

演題番号：6

演題名：PMA-PCRを用いた *Toxoplasma gondii* の生死判別法の検討

発表者名：○佐々木 哲 北野 崇

発表者所属：中央食肉衛生検査所

1. はじめに

Propidium monoazide (PMA)は細胞膜不浸透性で高親和性光反応性の DNA 結合試薬である。その特性から DNA が分離している死細胞由来の DNA を選択的に修飾し、光活性化によりその後の PCR 反応を阻害する。今回我々は多数検体における疾病判定への応用を目的として PMA を用いた PCR (PMA-PCR) により、*Toxoplasma gondii* (TP)の生死判別を行う方法を検討したので報告する。

2. 材料及び方法

材料は3頭の TP 陽性豚の 4℃で保存された腸間膜リンパ節 100mg 及び沖縄県家畜衛生試験場より分与された TP をマウスに腹腔内接種して得られた TP 感染マウス 3 頭の脳を用いた。検体中の TP の死滅処理は加熱処理 (70℃, 30min あるいは 100℃, 10min) により実施した。PMA 処理は DNA 抽出前に行い、DNA 抽出には Get pure DNA Kit-Cell, Tissue を使用した。PCR は B1 遺伝子の 2 領域 (Z500 [501bp], B22/23 [114bp])、及び GRA6 遺伝子 (794bp) を増幅するプライマーを用いた single PCR を実施した。

(1) TP 陽性豚の腸間膜リンパ節での PMA-PCR: リンパ節より精製した TP 浮遊液の無加熱処理検体と加熱処理検体において PMA-PCR の結果を比較した。PMA 処理条件:PMA 濃度は 10 及び 50 μ M, インキュベーション時間は 5 min, 光照射時間は 3 min で実施した。

(2) 脳乳剤精製液中のシストでの PMA-PCR: 脳乳剤精製液 (シスト数 1 個/1 μ l) の無加熱処理検体と加熱処理検体についてそれぞれ 50 及び 100 μ l で PMA-PCR の結果を比較した。PMA 処理条件:PMA 濃度は 20,50 及び 100 μ M, インキュベーション時間は 10 min, 光照射時間は 5 min で実施した。

3. 結果

(1) リンパ節の加熱処理検体ではいずれの PMA 濃度においても 3 種の遺伝子は認められなかった。無加熱処理検体では PMA 濃度 10 μ M において B22/23 及び Z500 が認められたが、GRA6 は認められなかった。また、50 μ M において B22/23 は認められたが、Z500 及び GRA6 は認められなかった。(2) 脳乳剤精製液 50 μ l: 加熱処理検体では PMA 濃度 20 μ M において B22/B23 は認められたが、Z500 及び GRA6 は認められなかった。50 及び 100 μ M では 3 種の遺伝子とも認められなかった。無加熱処理の検体ではいずれの PMA 濃度においても 3 種の遺伝子が認められた。脳乳剤精製液 100 μ l: 加熱処理検体ではいずれの PMA 濃度においても B22/B23 は認められたが、Z500 及び GRA6 は認められなかった。無加熱処理検体ではいずれの PMA 濃度においても 3 種の遺伝子が認められた。

4. 考察及びまとめ

調査結果より、設定条件によっては無加熱処理検体で増幅産物を認め、且つ加熱処理検体で増幅産物を認めなかったことから、PMA-PCR による TP の生死判別は可能であることが推察された。しかし、検体数が少数であることから今後検体数を増やして再現性の確認を行うとともに、検体の精製方法及び最適な条件設定等の再検討を行う必要がある。