菌遺伝子検出には、より高い検出率が求められると改めて確認された。

一方、リアルタイムPCRによる豚丹毒菌DNAコピー数による定量の結果では、培養法との関連が認められた。特にプライマー ER16S-23S SF、SRを用いた場合には、本検討で定量下限値とした2×102コピー/ウェルを基準として判定すると、培養法とPCRとの結果はよく一致した。しかしながら、リアルタイムPCRを定量に用いた場合の検量線作成によるコストの増大、検査ごとに多量のDNAを扱うことによるコンタミネーションのリスクの増大を考慮すると、蛍光強度による判定が望ましい。今回検討した条件では蛍光強度による診断は困難であったことから、適切な反応条件の検討は今後とも必要である。

一方、リアルタイムPCRで培養陰性検体からも豚丹毒菌遺伝子が検出された。これは培養可能な細菌を検出する培養法と遺伝子を検出するリアルタイムPCRでは検出機序が異なるためと考えられる。一般に、細菌感染症の診断にPCRを用いる場合には、生菌・死菌の判別が必要であるが、本検討では培養陰性検体での死菌遺伝子含有の有無は不明である。しかし、プライマー ER16S-23S SF、SRを用いた場合、培養陰性検体の全てが2×102コピー/ウェル未満であったことを考慮すれば、判定への利用が可能になることが示唆された。

プライマー ER16S-23S SF、SRとER16S-23S TF、TRを用いた場合の結果には違いがあった。これは、PCRはタンパク質や血液等により阻害されるが、関節液に含有される阻害物質の種類や量が症例ごとに

違うために生じたものと考えられる。

V. まとめ

今回の検討より、新規設計プライマーを用いたリアルタイムPCR法が関節炎型豚丹毒の迅速診断実用に向け可能性が示された。迅速診断が実用に至れば、衛生的な食肉の流通を通じて消費者の利益に貢献するだけでなく、流通業者にとっても保管負担軽減などよい影響を及ぼすことができる。今後とも、より簡便で信頼できる手法の構築に向け尽力したい。

謝 辞

本検討にあたり、細菌を提供していただきました宮城県仙台家畜保健衛生所、宮城県保健環境センターの皆様へ深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 全国食肉衛生検査所協議会編 (2011) 新・食肉衛生検査マニュアル、中央法規出版、225
- 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) 高橋巧、柴田清孝 (2017) リアルタイムPCRを用いた豚丹毒菌の迅速な検出法の検討、獣医公衆衛生研究、20-1 ; 68-71
- 4) 堀口萌、後藤郁男 (2018) コンベンショナルPCRによる豚丹毒の迅速診断について、宮城県獣医師会報、71-1、23-25