

豚丹毒(関節炎型)の PCR 診断法の検討

西村 肇

I. 概要

豚丹毒菌 (*Erysipelothrix* 属菌)は、自然界に広く分布し、種々の哺乳類や鳥類のほか冷血動物からも分離されることが報告されている。養豚業では大きな経済的損失を被ることから、わが国では家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。豚丹毒は、病型により、敗血症型、心内膜炎型、蕁麻疹型及び関節炎型に分類される。また、豚丹毒菌は、人には類丹毒として感染し、まれに心内膜炎を引き起こすため、公衆衛生上重要な細菌である。と畜場では、特に関節炎型が関節周囲の肥厚・硬化や跛行を示し、と畜検査時に発見されることが多い。[1]

と畜検査における豚丹毒検査は、細菌培養を行うため 3~6 日を要する。そのため、合格となった場合の枝肉の品質低下が問題になる。

PCR 法は、微生物分野においては、迅速に菌種の同定を行う有効な方法の一つである。しかし、特定遺伝子を検出することにより菌の同定を行うため、死菌の遺伝子も検出してしまう。このため、試料中に生菌が存在するかどうかについて判定するには、培養する以外に方法はない。

以前実施した調査で、増菌前後の検体で PCR 法を実施することにより、迅速診断の可能性が示唆された[2]。今回は、と畜場で豚丹毒(関節炎型)を疑い精密検査を実施したものをを用いて PCR 法を実施し、当所所定の培養法との結果を比較検討したのでその概要を報告する。

II. 材料及び方法

1. 材料

令和元年 6 月から 12 月までに、当所が所管する M と畜場において豚丹毒(関節炎型)を疑い精密検査を実施した豚 50 頭を対象とした。対象の豚の関節液 1ml を接種したアザイドブイヨンから培養前及び培養後に 500 μ l 採取し検体とした。培養方法は、一晚振盪培養または 48 時間の静置培養を実施した。検体は、必要に応じて 4°C に保存した。並行して、当所既定の培養方法により検査を実施した。

PCR には、Ampdirect® Plus 酵素セット(SHIMADZU)を使用した。

2. 方法

培養前及び培養後に採取した検体 500 μ l を 14,000rpm10 分遠心し、上清を捨て、精製水 500 μ l に再浮遊した。その後、Makinoらにより報告[3]のあったプライマーを用いて、下記条件で PCR を実施し、407bp の特異的なバンドが検出されたものを陽性とした。

PCR 条件:95°C10 分、94°C1 分・52°C2 分・72°C2 分を 30 サイクル、72°C7 分。

プライマー(MO101):5'-AGATGCCATAGAACTGGTA-3'

プライマー(MO102):5'-CTGTATCCGCCATAACTA-3'

III. 結果

PCR および培養結果は表1のとおりであった。

対象となった豚 50 頭中、培養前の検体で PCR 陽性になったものはいなかった。培養後検体では、13 検体が陽性であった。

並行して実施した当所既定の検査では、21 頭(42%)が豚丹毒(関節炎型)と診断され、全部廃棄処分となった。合格となったものは、すべての検体が PCR 法でも陰性であった。

PCR法で陽性となった培養後の13検体は、すべて豚丹毒(関節炎型)と診断された。これは、全体の26%、豚丹毒(関節炎型)と診断されたものの61.9%であった。

豚丹毒(関節炎型)と診断されたもののうち、PCR陰性のものは8検体であった。そのうち、48時間の静置培養を実施したものは、3頭(6%)であった。これらはすべて豚丹毒(関節炎型)と診断されたが、PCR法ではすべて陰性であった。

静置培養した3検体以外の5検体の培養状況を確認すると、増菌培養後の平板培地で48時間までコロニーが形成されないもの、24時間培養でのコロニー数が少ないもの及び再度PCR法を実施したところ陽性を示すものがそれぞれ1検体ずつ確認された。2検体は詳細不明であった。

また、培養法開始から3日目(76時間)までにコロニーが確認できなかったものは1検体で、上記PCR法で陰性となった48時間までコロニーが形成されないものであった。

方法	結果	
培養法	+	21頭(42%)
	-	29頭(58%)
PCR法	+	13頭(26%)
	-	37頭(74%)

* 豚丹毒と判定されたものを「+」とする

表1. 培養法、PCR法の豚丹毒判定結果

IV. 考察

培養前後の検体を用いてPCR法を実施することにより、特定遺伝子の増加の有無から、間接的に菌の有無を確認できると考えた。今回の実験結果と当所で通常行っている培養法の結果比較すると、多くの検体で結果が一致した。すなわち、豚丹毒と診断されたものでは、培養前はPCR陰性、培養後PCR陽性、豚丹毒と診断されなかったものは、培養前後でPCRが陰性であった。これは、本方法が豚丹毒の迅速診断が可能であることを示唆している。

一方、培養前後の検体のPCR法は陰性を示したものの、培養法で菌が確認され、豚丹毒と診断されたものが8検体あった。これは、PCR法では豚丹毒を見逃してしまう可能性を示唆しており、対策が必要と考える。

分離培養で豚丹毒菌が検出されたにも関わらず、培養前後の検体を用いたPCR法が陰性を示す原因は、検体に含まれるターゲット遺伝子量がPCR検出限界以下であることだと考えられる。

以前我々は、実際の豚丹毒検査検体において、一部のものは一晩振盪培養を実施したとしても、菌数は 10^3 CFU/ml以下で、 $100\mu\text{l}$ ではコロニーが形成されない場合もあることを報告した。[4]また、実験的には、PCR法の検出限界は 10^5 CFU/mlであること、検体に 10^{11} CFU/ml以上の菌を接種し、17時間以上振盪培養すれば、PCR法の検出限界まで菌が増殖することを報告した。[2]

今回結果が一致しなかった8検体の培養方法・時間を確認したところ、5検体は振盪培養を実施し、すべて17時間以上培養されていた。残り3検体は静置培養を実施していた。

休日等に振盪培養を実施すると、機器の関係上24時間以上培養されてしまい、過度な培養により菌が死滅してしまう。このため当所では、休日等の前は振盪培養に代わり48時間の静置培養

を実施している。静置培養を実施した 3 検体は、すべて培養法と PCR 法の結果が一致しなかった。

一般的に、振盪培養の方が菌の増加速度が速い。今回の静置培養では、PCR 法の検出限界まで菌数が増加しなかったと推測された。

静置培養への対策として、同一検体を並行して振盪培養する方法が考えられる。72 時間(3 日)程度振盪培養を実施すると菌は死滅するが、PCR 法に影響するほどの遺伝子の分解・減少はなく、むしろ、死菌も含めた遺伝子の増加により検出感度が上がると考えられる。この対策を実施すれば、今回の実験において、PCR 法の陽性は 16 頭(32%) (豚丹毒(関節炎型)と診断されたものの 76.2%)になると想定される。

それ以外の 5 検体については、アザイドブイオンを使用して振盪培養を 17 時間以上実施しても、 10^5 CFU/ml 以下しか増菌できないことを示しており、以前の報告とも一致する[4]。平板培養結果を確認すると、そのうち 4 検体では増菌培養を行っても菌数が少ないが、24 時間培養でコロニーが形成されていた。

このことから、静置培養の対策を行い、PCR 法と併用して当所既定の方法を実施し、確認されたコロニーについてPCR法を実施すれば、検査開始 3 日目(76 時間)までに 20 頭(40%)が陽性になると想定される。これは、今回培養法で豚丹毒(関節炎型)と診断されたものの 95%にあたる。

発育が遅く増菌培養検体で 48 時間培養までコロニーを形成しなかったものは、上記方法でも検出できない。以前我々は、アザイドブイオンに 10^8 CFU/ml の菌液を接種した検体を、アザイド寒天培地で培養しても、コロニー形成に 40 時間以上必要であること、同様の検体を振盪培養して培養すると、16 時間でコロニーが形成されることを報告した。[2]今回の実験で、発育が遅かった原因は不明である。菌の状態や培養条件の影響を受けていると考えられる。いずれにせよ、これは PCR 法の改良等で対応できる部分ではなく、培養方法の改良などを検討する必要がある。

今後は、調査検体数を増やすとともに、増菌培養で菌数が増加しない原因の究明及びコロニー形成が遅いものへの対策を検討していきたい。

参考文献

- 1)清水悠紀臣ほか(2002)豚丹毒, 動物の感染症, 220-221
- 2)PCR を用いた豚丹毒迅速診断法の検討, 平成 24 年度宮城県食肉衛生検査所業績発表会
- 3)Makino S.et al.(1994) Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR,J Clin Microbiol,32,1526-1531.
- 4)PCR を用いた細菌の生・死菌判別方法の検討(第二報), 平成 22 年度宮城県食肉衛生検査所業績発表会

