

調査研究

豚エキノコックス症診断におけるPCR法の応用

高橋克滋、井島伸一、斉藤啓吾

1 はじめに

豚エキノコックス症（以下、E症）は、豚の肝臓に径2～20mm程の小結節を形成する疾病で *Echinococcus multilocularis*（以下、E.M.）の感染により発症する。従来本疾病の診断は、病理切片を作成しH.E.染色及びPAS染色を行いクチクラ層の有無を確認することで行われている。今回我々は、PCR法による本疾病の診断を可能にするためDNA抽出方法とプライマーについて条件を変えて検討を行った。更に、E疾病巣の大きさ毎にPCR法と病理検査の結果を比較し、若干の知見を得たのでその概要を報告する。

2 材料及び方法

- (1) 検査方法の検討は、網走管内Aとちく場で発見され、病理検査によりE症と診断された5検体
- (2) 病巣の違いによる検討は、肉眼的にE症と診断された33検体（小：2mm以下、中：2～10mm、大：10mm以上各11検体）の計38検体の70%エタノール固定肝臓病変部を使用した。
- (3) DNA抽出方法は、市販のDNA抽出キット（Easy-DNATM isolation kit; Invitrogen）（以下、A法）及びE.M.虫卵からDNAを抽出するために用いられているアルカリ処理法（以下、B法）、E.M.に特異的なPCRはBretagneらの報告したプライマー（UP1/UP2）（以下、C法）によるU1 snRNA gene及びDinkelらが報告したプライマー（P60F/P375R+PnestF/R）（以下、D法）によるミトコンドリア12SrRNA geneの増幅を試みることで行った。D法で増幅したPCR産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を確認した。また、病理検査は、常法に従い切片を作成し、H.E.染色及びPAS染色を行いクチクラ層の有無を確認した。

3 成績

- (1) 検査方法の検討で各方法の陽性数は、A法とC法の組み合わせで1/5、A法とD法は5/5、B法とC法は1/5、B法とD法は5/5、また、ダイレクトシーケンスの結果はDinkelらの報告とほぼ一致したが塩基配列に2ヶ所の相違を認めた。
- (2) PCR法（A法＋D法）と病理診断の病巣の違いによる検討は、小、中、大の順で、PCR、病理共に陰性が4検体、0検体、2検体、共に陽性は1検体、4検体、1検体。PCR陽性、病理陰性は6検体、7検体、7検体。PCR陰性、病理陽性は0検体、0検体、1検体だった。

4 考察

肝臓の病巣からのDNA抽出と特異的な遺伝子の増幅は、A法とD法の組み合わせが簡便で、良い結果を得ることができた。また、病巣の大きさによる検討では、各大きさの病巣でPCR法の方が高感度で、検査時間、操作性でも極めて優れており、1度に多数の検体を処理することができた。ただし、大結節でPCR陰性、病理陽性という検体が1検体認められたので、今後の検討を必要とした。将来的には、この方法でE症未発生地域や豚以外の動物へのE.M.の感染調査などに応用が可能であると思われる。

1 はじめに

昨年度、演者等はガスクロマトグラフ（GC）及びGC質量分析計を用いて異臭豚枝肉からその原因物質であるインドールおよびスカトールの検出に成功した。今回、散発するこの事例に迅速に対応するため、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた迅速、簡便な定量法を確立したのでその概要を報告する。

2 材料及び方法

- (1) 標準溶液；インドールおよびスカトール標準品をアセトニトリルに溶解し、これをアセトニトリルで希釈して調製した。
- (2) 試験溶液の調製；試料10 g をストマッカー80T用ポリ袋に採り、80%アセトニトリル20ml で2回抽出し、ろ過後ろ液に水250mlを加え、セップパックバック tC18（充填剤5g、予めアセトン70ml、水10mlで順次洗浄した。以後tC18と記す。）に注入し流出液を捨てた。次に、17%アセトニトリル30mlをtC18に注入し流出液は捨て、アセトニトリル10mlをtC18へ注入し流出液を試験溶液とした。
- (3) HPLCの条件；カラム：MightysilRP-18（4.6mm×150mm）、移動相：アセトニトリル-水（45：55）、流速1ml/分、検出波長：280nm、注入量：20 μ l、機器：日立L7000シリーズ（多波長検出器付）
- (4) 官能検査による閾値の検討；正常豚肉 5 g に最終濃度0.05から1.0ppmになるように標準溶液を添加して調製した試料について23人の検査員で官能検査を行い臭いの閾値を求めた。

3 成績

抽出溶媒、ろ液に加える水の量、tC18からの溶出方法、HPLCの検出波長等について検討を行い、上記の定量法を確立した。本法で調製した試験溶液には、測定妨害物となるピークは認められず、添加回収率（添加濃度 0.5ppm、n=3）は、インドールで84%、スカトールで82%であった。同じ異臭肉を用いて本法とGC法で定量（n=2）を行い、相関係数を求めたところ0.98であり1%水準で有意であった。本法の検出限界は、インドール、スカトールとも0.02ppmであり、官能検査の閾値0.3ppm、GC法の検出限界0.4ppmより低いレベルを十分チェックできた。

4 考察

異臭枝肉の原因物質を究明した報告は少ないが、消費者に安全な食肉を提供するためには、食肉衛生検査所での迅速な対応が必要である。今回の演者等が確立した定量法は、昨年報告したGC分析法と比較し、検出限界も低く、夾雑ピーク等の影響も無く、試験溶液の調製も迅速簡便に行えることから極めて実用性が高い。HPLCは、全国的にも多くの食肉衛生検査所に設置されている現状から異臭肉の原因物質を究明するため本法が広く活用されることを期待する。