

—最近における動物衛生研究情報 (Ⅶ)—

莢膜合成遺伝子を標的にしたマルチプレックスPCRによる
豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別

伊藤博哉[†] (動物衛生研究所環境・常在疾病研究チーム)



1 はじめに

豚の重要な呼吸器病の原因菌である豚胸膜肺炎菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*: App) は、主に菌体表層の莢膜の抗原性に基づき15の血清型に型別される。流行している血清型は国、地域及び農場によって異なり、日本で分離される血清型はほとんど血清型1, 2または5であり、分離株の88%以上を占める。病原性の強弱は血清型間で異なり、またワクチン効果に血清型特異性が認められ

ることから、本菌の血清型別は重要な検査項目であり、多くの検査機関で実施されている。しかし、型別用抗血清は市販されていないため、血清型別を実施できる検査室は少ない。さらにいくつかの血清型間で交差反応がしばしば認められ、正確かつ迅速な型別をできないことがある。

近年、App血清型1, 2, 3, 5, 6, 7, 8及び12の莢膜合成遺伝子の塩基配列が決定され、その塩基配列を参考にして莢膜血清型特異的なPCRが開発された [1-3]。しかし、日本で流行しているApp血清型1, 2及び5を1本のチューブで型別可能なマルチプレックスPCRはま

PCR 反応液組成 (反応液 50µl 中)

1 × PCR ゴールドバッファー (Applied Biosystems)
AmpliTaq Gold DNA 合成酵素
(2.5 ユニット, Applied Biosystems)
MgCl₂ (1.5mM)
dNTPs (各0.2mM)
精製DNA (10ng)
血清型特異プライマー (各0.5µM)
5'-GGGCAAGCCTCTGCTCGTAA-3'
(血清型1用 forward 1 [1])
5'-GAAAGAACCAAGCTCCTGCAAT-3'
(血清型1用 reverse 1 [1])
5'-ACTATGGCAATCAGTCGATTCAT-3'
(血清型2用 forward [2])
5'-CCTAATCGGAAACGCCATTCTG-3'
(血清型2用 reverse [2])
5'-TTTATCACTATCACCGTCCACACCT-3'
(血清型5用 forward [2])
5'-CATTTCGGGTCTTGTGGCTACTAA-3'
(血清型5用 reverse [2])

図1 豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別用マルチプレックスPCRの反応液の組成

PCR 反応液組成 (反応液 50µl 中)

1 × PCR ゴールドバッファー (Applied Biosystems)
AmpliTaq Gold DNA 合成酵素
(2.5 ユニット, Applied Biosystems)
MgCl₂ (1.5mM)
dNTPs (各0.2mM)
精製DNA (10ng)
血清型特異プライマー (各0.5µM)
5'-GGGCAAGCCTCTGCTCGTAA-3'
(血清型1用 forward 2 [3])
5'-GAAAGAACCAAGCTCCTGCAAT-3'
(血清型1用 reverse 2 [3])
5'-ACTATGGCAATCAGTCGATTCAT-3'
(血清型2用 forward [2])
5'-CCTAATCGGAAACGCCATTCTG-3'
(血清型2用 reverse [2])
5'-TTTATCACTATCACCGTCCACACCT-3'
(血清型5用 forward [2])
5'-CATTTCGGGTCTTGTGGCTACTAA-3'
(血清型5用 reverse [2])

図2 豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別用マルチプレックスPCRの反応液の組成

下線で示したプライマーの配列を除き、図1と同一の組成である。血清型1, 2及び5以外の血清型参考株でも、非特異バンドが出現する (図5参照)。

[†] 連絡責任者：伊藤博哉 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 環境・常在疾病研究チーム)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎029-838-7850 FAX 029-838-7851 E-mail: itohiro@affrc.go.jp

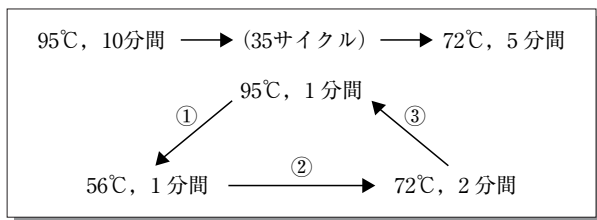


図3 豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別用マルチプレックスPCRの反応条件

だ開発されていない。そこで、日本での主要な流行血清型である血清型1, 2及び5を遺伝学的に簡便かつ正確に型別できる莢膜合成遺伝子を標的にしたマルチプレックスPCRの開発を行った [4]。

2 マルチプレックスPCRによる豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別法

PCR反応液の組成及びPCRの反応条件をそれぞれ図1及び2に示した。血清型1用プライマーは、異なる2通りの組み合わせで実施した。PCR終了後は、反応液10 μ lをアガロース電気泳動（ゲル濃度1.5%使用）に供試し、特異的DNA増幅の有無とそのサイズを確認した。なお今回使用したDNA合成酵素は、95°C, 10分間の予熱を行わなければ酵素が活性化しないホットスタートPCR用の酵素である。したがって、AmpliTaq Gold以外の酵素を使用する場合には、予熱を省略する必要がある。

3 App血清型参考株での成績（その1）

App血清型1～15の参考株を図1で示した反応条件のマルチプレックスPCRに供試すると、血清型1, 2及び5の参考株からはそれぞれ約0.75kb, 0.5kb, 1.1kbの特異DNAが増幅されるが、他の血清型参考株からは、DNAは増幅されなかった（図4）。

4 App血清型参考株での成績（その2）

App血清型1～15の参考株を図2で示した反応条件のマルチプレックスPCRに供試すると、血清型1, 2及び5の参考株からはそれぞれ約1.6kb, 0.5kb, 1.1kbの特異DNAが増幅された。しかし、血清型8参考株からは約0.7kbのDNAが増幅された。他の血清型参考株でも、1.0kbよりも少し小さなサイズのDNAが増幅される株があった（図5）。このように、血清型1, 2及び5用のマルチプレックスPCR開発には、使用するプライマーの組み合わせが重要であると考えられた。

5 App野外株での成績

3及び4の成績から、図1に示した反応条件で野外株での反応性の検討を行った。その結果、App血清型1

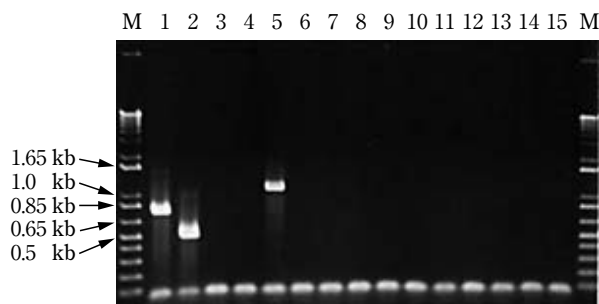


図4 豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別用マルチプレックスPCR

各レーンの上の数字は血清型を示す。

M：サイズマーカー（1kb plus DNA ladder）。

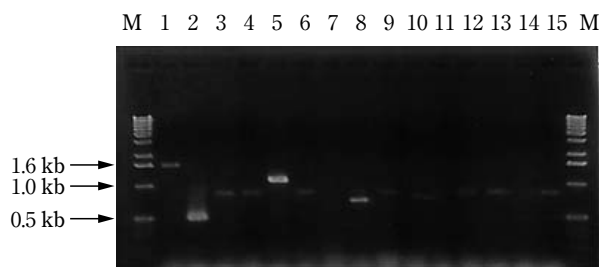


図5 豚胸膜肺炎菌血清型1, 2及び5の型別用マルチプレックスPCR

各レーンの上の数字は血清型を示す。

M：サイズマーカー（1kb DNA ladder）。

(n = 15), 2 (n = 53), 5 (n = 15), 7 (n = 11), 8 (n = 3), 10 (n = 2), 12 (n = 3) 及び型別不能 (n = 4) の野外分離株を上記マルチプレックスPCRに供試すると、血清型1, 2及び5の野外分離株からはそれぞれ約0.75kb, 0.5kb, 1.1kbの特異DNAが増幅された。一方、血清型7, 8, 10, 12及び型別不能の野外分離株からは、DNAは増幅されなかった。このように、図1に示したプライマーの組み合わせで実施したマルチプレックスPCRは、野外でも利用可能であると考えられた。

6 結 論

莢膜合成遺伝子を標的にしたマルチプレックスPCRにより、日本での主要な流行血清型である豚胸膜肺炎菌の血清型1, 2及び5を簡便かつ正確に遺伝学的に型別を実施できる。本法は型別用抗血清が不要であり、特異性も高い事から、簡便かつ正確に分離株の血清型を推定できる。型別用抗血清を保有しない検査機関では、分離株が日本での主要な血清型である血清型1, 2, 5であるかどうかを遺伝学的に型別するための簡易検査法として使用できる。一方、型別用抗血清を保有する検査機関では、従来の抗血清を用いた血清型別の際に、交差反応が認められた場合には、有用な補助検査法として本法を使用できる。以上の成績は既報の論文に掲載されている [4]。

参 考 文 献

- [1] Angen O, Ahrens P, Jessing SG : Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12, *Vet Microbiol*, 132 (3h4), 312h318 (2008)
- [2] Jessing SG, Angen O, Inzana TJ : Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6, *J Clin Microbiol*, 41 (9), 4095h4100 (1993)
- [3] Schuhert JA, Inzana TJ, Angen O, Jessing S : Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 42 (9), 4344h4348 (2004)
- [4] Ito H : Development of a pspA-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5, *J Vet Med Sci*, 72 (5), 653h655 (2010)
-