

演題番号：1

演題名：リアルタイムPCRによる関節炎型豚丹毒の迅速診断法

発表者名：○仲本佑子、中込健次、中村正治

発表者所属：中央食肉衛生検査所

1. はじめに

当所における関節炎型豚丹毒の保留検査は分離培養法により実施しており陽性判定に3~4日、陰性判定に4日を要し、陰性判定となる豚枝肉の品質低下の問題から迅速な判定が求められている。今回リアルタイムPCR法（以下r-PCR法）における培養液中DNAの抽出方法を検討し、さらに増菌培養前後の培養液中DNA量を定量することで生菌・死菌を判別し、検査日数を短縮する方法について検討したので報告する。

2. 材料および方法

- (1) DNA抽出法の検討：平成27年4月~12月に関節炎型豚丹毒陽性となった8頭13検体（Ly6、絨毛6、関節液1）と陰性となった7頭21検体（Ly7、絨毛7、関節液7）を用いた。検体を液体培地（アザイド、ゲンタカナ）に接種し18時間増菌培養後の培養液からアルカリボイル法とDNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit）（以下キット法）にてDNAを抽出しr-PCR法による定性試験を実施した。
- (2) DNAの定量：陽性13検体について、キット法で培養前後の培養液からDNAを抽出し、r-PCR法による定量試験で培養前と培養後のDNA定量値を比較した。
- (3) r-PCR法の感度確認：陰性検体（Ly、絨毛、関節液を各2検体）を加えた液体培地に $10^0\sim 10^5$ CFU/mlの当該菌を添加し、r-PCR法の検出限界値を求めた。また、当該菌の増菌後の菌数が検出限界値に達することを確認するため、 10^0 CFU/mlに調整した6株を18時間増菌培養後にアザイド平板培地に塗抹し菌数を計測した。

3. 結果

- (1) アルカリボイル法では陽性13検体中7検体（Ly4、絨毛3）で当該遺伝子が検出され、6検体（Ly2、絨毛3、関節液1）で検出されなかった。キット法では13検体全てから検出された。陰性21検体は両方法ともに全て未検出であった。
- (2) DNA定量値は、培養前では全検体未検出（検出限界値以下）であり、培養後で $10^3\sim 10^8$ CFU/mlであった。
- (3) DNA抽出キットを用いたr-PCR法の検出限界値は、 10^3 CFU/mlであった。また、 10^0 CFU/mlの菌は18時間増菌培養後 $10^5\sim 10^8$ CFU/mlに増加した。

4. まとめ及び考察

DNA抽出方法について、アルカリボイル法では当該遺伝子が検出されない検体があるが、キット法では全陽性検体から検出された。キットの使用によりPCR阻害物質が除去されたためと考えられる。また、増菌培養前後のDNA定量値の比較により菌の増殖が確認され、検出遺伝子が生菌由来であると判別できた。r-PCR法の検出限界値は 10^3 CFU/mlであり、 10^0 CFU/mlの菌が18時間培養後に達する菌数以下であった。以上より、キットを用いたr-PCR法によって培養法と同等の結果を得られることから、検査日数を2日に短縮できることが示唆された。