

ヨーネ病リアルタイムPCR検査における糞便の プール処理法の検討

三田晶子^{1)†} 中川哲夫¹⁾ 内山勝雄¹⁾ 松田優子¹⁾
田上勝則¹⁾ 森 康行²⁾

1) ㈩家畜改良センター改良部 (〒961-8511 西白河郡西郷村小田倉原1)

2) ㈩農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年8月27日受付・2013年2月18日受理)

要 約

ヨーネ病のリアルタイムPCR検査における多検体処理を可能とするためプール処理手法を検討した。ヨーネ菌実験感染牛由来の陽性糞便液のみのプールを行った結果、6プールまでヨーネ菌DNAがほぼ全量回収され、糞便中のPCR阻害物質の影響を受けずに検出できた。さらに、わが国のヨーネ病自主淘汰推奨基準のヨーネ菌DNA量の半量である 0.0023 ± 0.0013 pg/wellの陽性糞便液1検体と陰性糞便液とのプール試験を行ったところ、検出率は6プールまで100%であり、計算上のヨーネ菌DNA濃度は5プールで 0.0022 ± 0.0017 pg/wellと低下しなかった。このことから、5プール以下であればプールしない場合と同等の感度で多検体処理が可能な手法だと考えられた。本法はヨーネ菌DNA検査のスクリーニング検査及び感度向上への応用が可能であると考えられる。

—キーワード：ヨーネ病，プール処理，リアルタイムPCR検査。

----- 日獣会誌 66, 317～320 (2013)

ヨーネ病はわが国の酪農・肉牛経営に甚大な損害を与えている細菌性伝染病である(横溝祐一：牛ヨーネ病に関する最新知見と防疫戦略, 山口獣医学雑誌, 26, 1-26 (1999))。農林水産省が定めた牛のヨーネ病防疫対策要領に基づき各都道府県では、ヨーネ病の発生増加の抑制、清浄化を目指して対策を講じている[1]。有効な治療法がないヨーネ病では定期的な検査による感染・排菌牛の早期摘発と淘汰が防疫上重要である[2]。ヨーネ病の診断法において糞便培養検査によるヨーネ菌分離が最も信頼性が高いが、検査期間が3カ月以上と長期間であるため、迅速な対応がとれないこと、食品衛生法の規定により搾乳牛が陽性となった場合は検査期間中に生産された乳及び乳製品を回収・廃棄しなければならないなどの問題がある。

現在、糞便培養検査に代わる迅速な抗原検出手法として、㈩農業・食品産業総合研究機構 動物衛生研究所(以下、動衛研)より定量的リアルタイムPCR検査法(qPCR)が開発され、農林水産省のヨーネ病検査要領に採用されている。

当該検査法は全国の家畜保健衛生所に積極的に導入さ

れているが、多検体処理が困難であること、検査に係る経費が高価であることなどの問題がある。このことから、qPCRのさらなる普及を目指し多検体処理を可能とするため糞便のプール処理の検討[3]、(本間ら：ヨーネ菌検出におけるリアルタイムPCRの実用性と野外材料処理方法の検討, 北海道獣医師会雑誌, 53, 410 (2009))がなされているが、これらのプール処理方法は、プールした一部分を回収しqPCRすることから、プール処理によって検出感度が低下する問題があり実用化に至っていない。

今回、当該検査の多検体処理を可能とするため、プールした全量を回収しqPCRすることにより検出感度が低下しない糞便のプール処理法を新たに検討したので報告する。

材料及び方法

糞便：ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) 実験感染牛の糞便をヨーネ菌陽性糞便(以下、陽性糞便)として試験に供した。また、㈩家畜改良センターで飼養される健康な牛の糞便をヨーネ菌

† 連絡責任者：三田晶子 (㈩家畜改良センター改良部)

〒961-8511 西白河郡西郷村小田倉原1 ☎0248-25-2231 FAX 0248-25-3982 E-mail: a0mita@nlbc.go.jp

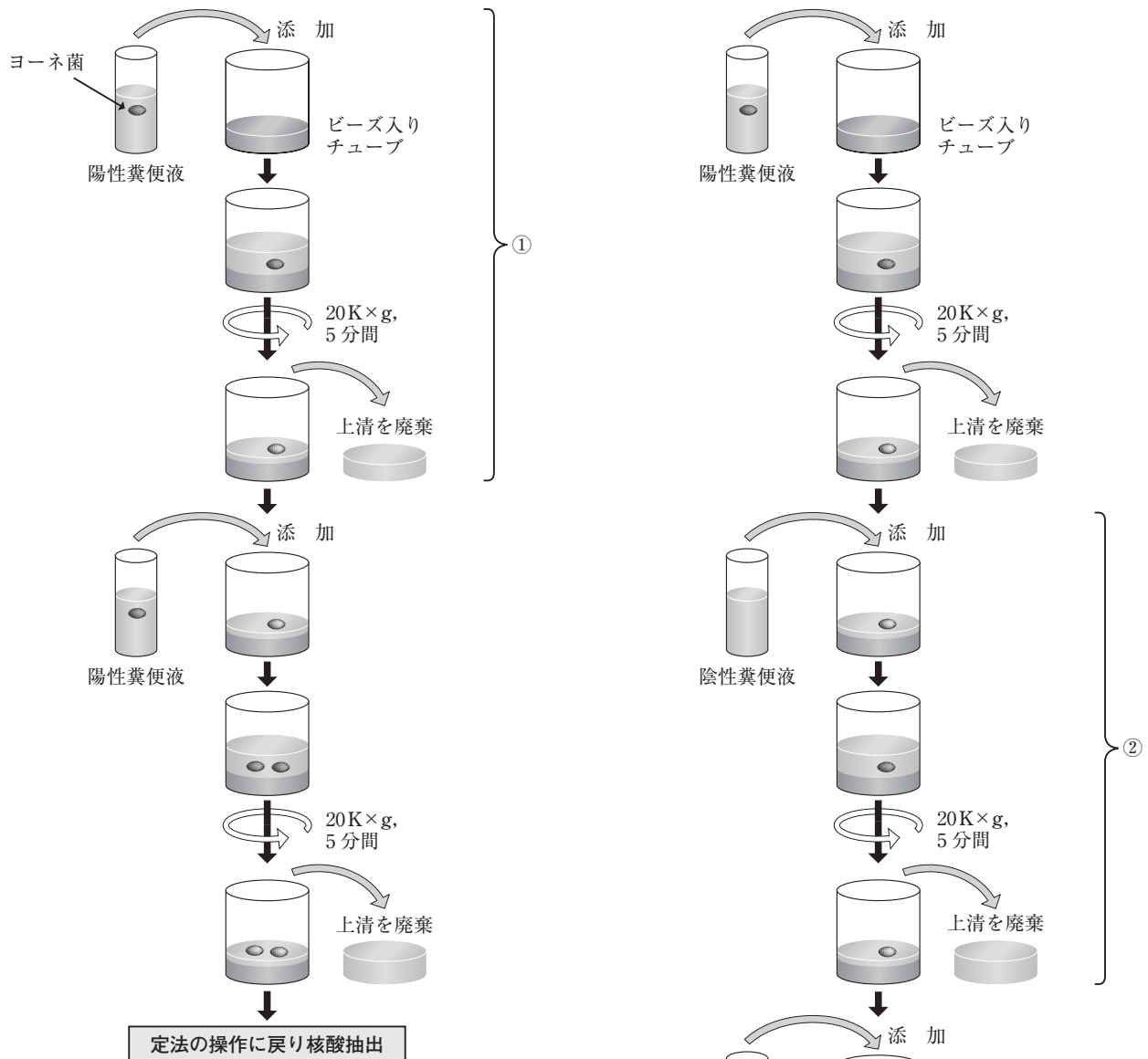


図1 試験1のプールの処理法

上図は、2プールの場合は、3プールの場合は①を3回、4プールの場合は①を4回、5プールの場合は①を5回、6プールの場合は①を6回反復後、定法の操作に戻り核酸抽出

陰性糞便（以下、陰性糞便）として試験に供した。

ヨーネ菌特異遺伝子の定量：動衛研ヨーネ病検査マニュアル（以下、定法）に基づいて、ヨーネ菌核酸調製試薬（ヨーネスピン[®]、(株)ファスマック、神奈川）を用い糞便より核酸抽出を行い、リアルタイムPCR装置（7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, 東京）によりヨーネ菌DNAを定量した。

糞便液の調製：定法に基づき、陽性糞便を20倍（W/V）に希釈した上清（以下、陽性糞便液）を作製した。陽性糞便液をPBSで2倍（n = 3）、4倍（n = 4）及び8倍（n = 4）に希釈した各1mlについて、ヨーネ菌特異遺伝子量（以下、DNA量）を定量し、以後の試験

図2 試験2のプールの処理法

上図は、3プールの場合は、5プールの場合は②を4回、6プールの場合は②を5回反復後、定法の操作に戻り核酸抽出

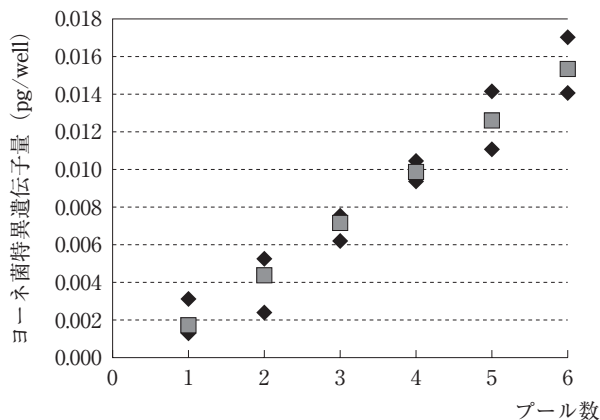


図3 試験1における実測値及び回帰直線
 ◆ ヨーネ菌特異遺伝子量 (n = 2)
 ■ 予測値：ヨーネ菌特異遺伝子量

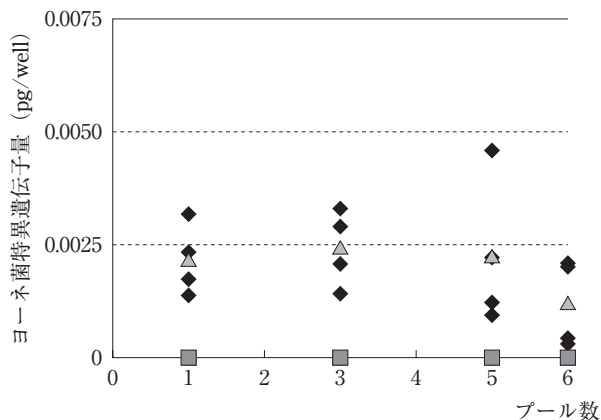


図4 試験2における各プール数の比較
 ■ 陰性糞便液のみプール処理 (n = 4)
 ◆ 陽性糞便液及び陰性糞便液のプール処理 (n = 4)
 △ 陽性糞便液及び陰性糞便液のプール処理の平均

に用いる陽性糞便液の希釈倍率を決定した。陽性糞便を再度、決定した倍率に希釈後、試験1及び2に供するまで凍結保存した。

また、陰性糞便を20倍に希釈した上清（以下、陰性糞便液）を作製し、1ml中のヨーネ菌DNA量を定量した。

糞便のプール処理試験：試験1は、陽性糞便液のみ用い、2 (n = 2), 3 (n = 2), 4 (n = 2), 5 (n = 2) 及び6プール処理 (n = 2) した。処理法は定法のビーズチューブに陽性糞便液を1ml添加し、遠心分離 (20K × g, 5分間, 室温) 後、上清を除去する操作を2プールは2回、3プールは3回、4プールは4回、5プールは5回、6プールは6回反復した (図1)。

プール処理後、定法の操作に従ってDNAを定量した。同時にプール処理を行わない陽性糞便液1ml (以下、プールなし) のDNAを定量し、各プール処理のDNA量についてMicrosoft Excelを用いて回帰分析を行った。

試験2は、試験1で用いた陽性糞便液及び陰性糞便液を用い、3 (n = 4), 5 (n = 4) 及び6プール処理 (n = 4) した。処理法は試験1と同様にビーズチューブへの添加及び上清除去操作の反復であるが、陽性糞便液1mlを1回添加除去の後、陰性糞便液1mlをそれぞれ3プールは2回、5プールは4回、6プールは5回反復した (図2)。また、陰性糞便液のみを用い、3 (n = 4), 5 (n = 4) 及び6プール処理 (n = 4) した。処理法は同様のビーズチューブへの添加及び上清除去操作を反復後プール処理後定法の操作に戻りDNAを定量した。さらに、プールなしとして陽性糞便液1ml及び陰性糞便液1mlをそれぞれ定法の操作でDNAを定量 (陽性糞便液 n = 2, 試験1のプールなし n = 2のDNA量とあわせて n = 4, 陰性糞便液 n = 4) し、試験2で得られた陽性糞便液を混ぜた3, 5及び6プールと陰性糞便液のみの3, 5及び6プールのDNA量について比較した。また、各プール

数での検出率を算出した。

成 績

糞便液の調整：陽性糞便液2倍希釈、4倍希釈及び8倍希釈のDNA量は 0.0197 ± 0.0049 pg/well, 0.0110 ± 0.0029 pg/well, 0.0044 ± 0.0032 pg/wellであった。陰性糞便液からはDNAが検出されなかった。8倍希釈では、 0.005 pg/well以下になったため、試験1及び2では、8倍希釈した陽性糞便液を用いることとした。

試験1：プールなし、2プール、3プール、4プール、5プール及び6プールのDNA量は、 0.0023 ± 0.0020 pg/well, 0.0039 ± 0.0019 pg/well, 0.0069 ± 0.0025 pg/well, 0.0099 ± 0.0022 pg/well, 0.0126 ± 0.0020 pg/well及び 0.0156 ± 0.0048 pg/wellとなった。回帰分析の結果、予測値と各プールのDNA量は、ほぼ同じであった (図3)。

試験2：陽性糞便液については、3プール、5プールの平均DNA量は、プールなしの平均DNA量とほぼ同量であった。6プールの平均DNA量は、プールなしの平均DNA量の半量であった。また、すべてのプールサンプルにおいて検出率は100%であった (図4)。陰性糞便液については、すべてのサンプルにおいて検出率は0%であった (図4)。

考 察

ヨーネ病検査要領における牛ヨーネ病の自主淘汰基準は、定法によるリアルタイムPCR検査で 0.005 pg/well以上のDNA量を検出した場合となっている。そのため、今回 0.005 pg/wellを確実に検出できるプール処理手法を検討した。

試験1では、プール処理数の増加にともない糞便中のPCR阻害物質も増加することから、ヨーネ菌がすべて

回収されたとしても検出できるDNA量は倍増せず緩やかな増加を示すか、またはあるプール数までは倍増しその後減少することが予想された。しかし、本試験では、予測値と各プールのDNA量は、ほぼ同じであった。このことから、本プール処理法により、6プールまでは、陽性糞便液中のヨーネ菌がほぼ全量ビーズチューブ中に回収され、かつ、糞便中のPCR阻害物質の影響を受けず検出できたと考えられた。

DNA量が少ないほどPCR阻害物質の影響を大きく受けることから、試験2では、陽性糞便液1mlに対して陰性糞便液をプールする処理数が増加するごとにDNA量が漸減するかまたは、あるプール数までは同量でその後減少することが予想された。本試験では、5プールまでは平均DNA量が減少しなかった。6プールにおいては、プールなしの半量であった。このことは、試験1及び2の結果から6プールまでヨーネ菌をほぼ全量回収でき、5プールまではPCR阻害物質の影響を受けずにDNAが検出・定量されるが、6プールでは糞便由来のPCR阻害物質が増加し、PCR反応が抑制されることにより、計算上のヨーネ菌DNA量が低下したものと考えられた。

今回の試験は自主淘汰基準である0.005 pg/wellの半量程度の検体が1検体で他は陰性の検体とのプールであったが、6プールまではDNA検出率が100%であった

のみならず、5プールまでは、糞便由来のPCR阻害物質の影響も認められなかった。そのため、本プール処理法は5プール以下であれば、プール処理法として有効であると考えられ、また、多検体処理が可能と考えられた。検査経費についても定法の約1/5になることから、ヨーネ病遺伝子検査のスクリーニング検査としての応用が可能であると考えられる。また、本プール処理法における遠心処理により、ヨーネ菌の濃縮が可能なることから、精密検査についても検出感度の向上に應用が可能と考えられる。これらについて今後應用を可能とするため、本プール処理法の検出限界等を確認したい。

引用文献

- [1] 小林創太, 筒井俊之: わが国の牛ヨーネ病の発生動向と防疫体制の現状, 日獣会誌, 60, 853-857 (2007)
- [2] 森 康行: ヨーネ病, 動物の感染症, 小沼 操他編, 第二版, 125-126, 近代出版, 東京 (2006)
- [3] Scott HM, Fosgate GT, Libal MC, Sneed LW, Erol E, Angulo AB, Jordan ER: Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle, *Am J Vet Res.* 68, 236-245 (2007)

Optimization of the Fecal Pool Method for the Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* with Quantitative Real-Time PCR

Akiko MITA^{1)†}, Tetsuo NAKAGAWA¹⁾, Katuo UTIYAMA¹⁾, Yuko MATSUDA¹⁾,
Katunori TAGAMI¹⁾ and Yasuyuki MORI²⁾

- 1) Hygienics Division, National Livestock Breeding Center, 1 Odakurahara, Nishigo, Nishi-shirakawa, 961-8511, Japan
- 2) Bacterial and Parasitic Disease Research Division, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

SUMMARY

The objective of this study was to obtain the optimal fecal pool method for the screening of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection with quantitative real-time PCR (qPCR). Initially, the effect of pooling on the recovery rate of Map DNA was evaluated using a fecal sample from experimentally Map-infected cattle. Map DNA concentrations extracted and purified from pooled fecal samples were increased in proportion to the volume of feces, and almost all Map DNA was recovered without any PCR inhibitory effect by increasing fecal volume. In the qPCR test at a pooling rate of 1 infected plus 2 to 5 uninfected cattle, all pooled samples were qPCR positive, and the calculated Map DNA concentrations of 0.0022 to 0.0024 pg/PCR from pooled samples were almost the same as that of one infected cattle up to 5pool (1 infected plus 4 uninfected cattle). These results suggest that the sensitivity of qPCR is not affected by fecal sample pooling up to 5pool. This pooling and centrifugation method seems likely to be useful for herd screening and improving the sensitivity of the Map qPCR test. — Key words : Paratuberculosis, Pooled fecal sample, quantitative real-time PCR.

† Correspondence to : Akiko MITA (Hygienics Division, National Livestock Breeding Center)

1 Odakurahara, Nishigo, Nishi-shirakawa, 961-8511, Japan

TEL 0248-25-2231 FAX 0248-25-3982 E-mail : aOmita@nlbc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 317 ~ 320 (2013)