

豚丹毒菌生ワクチン株と野生株とを識別できる PCR 法の開発

豚丹毒はグラム陽性細菌の豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) による豚の感染症で、家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されています。豚丹毒の予防には、生ワクチン及び不活化ワクチンが使用されていますが、現在、国内で使用されるアクリフラビン色素耐性の弱毒株である Koganei 65-0.15株生ワクチンは、接種豚に慢性関節炎を引き起こすことが指摘されてきました。しかし、本ワクチンは遺伝子マーカーを持たないため、関節炎病変部から分離される株が野生株であるか、あるいは、本ワクチン株であるかどうかの識別はこれまで不可能でした。そこで、Koganei 65-0.15株を特異的かつ迅速に同定することができる技術を開発しました。

☆技術の概要

1. ワクチン株のゲノム解析から、ワクチン株に特異的に認められるゲノム塩基配列のわずかな違い、すなわち一塩基多型 (SNPs) を同定し、その中から5個のSNPs をターゲットとしてPCRプライマーセットをデザインしました。これらのプライマーは、Forward プライマーの3'側から2番目と3番目の塩基に、それぞれ検出したいSNP と人工的に導入した mismatches の塩基を置くように設計されています (図1)。
2. これらのプライマーセットを用いてPCRを行うと、ワクチン株のゲノム上のSNPs 配列をターゲットとして増幅された遺伝子断片 (874bp、757bp、539bp、798bp、583bp) が確認できますが、Fujisawa 株など豚丹毒菌野生株では増幅されないことが確認されました (図2)。

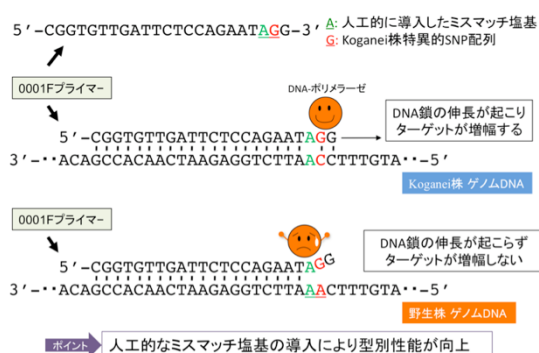


図1 ワクチン株ゲノム SNP 検出の原理

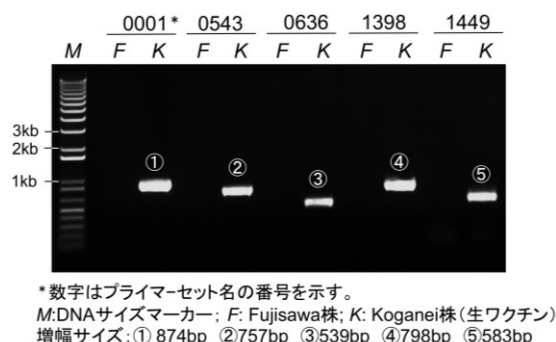


図2 PCR法によるワクチン株ゲノムSNPs

☆活用面での留意点

本検出法は、プルーフリーディング (3 → 5' エクソヌクレアーゼ) 活性及び遺伝子増幅能が高いKOD-FX等の酵素を用いることが重要です。また、使用するサーマルサイクラーによっては、一部のバンドが増幅されないことがあるので、アニーリング温度を上下に変更調節し、最適温度を決定します。詳細については、農研機構「お問い合わせ窓口」

<https://www.naro.affrc.go.jp/inquiry/index.html> までお問い合わせください。

(農研機構動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 下地 善弘)