

〔家保のページ〕

リアルタイム PCR システムについて

岡山家畜保健衛生所 家畜病性鑑定課

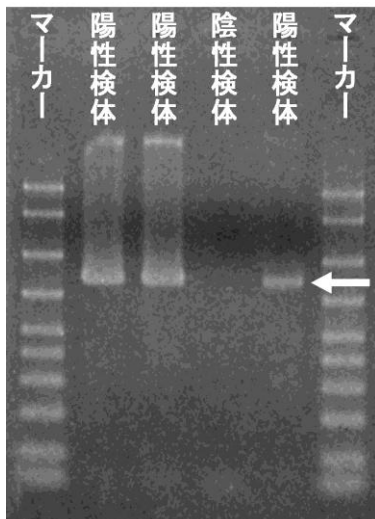
平成 20 年 9 月に、岡山家畜保健衛生所家畜病性鑑定課に、牛ヨーネ病の糞便リアルタイム PCR 検査を行うための機器が新たに整備されました。今回は、本システムによる検査について紹介します。



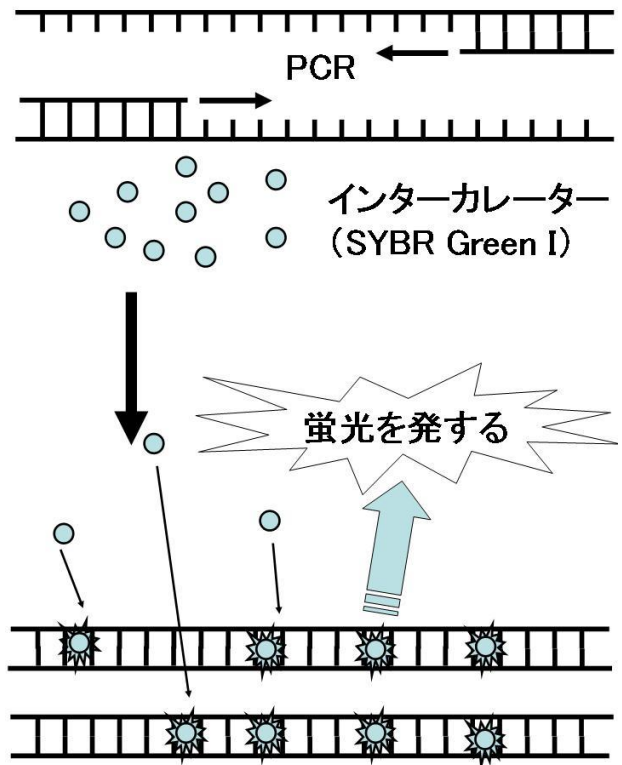
(1)リアルタイム PCR (rPCR)とは？

細菌やウイルスの同定に広く使われている PCR (polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応)とは、目的とする DNA を特異的に 10 万～100 万倍に増幅する手法です。検体を DNA 合成酵素等を含む反応液に加えて、DNA を増幅させる温度サイクル (PCR サイクル。例:94℃1 分間→60℃1 分間→72℃3 分間)を 20～40 回繰り返すことにより、検体中の DNA が増幅されます。増幅された DNA (PCR 産物)は、ゲル電気泳動後、染色することにより確認が可能となります (下写真参照)。ただし、判定は、ゲル中に PCR 産物のバンドが確認できるかどうか、つまり、陽性か陰性かどちらかの判定しかできません。また、この手法には、PCR サイクルを厳密にコントロールするサーマルサイクラーという装置が必要となります。

rPCR も、遺伝子を増幅する手法は従来の PCR と同じです。ただし、反応液に、増幅された PCR 産物 (二本鎖



DNA)に結合すると蛍光を発する色素 (インターカレーター:SYBR Green I 等)を加えることにより、この蛍光強度をモニターすることで、PCR 産物の生成量をリアルタイムで計測することが可能となっています (下図参照)。この結果、従来の PCR で必要であったゲル電気泳動が不要となり、検査結果の判定に要する時間を短縮できることとなります。

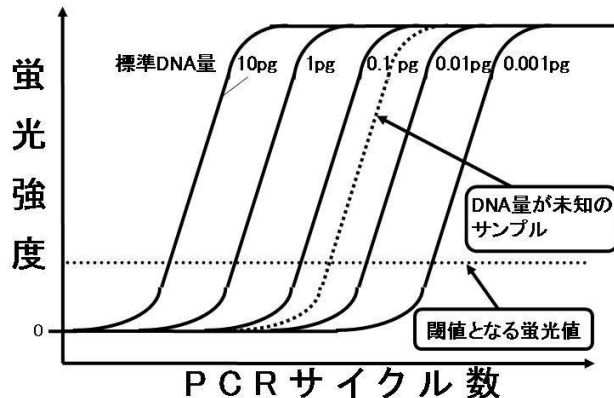


また、rPCR では検体中の DNA 量の定量も可能となります。

すなわち、PCR では、1PCR サイクル毎に DNA が 2 倍、4 倍と指数関数的に増幅されることから、PCR サイクル数を横軸に、蛍光強度 (PCR 産物量)を縦軸にプロットすると、次頁図のような増幅曲線が描けます。

段階希釈した標準 DNA を用いて rPCR を実施した場合は、DNA 量が多い順に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。ここで、閾値とな

る蛍光値を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点(Ct値)を算出します(Ct値:閾値となる蛍光値に達するのに必要なPCRサイクル数)。Ct値とDNA量の間には直線関係があり、検量線が作成できます。DNA量が未知のサンプルについても同様にCt値を算出することにより、検量線からDNA量を算出することが可能となります。



なお、rPCRでは、従来のPCRで必要であったサーマルサイクラーに分光蛍光光度計の機能が加わったリアルタイムPCR専用の装置が必要となり、今回導入したのは、この装置です。

(2) rPCRによるヨーネ菌遺伝子検査

牛ヨーネ病を摘発するための検査のひとつとして、ヨーネ菌専用培地を用いる糞便培養検査があります。この検査は、ヨーネ菌の発育が非常に遅いことから、結果判定まで3~4ヶ月という長期間が必要という問題がありました。

牛ヨーネ病糞便 rPCR 検査は、牛糞便から抽出したDNAに含まれるヨーネ菌特異的遺伝子を rPCR で定量する検査です。培養期間が必要ないことから、培養検査に比べて、数日という短期間で迅速な判定が可能となります。また、糞便中に排菌されたヨーネ菌量も定量可能であることから、検査牛におけるヨーネ病の進行度や検査農場におけるヨーネ菌の汚染状況が推測可能となります。

牛ヨーネ病糞便 rPCR 検査は、平成 21 年 9 月に改正された国のヨーネ病防疫対策要領でまん延防止のための検査のひとつと位置づけられました。これに伴い、同年 4 月に岡山県の同要領も同じく改正を実施しています。

ただし、本検査は、現時点ではヨーネ病の法的判定方法とされていないため(今後、遺伝子診断薬としてキット化され、動物用医薬品として申請・承認を経た後、法的判定となる予定)、県内では自主淘汰のための検査として実施しています。

この方法で、県内では、平成 21 年 4 月現在で 6 農場 258 頭を検査し、このうち 1 頭からヨーネ菌遺伝子を検出しています。

(3) rPCR システムの活用

検査時間の短縮および DNA の定量が可能であるという本システムを活用するため、家畜病性鑑定課ではヨーネ菌以外の細菌やウイルスに対しても応用を試みており、既に、大腸菌毒素遺伝子、レプトスピラ、鳥インフルエンザウイルスの検査が可能となっています。

今後も、迅速診断が要求される炭疽等、重要な家畜疾病の検査に対応できるよう、rPCR による検査体制を充実させていく予定です。

参考資料:

- ・森康行:リアルタイム PCR によるヨーネ病遺伝子診断法(平成 18 年度動物衛生研究成果情報)
- ・タカラバイオ:リアルタイム PCR 実験ガイド