

# リアルタイム PCR による ヨーネ病遺伝子診断法

ヨーネ病研究チーム長

森 康行

MORI, Yasuyuki

## 【背景、目的】

ヨーネ病は19世紀末にドイツ人医師ヨーネらによって報告され、牛の消化器感染症としては長い歴史をもつ疾病であるが、その診断法や予防法については今なお多くの問題を抱えている。特に、ヨーネ菌は遅発育性の抗酸菌の中でも、人工培地での菌の発育が極めて遅い菌種であり、寒天培地上で肉眼的にコロニーを確認するまでに、通常2～4ヶ月を必要とする。このような長期間を要する培養検査に代わり、糞便中のヨーネ菌遺伝子を短時間で検出する遺伝子検査は本病の迅速診断法として必須の検査となりつつある。ヨーネ菌遺伝子を検出する手法として Polymerase chain reaction (PCR) が汎用されてきたが、その発展型としてのリアルタイム PCR は、閉鎖系で PCR を行うことによりコンタミネーションの危険性を低減し、しかもサンプル中のターゲット遺伝子の量を推計する事が可能な手法として極めて有用な検査法である。ヨーネ病のリアルタイム PCR による遺伝子診断法を確立し、野外への普及を図ることを目的として種々の検討を重ねてきた。

## 【リアルタイム PCR 検査の概要】

現在ヨーネ菌は鳥型結核菌の1亜種に分類されているが、ヨーネ菌に対して特異性の高い遺伝子あるいは挿入配列 (IS) として、IS900、IS<sub>Mav2</sub>、IS<sub>Map02</sub>、*f57*、あるいは *hsp X* 等が知られている。これらのヨーネ菌特異的遺伝子の中で、遺伝子検査のターゲットとして最も頻繁に用いられる DNA は IS900 であり、ここで紹介するリアルタイム PCR 検査でも IS900 を検出する。IS900 はヨーネ菌ゲノム中に14～18コピー存在するといわれており、その数の多さは遺伝子検査の感度向上にも有利である。糞便を検査対象とするヨーネ菌遺

伝子検査は、1) DNA 抽出・精製、2) リアルタイム PCR による IS900 の検出・定量、の二つのステップから成る。糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出・精製の工程はヨーネ病遺伝子検査の精度を左右する重要なステップであり、細心の注意が必要である。現時点で、糞便から効率よくヨーネ菌 DNA を抽出するには、直径0.1mmのシリカビーズを高速でヨーネ菌にぶつけ、物理的にヨーネ菌を破壊して DNA を抽出、精製する。糞便中のヨーネ菌 DNA を抽出・精製する試薬キットが市販されており、本キットを用いるとヨーネ菌 DNA を抽出することが可能である。また、当研究チームでは試験・研究用にヨーネ病遺伝子検査用の参照糞便を設定しており、リアルタイム PCR によるヨーネ病遺伝子検査を行う場合は、この参照糞便についてまず試験を行い、所定の濃度のヨーネ菌 DNA が抽出されるか否かの予備試験を行ってから、実際の野外サンプルについて遺伝子検査を行うことを推奨している。

リアルタイム PCR では、PCR によりターゲット DNA が増幅されると反応液の蛍光強度が増すように反応系が設定されている。ターゲット DNA の増幅に応じて反応液の蛍光強度を増強させる方法としては、インターカレーター性蛍光色素(二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光色素)存在下で PCR を行う手法と、ターゲット DNA に対する特異的プローブがハイブリダイズすると蛍光強度が増す系とに大別される。ヨーネ病遺伝子検査用のリアルタイム PCR は蛍光色素として SYBR Green I を用いたインターカレーター法である(図1)。プローブ法に比べ反応系が単純で、感度・特異性ともに極めて高い方法である。インターカレーター法によるリアルタイム PCR では、非特異的に DNA が増幅された場合にも蛍光強度が増す為、特異的反

ヨーネ病リアルタイムPCR検査 図表

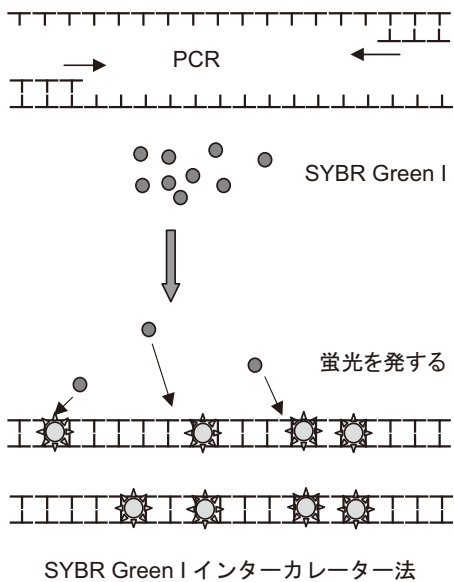


図1 インターカレーター法によるリアルタイムPCRの原理

応と非特異反応を区別する為に融解温度解析（メルトカーブ解析、あるいはディソシエーション解析）を行う。2本鎖DNAはその塩基配列によりTm値（2本鎖DNAの半分が1本鎖に解離する温度）が決まる為、PCR後に反応液の温度を少しずつ上昇させ、2本鎖が1本鎖に分かれる温度、つまりDNAに取り込まれていた蛍光色素が外れて、蛍光強度が急激に低下する温度を分析する。図2に示した例では、増幅されたIS900のPCR産物は88℃付近から1本鎖に分かれ始めるが、非特異的増幅産物は80℃付近から蛍光強度が下がり始

めるので、両者を簡単に区別することが可能である。

リアルタイムPCR検査は高感度であると同時にサンプル中のターゲットDNAの濃度を推測することが可能である点も診断法として有用である。図3-Aに示したように、ヨーネ菌精製DNAを用いると、0.001 pgのヨーネ菌DNAを本リアルタイムPCRにより検出することが可能である。また、図中のThreshold value（閾値となる蛍光値）に達するまでのPCRサイクル数は、サンプル中のターゲットのDNA量と反比例するので、図3-Bに示したように、サンプル中のヨーネ菌DNA濃度とPCRサイクル数との関係を標準直線として描くことができる。図3-Bに示した例では、標準直線の式、 $Y = -3.392X + 21.801$ （YはPCRサイクル数、Xはヨーネ菌DNA濃度）を利用してサンプル中のヨーネ菌IS900 DNA濃度を、Threshold valueに達したサイクル数から計算することが可能である。このサイクル数から計算された糞便中ヨーネ菌DNA濃度とヨーネ菌分離菌数には図4に示したような相関性が認められる。さらに、本リアルタイムPCR検査の特異性は高く、類似の鳥型結核菌群やIS900と94%の相同性を有する遺伝子を保有する抗酸菌（*Mycobacterium* sp.2333株）とも交差反応を示さない。当研究チームでの試験では、ヨーネ菌分離陽性糞便サンプルの約85%はリアルタイムPCR検査でも陽性となる。さらに、定期的な細菌学的検査や抗体検査によりヨーネ病に関する清浄性が明らかな5農場775頭のリアルタイムPCR検査成績は全て陰性であり、この点からも本法の特異性が極めて高いことが立証されている。

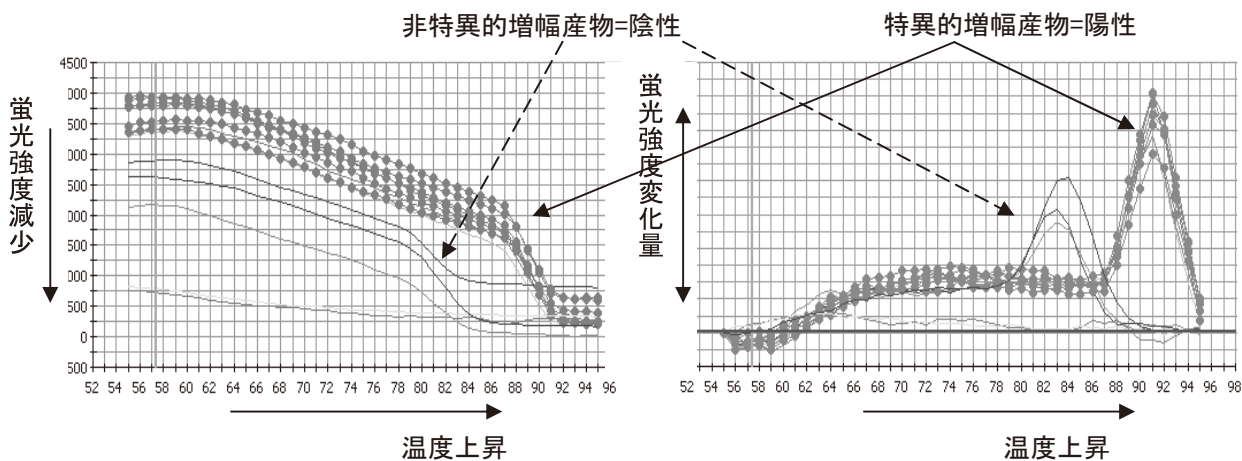


図2 融解温度解析による特異性の検討

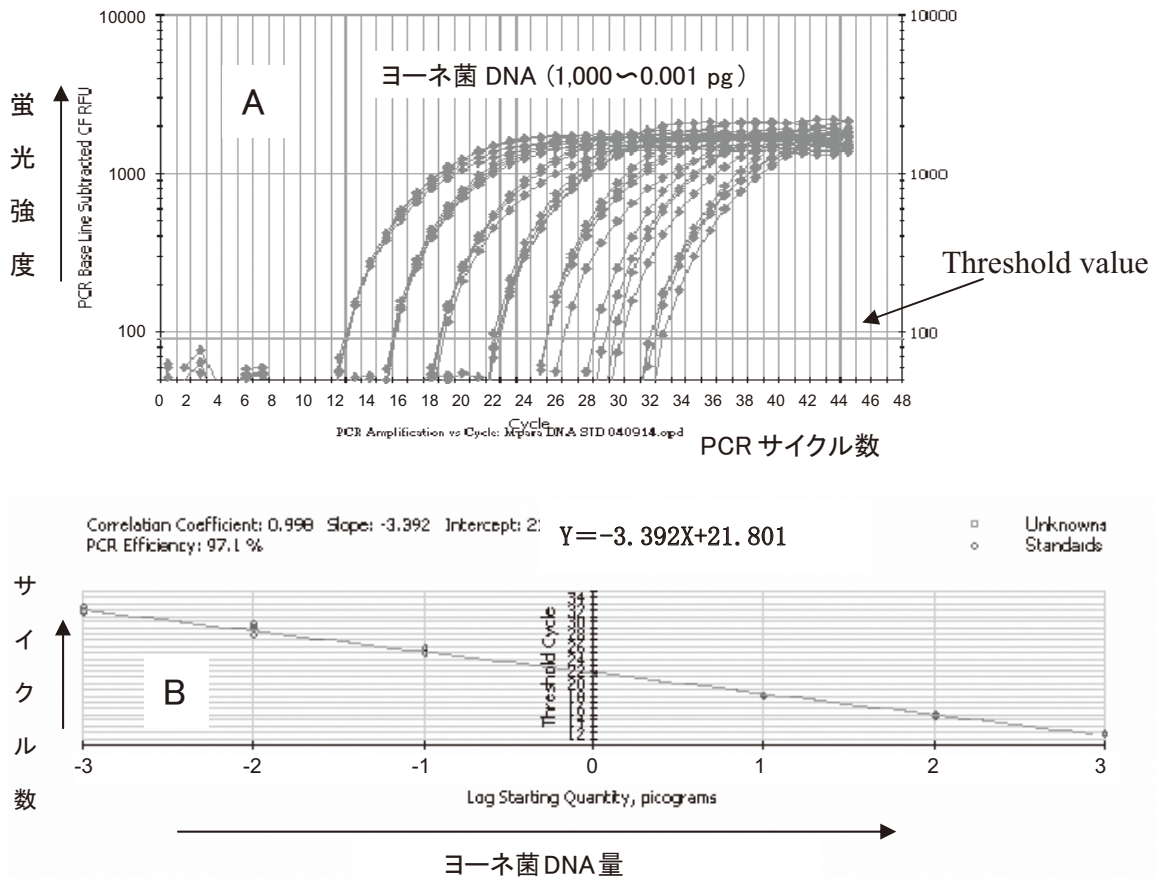


図3 ヨーネ菌標準DNAを用いたリアルタイムPCRによる蛍光強度の上昇と標準直線

**【今後の展望】**

ヨーネ病リアルタイム PCR 検査は 2006 年 11 月に農林水産省消費安全局動物衛生課から発出された「ヨーネ病検査要領」の中で自主淘汰の検査法として採用されている。今後、遺伝子診断薬としてのキット化と正式な動物用医薬品としての申請・承認を経て野外に速やかに普及させていくことが重要である。また、菌分離陽性にも拘わらずリアルタイム PCR 検査陰性の牛もいるため、ヨーネ菌培養検査を全て遺伝子検査に置き換えることはできないのが現状である。遺伝子検査はその迅速性を生かして、大量のヨーネ菌を排菌している牛を速やかに摘発する手法として今後の普及を図ることが必要であると思われる。

ヨーネ病リアルタイム PCR 検査法の詳細は、動衛研ホームページのヨーネ病研究チーム「ヨーネ病検査マニュアル」(<http://niah.naro.affrc.go.jp/disease/paratuberculosis/index.html>) に詳しく記載されているので、参考にして頂きたい。

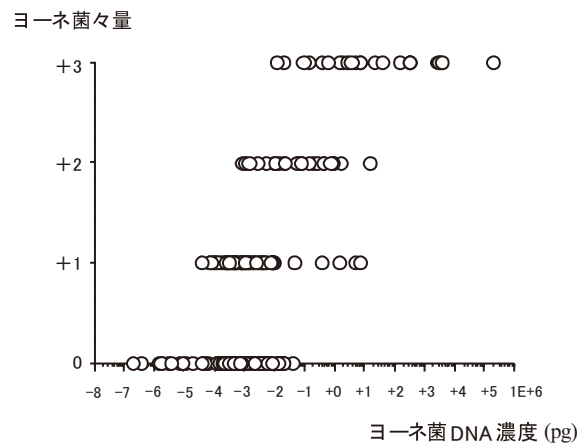


図4 リアルタイム PCR により計算された糞便中ヨーネ菌 DNA 量と分離菌数。ヨーネ菌々量 (培地上のコロニー数) : +3:>100 CFU, +2: 10-99 CFU, +1: 1-9 CFU