

演題番号：2

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（第2報）

発表者：○仲本佑子、佐々木哲、中村正治

発表者所属：中央食肉衛生検査所

1. はじめに

平成27年度の調査研究にて、リアルタイムPCR（以下r-PCR）を用いた培養前後の培養液中DNA量の比較により、関節炎型豚丹毒の検査日数の短縮が可能であることを報告したが、DNA抽出キットが高価であることに加えて1頭の検査に12検体ものPCRサンプルを要することによる検査コストが課題であった。そこで今回、培養前後の各培養液をプール検体としてr-PCR検査に供する検査法を検討したので報告する。

2. 材料および方法

- (1) 検出限界値調査：当所にて分離された豚丹毒菌10株を用いて、アザイド・ゲンタカナ混合培地中で菌量を $10^0 \sim 10^5$ CFU/mlに調整し、r-PCR法を実施して検出限界値を求めた。
- (2) 豚丹毒菌添加試験：当所にて分離された豚丹毒菌2株を用いた。アザイド及びゲンタカナ液体培地に豚丹毒陰性の内腸骨リンパ節、関節絨毛、関節液を添加し、そのうち1本の試験管に 10^0 CFU/mlの豚丹毒菌液を添加して（2株×6パターン）、18時間培養した。培養前後の各培養液6本の試験管から各35 μ lを採取してプール検体（計210 μ l）とし、DNA抽出に供した。r-PCRを用いて当該遺伝子を定量し、未検出の場合は定量値0として培養前後の定量値の差を求めた。
- (3) 保留検体を用いた検討：平成27年4月から平成28年12月に関節炎型豚丹毒で保留となったもののうち、陽性14頭と陰性10頭の内腸骨リンパ節、関節絨毛、関節液（使用時まで -20°C 保存）を用いた。（2）と同様に培養液プール検体を用いて培養前後の定量値とその差を求めた。

3. 結果

- (1) 検出限界値は 10^3 CFU/mlであった。
- (2) 培養前後の定量値の差は $10^4 \sim 10^7$ であった。
- (3) 陽性検体における培養前後定量値の差は $10^3 \sim 10^7$ であった。陰性検体は全て未検出であった。

4. まとめ及び考察

2種類の液体培地を混合した状態でも、第1報と同様に検出限界値は 10^3 CFU/mlであった。添加試験では、検体中菌量が微量で、かつ培養液をプールすることで菌量が希釈される場合を想定して実施したところ、培養前後の差が $10^4 \sim 10^7$ となり、菌の増殖が明らかであった。保留検体を用いた調査では、培養前後の差は $10^3 \sim 10^7$ で差が比較的小さい検体もみられた。検体の長期間凍結保存による当該菌の増幅効率の低下が考えられるため、今後の保留検査で本法を実際に用いて検証し陽性判定の基準値を設定する必要がある。以上より、r-PCR法にプール検体を用いることで1頭につき2検体で検査可能となり、実用的なコストで保留翌日に判定できることが示唆された。