

研究情報

液体培養とリアルタイム PCR を組み合わせた ヨーネ菌培養検査法

MORI Yasuyuki

ヨーネ病研究チーム チーム長 森 康行

ヨーネ菌の経口感染によって引き起こされるヨーネ病は反芻動物の重要な慢性消化器感染症であり、長い潜伏期間（6か月～数年）の後、持続性の下痢、栄養状態の悪化により、やがては死に至る疾病です。本病を診断する為に様々な検査が行われますが、病原体であるヨーネ菌の培養検査は最も重要なヨーネ病の診断法です。しかし、人工培地、特に一般に用いられる寒天培地上でのヨーネ菌の発育が極めて遅い為、培養検査の結果を得るまでに通常2か月以上を必要とします。そこで、培養期間を少しでも短縮することを目的として、米国のメーカーが開発したヨーネ菌培養用液体培地を評価するとともに、菌培養とリアルタイムPCRによるヨーネ菌DNA定量法を組み合わせて、迅速なヨーネ菌培養検査法を確立しました。

評価試験に用いたB社のヨーネ菌液体培養システムは、菌の増殖に伴って培養液中の溶存酸素が消費されると、培養チューブの底にあるインディケーターが紫外線照射により蛍光を発する培養システムとなっています（図1）。また、ヨーネ菌DNAの検出、定量に用いたリアルタイムPCRは、ヨーネ菌が特異的に保有する挿入配列（IS900）をターゲットとするSYBR Green法（参考：ヨーネ病検査マニュアル、<http://niah.naro.affrc.go.jp/disease/paratuberculosis/index.html>）を用いています。牛の糞便を培養試験に用いる場合、糞便中にはヨーネ菌以外に多数の細菌や真菌が存在するので、これらの微生物を不活化してヨーネ菌のみを増殖させる為に糞便の前処理が必要です。この前処理法としてメーカーの推奨法、従来のヘキサデシルピリジニウムクロライド（HPC）処理後にバンコマイシン、ナリジクス酸、アンホテリシンBの混合液（VNA）処理を行う二重抗菌剤処理法（HPC-24h+VNA法）（Stabel, J. Vet. Diagn. Invest. 9:375-380, 1997）、およびHPC処理を4時間とした短時間処理法（HPC-4h+VNA）についても検討しました。

糞便サンプルを前処理後、液体培地に接種し2週間ごとに液体培養液の一部を取ってヨーネ菌DNAを定

量すると、図2に示したように、液体培地中のヨーネ菌は速やかに増殖し、そのDNA量は培養2週間後には培養開始時点と比較して、10～100倍に達することが明らかとなりました。また、培養用糞便サンプルの前処理法として、メーカーの推奨法、HPC-24h+VNA法、HPC-4h+VNA法の比較では、3者の処理方法の違いによるヨーネ菌増殖への影響は認められず（図2）、HPC短時間処理法が簡便な処理方法として推奨されます。さらに、牛の糞便サンプル50検体について、液体培養法と寒天培養法を比較したところ、液体培養法はヨーネ菌の初代培養検査において、寒天培養法より高い検出率を示しました（表1）。このように、寒天培地を用いる従来のヨーネ菌分離培養法に比べ、液体培養とリアルタイムPCRを組み合わせた検査法は、検出感度が高くかつ検査期間も大幅に短縮可能な優れた検査法であることが明らかになりました。今後、液体培地からのヨーネ菌DNAの抽出・精製法等を改良し、ヨーネ菌液体培養検査法として野外への普及を図りたいと思います。

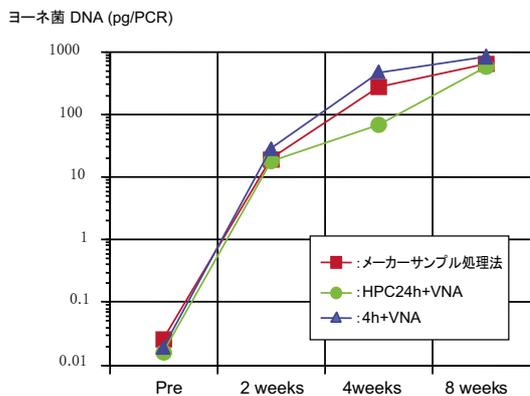
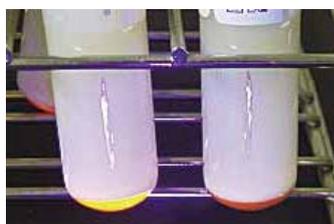


図2. 液体培地中ヨーネ菌DNA量の推移

表1. ヨーネ菌培養検査 -寒天培地と液体培地の比較-

	ヨーネ菌分離		
	+	-	合計
寒天培地	12 (24%*)	38	50
液体培地	17 (34%)	33	50

*菌分離陽性率



左：ヨーネ菌が増殖し、
蛍光を検出。
右：菌非接種対照

図1. ヨーネ菌培養用液体培地

この研究内容は動衛研ホームページでもご覧いただけます。
<http://niah.naro.affrc.go.jp/publication/seikajoho2/2008/niah08012.html>