

調査研究

敗血症診断におけるRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD)法の有用性の検討

橋倉さやか、柳瀬毅、原啓二、早船克己

1 はじめに

食肉検査で見られる敗血症のほとんどは症状心内膜炎を伴う。この場合通常精密検査を行い、臓器、リンパ節、枝肉のいずれかの2か所以上から同一の菌種が分離されたものは全部廃棄の行政処分となる。

このように複数の臓器から菌が分離された場合、同定は染色および簡易な生化学性状試験で行われ、その判断に迷う例も少なくない。そこでRandom amplified polymorphic DNA (RAPD)法を用いた遺伝子パターンと比較がその判断の一助となるか否かを検討した。

2 材料および方法

(1) 調査対象

平成14年7月から平成15年4月に当所管内と畜場で全部廃棄処分となった症状心内膜炎を伴う敗血症の豚12頭、牛2頭の症状物および心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓からの分離菌株を対象とした。

(2) 菌分離および同定

対象獣畜の症状物および各臓器を血液寒天培地にスタンプリ、36℃24時間培養した後、常法に従い菌を同定した。同定できなかった菌についてはさらに詳細な生化学性状試験を行った。

(3) DNA抽出法の検討

血液寒天培地上のコロニーを煮沸する方法、その後フェノールクロロホルム(PCI)処理する方法、TAに純培養後コロニーを煮沸する方法、さらにPCI処理する方法の4方法で検討を行った。いずれの方法もコロニーは1個を釣菌し20ITEbufferに浮遊後、抽出に用いた。

(4) RAPD法

プライマーはAP40(5'-CCGCAGCCAA-3') AP43(5'-GTGGATGCGA-3')の2種類を用いた。反応溶液を調整し(表1)、熱変性94℃アニーリング36℃、伸張反応72℃各5 minを1 cycleとしてこれを4 cycle行った後94℃、36℃72℃各1minを30 cycle行った。その後72℃10 minの伸張反応を行った。2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して観察した。

表1 PCR反応溶液の組成

試薬	量	最終濃度
dH2O	13.8 μ l	
10×buffer	2.5 μ l	1×
dNTP	5 μ l	250 μ M
primer	1 μ l	20 pmol
MgCl2	1.5 μ l	3 mM
Taq	0.2 μ l	1 U
DNA	1 μ l	20~100 ng
合計	25 μ l	

表2 獣畜の各臓器からの分離菌株

検体 No.	疣	心	肺	肝	脾	腎	検出株
豚	1	○	○			○	Streptococcus属
	2	○					
	3	○	○				
	4	○				○	
	5	○	○		○	○	
	6	○	○	○			
	7	○	○	○	○	○	
	8	○	○				
	9	○	○	○			
	10	○	○		○	○	
	11	○	○	○			
	12	○				○	
牛	1	○	○	○	○	○	Actinomyces属
					○		Staphylococcus属
2	○	○	○	○	○	○	Streptococcus属

○：菌を分離

3 結果

牛No.1の肺から2種類の菌が分離されたほかは各獣畜で複数の臓器から1種類の菌が分離され、それらは「同一の菌種」と同定された(表2)。豚No.4と牛No.1、No.2については菌同定までに数日を要した。DNAの抽出法を検討した結果、AP40、AP43いずれのプライマーでも4方法すべてで同一のRAPDパターンが得られ、再現性も確認された(図1)。そこでもっとも迅速で簡便な血液寒天培地上のコロニーを煮沸する方法をDNA抽出に用いた。

「同一の菌種」について獣畜ごとにRAPD法を行ったところ、豚10頭、牛1頭でいずれのプライマーでも各臓器の分離菌株は同一の遺伝子パターンを示した(表3、図2)。豚No.2、No.6と牛No.1では一方のプライマーで異なる遺伝子パターンを示す菌株があった(表3、図3)。同一獣畜でも菌種が異なるとRAPDパターンにも違いが認められた(図3)。

表3 各臓器からの分離菌株のRAPDパターン

RAPDパターン	豚	牛
各プライマーで同一	10	1
AP40で異なる	0	1※
AP43で異なる	2※※	0
各プライマーで異なる	0	0

(頭)

※ 牛No.1: 肺の分離菌株で他と異なるパターン

※※豚No.2、豚No.6: 各分離菌株で異なるパターン

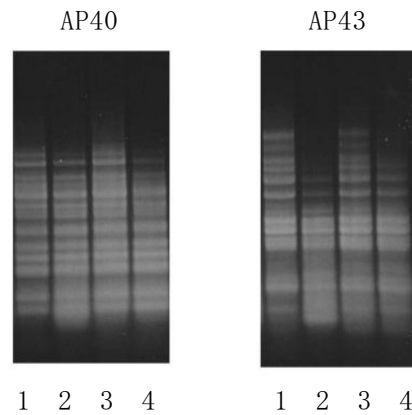


図1 DNA抽出法の違いによるRAPDパターン

豚No.12の疣状物からの分離菌株のRAPDパターン

- レーン1: 血寒コロニー煮沸
- レーン2: 血寒コロニーPCI
- レーン3: 純培養コロニー煮沸
- レーン4: 純培養コロニーPCI

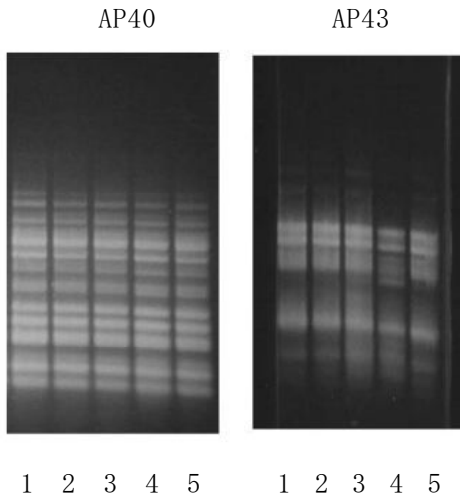


図2 「同一の菌種」のRAPDパターンの比較

豚No.10の各臓器からの分離菌株のRAPDパターン

- レーン1: 疣状物
- レーン2: 心臓
- レーン3: 肝臓
- レーン4: 脾臓
- レーン5: 腎臓

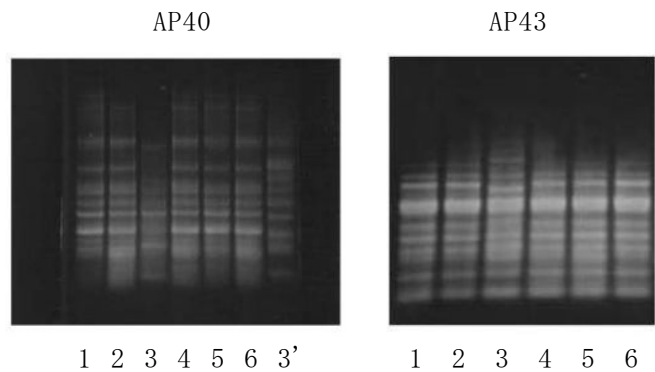


図3 牛No.1の各臓器からの分離菌株のRAPDパターン

- レーン1: 疣状物
- レーン2: 心臓
- レーン3、3': 肺
- レーン4: 肝臓
- レーン5: 脾臓
- レーン6: 腎臓

分離菌株はレーン1~6がActinomyces spp.

レーン3'がStaphylococcus spp.

4 考察

と畜検査における精密検査で疣状心内膜炎を伴う敗血症の菌検索を行うことは多く、その判定は迅速性を必要とする。しかしながら複数の臓器から菌が分離された場合、それぞれの病巣により菌の性状が異なる等の理由からそれらが「同一の菌種」であるか否かの判断が困難なケースも少なくない。また、そのため日数を要する生化学性状試験を行う場合もある。RAPD法は由来の同じ菌同士の遺伝子構造の類似性が高いことに着目した手法でそれ自身簡便で迅速性に優れている。

DNA抽出法の検討の結果、臓器を血液寒天培地にスタンプ培養したコロニーの煮沸法で良好な結果が得られたことからRAPD法をより簡便に短時間で行うことが可能である。今回、同一獣畜の各臓器から分離された菌が「同一の菌種」の場合RAPDパターンも一致し、異なる菌種の場合はパターンにも違いが認められ、RAPD法の結果と同定の結果が一致した。このうち一方のプライマーで異なるパターンを示す例もあったためプライマーの選定は重要と考えられる。さらに画像として確認出来ること、保存可能であることは結果の信頼性につながる。これらの結果から、RAPD法を用いた遺伝子パターンの比較はと畜検査における疣状心内膜炎をともなう敗血症診断の一助として有用であると考えられる。