

豚丹毒の迅速診断法の検討

病理部門

Investigation of a method for quick diagnosis of swine erysipelas

Division of Pathology

Abstract

A method for quick diagnosis of swine erysipelas is needed, because it takes long time for diagnosis of swine erysipelas by the culture method. In this study, to make a prompt diagnosis, we examined the condition of PCR. The time required for the diagnosis by using PCR was shortened. The detection rate depends on the methods of DNA extraction. The extraction using InstaGene Matrix (BIO-RAD) had best performances. Moreover, in swine affected with arthritis, PCR using DNA extraction with InstaGene Matrix showed the result equivalent to the culture method. InstaGene Matrix was useful for quick diagnosis of swine erysipelas.

Key Words : swine erysipelas 豚丹毒, polymerase chain reaction (PCR) ポリメラーゼ連鎖反応, DNA extraction DNA 抽出

1 はじめに

豚丹毒は豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる感染症である。本菌は豚のほか、人を含む種々の哺乳類や鳥類に感染し、関節炎や敗血症を起こす人獣共通感染症であり、公衆衛生上重要な疾病である。また、と畜場法においてはとさつ禁止・全部廃棄の対象疾病となっている。

豚丹毒の確実な診断は細菌学的検査によって行われる。しかし、従来の培養による検査法では、判定までに最低4日間を要するため、迅速な診断方法が求められている。近年、遺伝学的手法の向上により、様々な疾病の診断に遺伝学的手法が用いられている。特に、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) は手技が簡易で、迅速な診断が可能のため、多くの検査施設で用いられている。

当所においても、疾病の診断にPCRを採用しており、豚丹毒においても補助的診断としてPCRを行っている。このようにPCRは診断を行ううえで、きわめて有用な手法であるが、検体として用いる筋肉や臓器のような生体由来の物質にはPCRを阻害する物質が含まれていることから、正確なPCRを行うためには、これらの阻害物質の除去が重要となる。

今回、豚丹毒の病型の中で、近年増加傾向にある関節炎型豚丹毒において、より迅速な診断を行うために、PCR等条件の検討を行った。また疑豚丹毒畜において応用を試みたので、その概要を報告する。

2 材料・方法

(1) DNA抽出・PCR

健康な豚の内腸骨リンパ節を加えた tween80 加トリプトソイブイオン及びリンパ節を加えない tween80 加トリプトソイブイオンに当所で分離した豚丹毒菌をそれぞれ添加し、24-48 時間培養した。PCR に用いるテンプレートは、培養液、煮沸法、洗浄後煮沸法 (培養液を遠心分離し、上清を除去し、生食に再懸濁後、煮沸法により抽出) 及びインスタジーンマトリックス (BIO-RAD) により抽出した DNA を使用した。PCR は ExTaq (TaKaRa) を用い、添付のプロトコルに従い反応液を調整し、*Erysipelothrix* 属の検出に用いられる Makino ら⁽¹⁾ の設計したプライマーを使用した。プログラムは最初の熱変性を 95°C4 分で行った後、95°C6 秒、54°C6 秒、72°C11 秒を 35 サイクル行い、最後に 72°C5 分インキュベーションを行った。また、PCR のバッファーとして、生体試料中に含まれる PCR 阻害物質の作用を抑制する働きがある Ampdirect (島津製作所) を用いて、PCR を行った。

(2) 疑関節炎型豚丹毒症への応用

2006年4月から2007年3月に京都市と畜場に搬入され、関節炎を呈していた豚について、従来の培養法を行うとともに、インスタジーンマトリックス抽出を用いた PCR 法を行い、有効性を検討した。

3 結果

豚丹毒の検出は 24-48 時間の増菌培養で可能であり、

診断時間の短縮が可能であった。テンプレート DNA 抽出法の違いによる検出率は、インスタジーンマトリックスを使用した場合が最も高く（80%）、培養液及び煮沸法により抽出した場合が最も低かった（0%）。洗浄後煮沸法により抽出した場合は希釈・濃縮倍率により異なり、0-40%であった。PCR バッファーによる検出率に差は認められなかった。

検出率はインスタジーンマトリックスによる抽出法が最もよかったので、関節炎型豚丹毒の PCR に用いる DNA 抽出はインスタジーンマトリックスを用いることとした。得られた DNA を用い、PCR を行い、培養法による検査結果と比較した。PCR と培養法による検出率を表 2 に示した。両者による検出率に差は認められなかった。

表 1 DNA 抽出法による陽性率の違い

テンプレート調整法	陽性率 (%)
培養液原液	0
培養液 10 倍希釈	20
インスタジーンマトリックス	80
煮沸法	0
洗浄後煮沸法	
原液	0
2 倍希釈	40
5 倍希釈	40
10 倍希釈	0
5 倍濃縮	25
10 倍濃縮	0

表 2 従来法及び PCR 法の検出率

		従来法	
		陽性	陰性
PCR 法	陽性	3	0
	陰性	0	21

4 考察

生体由来の PCR 阻害物質としては、ヘモグロビン、脂肪及びタンパク質等がある。関節炎型豚丹毒の場合、検体として関節液、関節絨毛及び内腸骨リンパ節を使用するが、これらの中にも PCR 阻害物質が存在すると考えられる。今回の調査でも、内腸骨リンパ節の PCR に及ぼす阻害作用が顕著に認められ、阻害物質の除去が重要だと考えられた。

煮沸法及び洗浄後煮沸法により抽出した場合、各希釈・濃縮倍率ごとの検出率は低く、PCR 阻害物質の抑制効果はあまり認められなかった。しかし、いずれかの希釈・濃縮倍率で検出できたものは 60%あり、添加したリンパ節の量や脂肪等の成分の違いにより、その後の PCR に最適な希釈・濃縮倍率が異なると考えられた。そのため、煮沸法では、常に PCR に適した DNA 抽出を行うことが困難であると考えられた。インスタジーンマトリックスにより抽出した場合は抑制効果が認められた。さらに、関節炎を呈したと畜に应用した場合においても、培養法と同等の検出率を示した。また、PCR バッファーによる検出率に差は認められず、Ampdirect の PCR 阻害物質の抑制作用は認められなかった。

インスタジーンマトリックスによる DNA 抽出は操作が簡易であり、かつ短時間で行えるため、関節炎型豚丹毒の迅速な判定のために有用であると考えられた。増菌培養後に PCR を用いることにより、豚丹毒の診断が 2-3 日になり、判定期間の短縮が可能となった。今回の調査では、DNA 抽出法として、操作が簡易、短時間及び低コストの手法を用いた。しかし、インスタジーンマトリックスにより抽出した場合でも、豚丹毒菌を完全に検出できなかったため、コストは掛かるがより阻害物質を除去できると考えられるカラム法により DNA 抽出を検証し、検出率の違いを検討する必要があると考えられた。

豚丹毒の最終的な陽性判定は、生化学的性状の確認あるいは単独コロニーからの PCR の結果によると考えるが、増菌培養からの PCR 陰性により、保留と畜の合格判定が可能になれば、保留期間が 1 日となり、経済価値の損失も少なくすることが可能になるため、今後、DNA 抽出法だけでなく、培養方法や PCR 増幅部位の検討をし、検出感度の上昇に努めたい。

5 参考文献

- (1) Makino S., Okada Y., Murayama T., et al. : J. Clin. Microbiol, **32**, 1526-1531 (1994)