

3 PCR法を活用した乳汁検査の検討

【はじめに】

栃木県内ホルスタイン種雌の乳房炎を含む泌乳器病は、平成20年から29年の家畜共済統計において病傷事故別件数の22～29%を占め、重要な疾病である[1]。乳房炎の原因は、病原微生物の侵入、環境、飼養衛生管理など多岐にわたる。原因となる微生物は様々であるが、*Staphylococcus aureus* (SA) や *Streptococcus agalactiae* (SAG)、マイコプラズマなどの伝染性のものと、環境性レンサ球菌(*S. uberis* (STU)、*S. dysgalactiae* (SDG) 及び *S. bovis* (SB) など)、*Trueperella pyogenes* (TP)、コアグラゼ陰性ブドウ球菌(CNS)、コリネバクテリウム、大腸菌群、真菌などの環境由来のものに大別される。

当所で実施している乳汁検査は、検体からの菌分離と薬剤感受性試験であり、SA以外の菌種同定はあまり行われていない。一部実施されていても、生化学的性状試験による同定のため、さらなる追加時間を必要とする。一方で、SAは泌乳中の治療は困難であること、STUはショート乾乳法と呼ばれる通常とは異なる治療法が有効との報告があることなどから、乳房炎原因菌の同定は治療方針に大きな影響を与える。また、平成30年度に管内診療獣医師を対象として乳房炎に対する意識調査を実施した結果、乳汁検査において必要であると考えられる事項は「原因菌の同定(59%)」、「薬剤感受性試験(36%)」及び「細菌数の測定(5%)」であり、原因菌の同定が重要と考えている獣医師が多いことが明らかとなった。

県北家畜保健衛生所

白井幸路、山田敦実、永井友香理、金子大成

表1 使用した菌種及び分離菌数とその由来

	疾病	
	乳房炎	その他
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0
<i>uberis</i>	2	0
<i>dysgalactiae</i>	2	2
<i>bovis</i>	2	0
<i>Trueperella pyogenes</i>	0	6

さらに、細菌検査の課題として「時間がかかる」、「菌種同定が難しい」をあげた獣医師が多く、時間のかからない正確な菌種同定が必要であると考えていると推察された。

そこで、迅速かつ正確な診断を行うことを目的として、当所で実施可能な乳房炎原因菌の同定を行うための Multiplex PCR (mPCR) を検討したので、その概要を報告する。

【材料及び方法】

乳房炎原因菌の同定状況調査 平成20年度から29年度までの乳汁検査結果を対象に、菌種同定に用いた簡易同定キットの種類、結果及び一致率を比較した。

菌株、検体及び培地 菌株は、当所保管又は県北食肉衛生検査所から分与されたものを用いた(表1)。増菌培地は Brain Heart Infusion 培地 (BHI 培地、日水製薬株式会社)、平板

表 2 各菌を検出するためのプライマー、反応条件及び増幅産物の大きさ

対象菌	目的遺伝子	プライマー	反応液中の 最終濃度 (μ M)	増幅産物の 大きさ (bp)	参考 文献
mPCR_1 (検体から直接検出)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	23S rDNA	SAS2F/SAS2R	0.24	894	2
<i>Streptococcus uberis</i>	cpn60	STUBF/STUBR	0.43	400	2
<i>S. agalactiae</i>	16S rDNA	STAGF/STAGR	0.33	317	2
mPCR_2 (発育したコロニーの菌種同定用①)					
<i>S. aureus</i>	<i>Thermostable nuclease</i>	NucF/NucR	0.33	279	3
<i>S. agalactiae</i>	23S rDNA	agaF/adyR	0.33	866	4
<i>S. dysgalactiae</i>	23S rDNA	dysF/adyR	0.33	1,508	4
mPCR_3 (発育したコロニーの菌種同定用②)					
<i>S. bovis</i>	23S rDNA	bsuF/bovR	0.33	167	3
<i>Trueperella pyogenes</i>	pyolysin	ploF/ploR	0.33	270	5
<i>S. uberis</i>	cpn60	STUBF/STUBR	0.33	400	2

培地はコロンビア 5%羊血液寒天培地 (BA、基礎培地:コロンビア寒天基礎培地、ベクトン・ディッキンソン株式会社) 又は普通寒天培地 (NA、日水製薬株式会社) を使用した。

遺伝子抽出 検体から直接抽出できるかどうか検討するため、SA、STU 及び SAG を BHI 培地に接種一晚培養した増菌培養液を市販牛乳に混合し、模擬乳汁検体とした。その検体 100 μ l 中の DNA を、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて抽出した。分離菌からの遺伝子抽出は、BA 又は NA にて 37°C 18 時間培養した後、発育したコロニーを滅菌蒸留水 1 ml に懸濁し、InstaGene Matrix (Bio-Rad) により抽出した。

mPCR 検体から直接検出用として mPCR_1、分離菌からの同定用として mPCR_2 及び 3 を表 2 のとおり設定した。まず、mPCR_1 の対象菌種

である SA、STU 及び SAG が検出できるか検討した。分離菌は、簡易同定キットの一致率が 99.9%であったものをそれぞれ選択した。Shome らの報告 [2] に従い、目的とする大きさの増副産物が得られるか確認するため、7.5 μ l の分離菌抽出 DNA を 12.5 μ l の REDTaq Ready Mix (SigmaAldrich) と混合し、プライマーミックス mPCR_1 を表 2 に示す最終濃度になるよう精製水とともに加え、サーマルサイクラーを用いて、94°C を 5 分、続いて 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒を 30 回実施し、最後に 72°C 10 分反応させた。模擬乳汁検体からの検出は、抽出 DNA を 10 μ l として同様に実施した。

各分離菌を同定するための mPCR は、3 菌種ごとを検出するプライマーミックス mPCR_2 及び mPCR_3 を表 2 に示す組み合わせにより実

表3 市販簡易同定キットを用いた菌種同定状況

対象菌種	実施数	一致率* (%)		
		最大	最小	中央値
レンサ球菌属	67	99.9	52.3	98.4
グラム陰性桿菌	53	99.9	37.7	98.2
ブドウ球菌属	33	99.9	33.0	97.4
コリネバクテリウム属	15	99.9	51.6	94.7
合計	168			

*菌種同定できなかったものは除く

施した。7.5 μ lの分離菌抽出 DNA を 12.5 μ l の REDTaq Ready Mix (SigmaAldrich) と混合し、プライマーミックス mPCR_2 及び 3 を表 2 に示す最終濃度になるよう精製水とともに加え、サーマルサイクラーを用いて、94℃を 5 分、続いて 94℃ 30 秒、53℃ 30 秒、72℃ 45 秒を 30 回実施し、最後に 72℃ 10 分反応させた。

それぞれの増副産物は、エチジウムブロマイドを加えた 1.5% Agarose S (ニッポンジーン) 及び 0.5x TBE Buffer を用いて確認した。各 mPCR の陽性コントロールは、対象菌抽出 DNA を等量混合したものをを用いた。

【結果】

乳房炎原因菌の同定状況調査 過去 10 年間における市販簡易同定キットによる菌種同定は、レンサ球菌属やグラム陰性桿菌を中心に全分離菌の 6.4% (168 分離菌) のみ実施され (表 3)、担当者により実施状況に差異があった。菌種ごとの一致率は、最大 99.9%、中央値は 94%以上である一方、最小値が 30%台の菌種もあった。各分離菌の同定に使用されていた市販同定キットは、Api 20E、Rapid ID 32E、Api 20NE、Api Coryne、Api Staph、Api Strep、ID32 Strep (いずれもバイオメリュー社) 及び

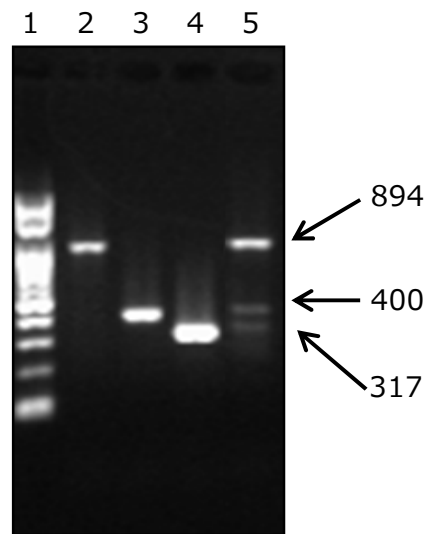


図1 検体から直接検出する mPCR_1

Lane 1: 100 bp DNA ladder、lane 2: *Staphylococcus aureus*、lane 3: *Streptococcus uberis*、lane 4: *S. agalactiae*、lane 5: Positive control.

ID テスト HN-20 (日水製薬株式会社) であり、同一菌種を同定する場合でも担当者や年度により異なるキットを用いていた可能性があった。

最も多く菌種同定が試みられていたレンサ球菌は、STU (32.8%)、SB (29.9%) が多く、SAG、SDG は 5%程度であった。グラム陰性桿菌は *Klebsiella pneumoniae* が最も多かった (24.5%)。SA は簡易同定キットを用いて同定

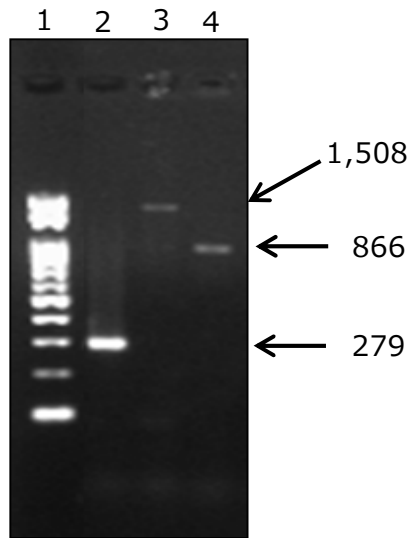


図2 レンサ球菌を同定するための mPCR_2
Lane 1: 100 bp DNA ladder、lane 2:
Staphylococcus aureus、lane 3: *Streptococcus*
dysgalactiae、lane 4: *S. agalactiae*。

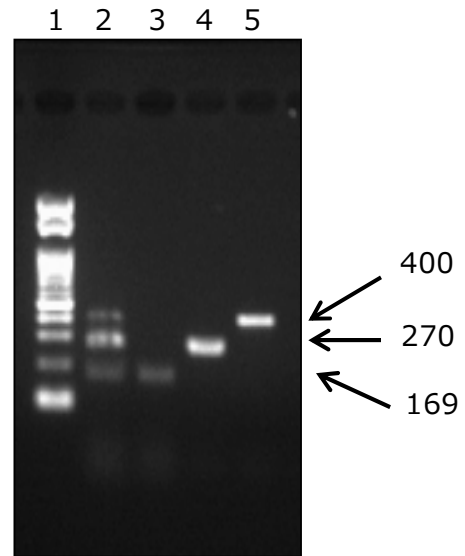


図3 レンサ球菌を同定するための mPCR_3
Lane 1: 100 bp DNA ladder、lane 2: Positive
control、lane 3: *S. bovis*、lane 4: *Trueperella*
pyogenes、lane 5: *S. uberis*。

している場合もあったが、多くはコアグラエ
ゼ反応の有無により判定していた。

mPCR 乳汁検体から直接 SA、STU 及び SAG を
検出するために、模擬乳汁検体を用いて
mPCR_1 を行った結果、目的とする大きさの増
幅産物を確認した。(図 1)。

培地上に分離したレンサ球菌を同定する
ための mPCR として、SA、SAG、SDG を検出す
る mPCR_2 及び SB、TP、STU を検出する
ための mPCR_3 を検討した結果、それぞれ目的とする
増幅産物を検出し(図 2 及び 3)、当所でも実
施可能であることが確認できた。また、各保

表 4 mPCR_2 及び 3 における各分離菌の検出状況

	mPCR_2		mPCR_3	
	Positive*	Negative**	Positive*	Negative**
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	0	0	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	0	1
<i>S. dysgalactiae</i>	4	0	0	4
<i>S. bovis</i>	0	2	2	0
<i>S. uberis</i>	0	2	2	0
<i>Trueperella pyogenes</i>	0	2	6	0

* 目的とする大きさの増幅産物が検出できたら陽性と判定

**目的とする大きさの増幅産物が確認されなかった又は増幅産物が検出されなかったら陰性と判定

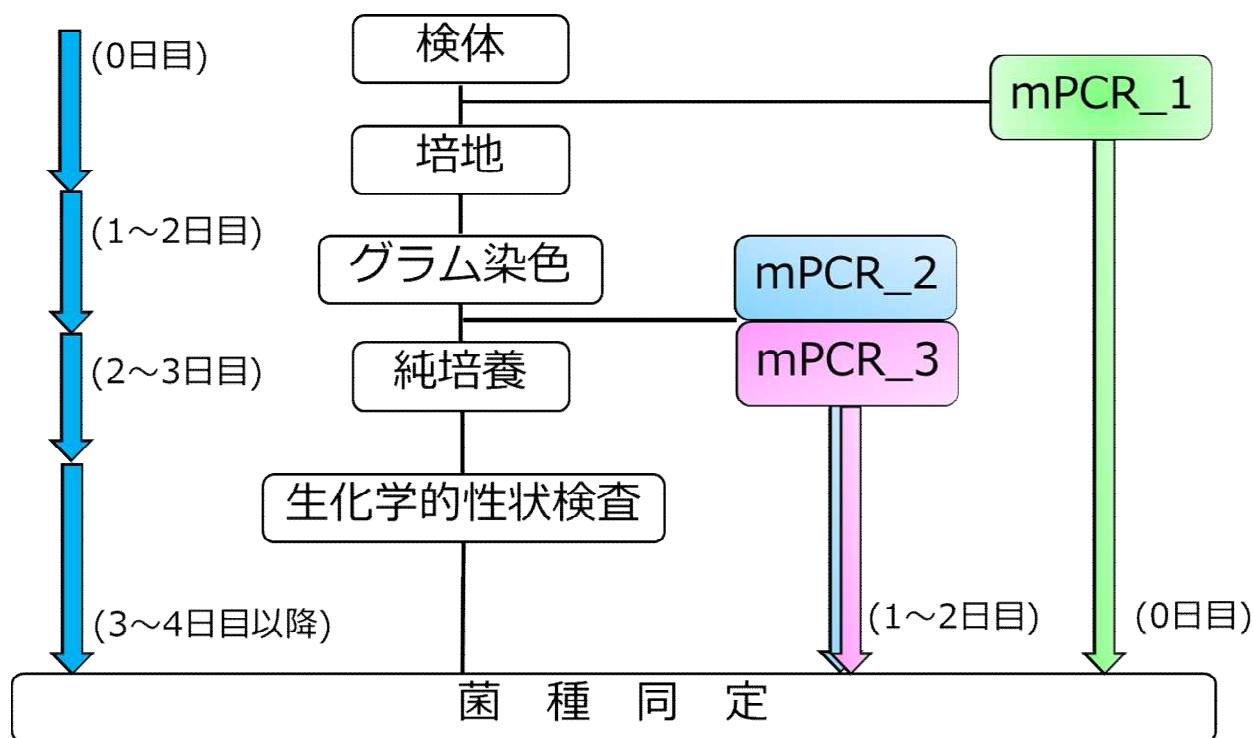


図4 mPCRを使用した場合の作業フローチャート及び菌種同定までに必要な日数

存菌等を用いて特異性を確認した(表4)。

作業マニュアル 図4に示すフローチャート式の作業マニュアルを作成した。

【考察】

SAやSTUなどの乳房炎原因菌の一部は菌種により治療方針が決まるため、原因菌を正確かつ迅速に検出することが必要である。加えて、同一菌種内でも分離菌により生化学的性状が異なる等の理由により、生化学的性状試験による菌種同定には限界があることから、菌種同定は16S rDNAや各細菌等に特異的な病原因子等の遺伝子配列を用いた遺伝子間の相同性により判定する方法が広く用いられている。さらに、本調査により、担当者により乳房炎原因菌の同定状況に差異があることや、SA以外の大部分の菌種同定が未実施で、一部の分離菌は簡易同定キットの一致率が30%

台と判定が難しい場合がある等の問題が明らかとなった。

これらの解決に加え、迅速な診断を行うことを目的としmPCRを検討したところ、当所においてもSA、STU及びSAGについて検体から直接対象菌遺伝子を検出することができた。さらに、STUを含むレンサ球菌の一部、SA及び培養条件によってはグラム陽性球菌に類似した形態を示すTPについて、培地上に発育したコロニーから菌種が判定可能であることが確認できた。以上のことから、本方法を使用することにより、従来法で最短2日目(通常は3~4日目以降)に判定していた菌種同定が、0日又は1~2日目に判定でき、回答までの期間を短縮できると思われた(図4)。

菌種同定に使用していた市販キットの一致率の中央値は94~98%以上であり、今後も活用可能であると推察された一方で、SAの判

定にコアグラマーゼ反応が多用されていたが、コアグラマーゼ反応陽性は SA だけではなく、*S. intermedius*、*S. hyicus* なども含まれ、コアグラマーゼ反応陰性 SA も一定の割合で報告されている[2]ことを考慮すると、コアグラマーゼ反応だけでなく、遺伝子検査等を用いた確認も必要であると考えられた。

今後は、mPCR 対応可能な菌種を広げ、検出感度を高めて臨床検体に運用可能かどうか検討することが求められる。加えて、当所で実施する乳汁検査の手法は 10 年以上見直されていないことから、現在使用している培地等についても再度検討し、検査精度の向上及び迅速回答に努める必要があると思われた。

【参考文献】

- [1] 家畜共済統計表、農林水産省ホームページ、統計情報
- [2] B. R. Shome, *et. al.* Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. J Appl Microbiol. 2011; 111(6):1349-1356.
- [3] O. G. Brakstad, *et. al.* Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992; 30(7):1654-1660
- [4] K. Kawata, *et. al.* Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. FEMS Microbiol lett. 2004; 237:57-64.
- [5] S. J. Billington, *et. al.* The variant undecapeptide sequence of the *Arcanobacterium pyogenes* haemolysin, pyolysin, is required for full cytolytic activity. Microbiology. 2002; 148(Pt