

## 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

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、反芻動物にとって重要な慢性消化器感染症です。長い潜伏期間(6ヶ月～数年)の後、下痢が続き、栄養状態の悪化により死に至ります。治療方法が無いため、我が国では家畜法定伝染病に指定して、摘発・淘汰によるヨーネ病の防疫対策を進めています。ヨーネ菌の培養検査は最も重要なヨーネ病診断法ですが、ヨーネ菌の発育が極めて遅いため、検査結果を得るまでに通常2ヶ月以上を必要とします。そこで、培養期間を短縮することを目的として、ヨーネ菌培養用液体培地とリアルタイム PCR (ヨーネ菌 DNA 定量法) を組み合わせ、迅速なヨーネ菌培養検査法を確立しました。

#### ☆技術の概要

ヨーネ菌液体培養には、米国 B 社が開発した液体培地を、ヨーネ菌 DNA の検出・定量にはヨーネ菌の IS900 という遺伝子を高感度に測定するリアルタイム PCR 検査法を用いました。ヨーネ菌の培養は通常、糞便から行いますが、糞便中にはヨーネ菌以外の多数の細菌や真菌も存在するため、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ために抗菌剤による糞便の前処理が必要です。その前処理後に液体培地に接種し、2週間ごとに液体培養液の一部を取ってヨーネ菌 DNA を測定すると、液体培地中でのヨーネ菌の増殖スピードが分かります。そのヨーネ菌 DNA 量は培養2週間後には培養開始時点と比較して、100倍以上に達します(図1)。さらに、牛糞便50サンプルについて液体培養法と従来の寒天培地培養法を比較したところ、液体培養法は従来の寒天培地培養法より高いヨーネ菌検出率を示しました(表1)。このように、液体培養とリアルタイム PCR を組み合わせた検査法は、感度が高く、これまで2ヶ月以上を必要とした検査期間を1/4以下に短縮できる優れた方法です。

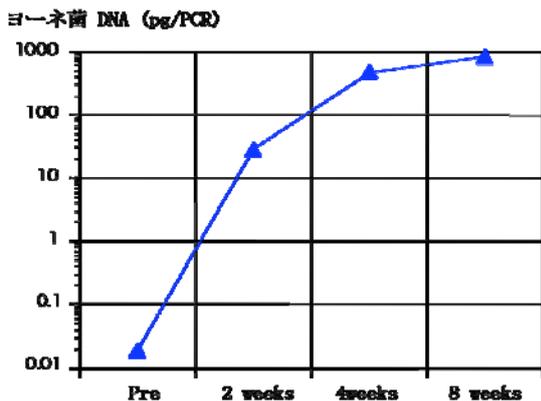


図1. 液体培地中ヨーネ菌DNA量の推移

表1. ヨーネ菌培養検査 -寒天培地と液体培地の比較-

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

\*ヨーネ菌検出率

#### ☆活用面での留意点

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。現在、B 社から国内関係機関(家畜保健衛生所等)へ向けて販売を進めようとしています。

詳細については、動物衛生研究所情報広報課 (TEL: 029-838-7708) までお問い合わせ下さい。

(動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム チーム長 森 康行)