

豚の非定型抗酸菌症におけるリアルタイム PCR 法導入の検討

神奈川県食肉衛生検査所 ○吉澤 佳子、徳永 芳子、篠原 良輔*
田中 熱、和泉 晶子

*現神奈川県衛生研究所

はじめに

非定型抗酸菌症（以下、AM 症）は、豚の場合 *Mycobacterium avium*（以下、*M. avium*）及び *Mycobacterium intracellulare*（以下、*M. intracellulare*）が原因菌の大部分を占め、腸間膜リンパ節（以下、腸 Ly）、下頸リンパ節、肝臓等に病変を形成することが特徴である。本疾病は、豚では臨床症状を殆ど示さず、と畜検査時に判明するが多く、またヒトの AM 症の原因にもなるため、と畜検査における本疾病的確実な排除は公衆衛生上重要である。

当所では本疾病を疑う場合、直接鏡検で抗酸菌を確認する微生物検査及び組織学的に判断する病理検査を実施しているが、必ずしも肉眼所見に富む例ばかりではなく、検査を実施するも抗酸菌特有の所見が得られず処分の判断に苦慮することがある。一方、本疾病的検査法にリアルタイム PCR 法（以下、PCR）を活用することで一定の成果を挙げている報告や、肉眼病変は無いが抗酸菌を確認した事例も報告されている[1, 2]。

そこで、豚 AM 症の判断に苦慮する場合の PCR の有用性について検討したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 分離菌株の同定

平成 28 年 10 月～令和 5 年 2 月にかけて、当所所管と畜場（以下、と畜場）にて豚 AM 症と判断し全部廃棄処分された豚から分離された菌株 7 株の菌種同定を実施した。菌種は、16SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析した後、BLAST 検索により同定した。

2 PCR の有用性の検討

令和 5 年 1 月～5 月にかけて、と畜場に搬入され、当所にて豚 AM 症と判断し全部廃棄処分された豚 9 頭から採材した、腸 Ly13 検体（病変部 8、非病変部 5）及び肝臓 15 検体（病変部 8、非病変部 7）を用いた。まず、各検体から病変部及び非病変部をそれぞれ約 50-100 mg 採材し、乳剤濃度が 10% となるよう滅菌生理食塩水を加え、臓器を破碎する前に鏡検により抗酸菌の有無を確認した。次に滅菌蒸留水 900 μl を加えたビーズチューブに 10% 臓器乳剤の上清 100 μl を添加したものを各乳剤から 3 検体ずつ作成し（以下、分割検体）、[1]を参考に、ヨーネスピノ®ver2((株)ファスマック)を用いて DNA 抽出を行った。抽出し

た DNA 溶液は超純水で 5 倍希釈し、*Mycobacterium* 属菌の 16SrRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー[3]を加え、PCR 反応液を表 1 のとおり作成した。PCR 反応条件は表 2 のとおりとし、PCR は Thermal Cycler Dice® Real Time System III (タカラバイオ(株)) で行い、増幅曲線で Ct 値が得られ、融解曲線分析で Tm 値が陽性コントロールと同一であるものを陽性と判定した。

表 1 PCR 反応液の組成

試薬	量
QuantiTect® SYBR® Green	12.5 μL
AFB genus FWD-06 (10pmol/μL)	1.3 μL
AFB genus REV-01 (10pmol/μL)	1.3 μL
超純水	7.4 μL
5倍希釈DNA	2.5 μL
計	25.0 μL

表 2 PCR 反応条件

温度	時間
95°C	15分
95°C	15秒
60°C	30秒
72°C	30秒
融解曲線分析	

成績

1 分離菌株の同定

16SrRNA 遺伝子解析の結果、5 株が *M. avium*、1 株が *Mycobacterium fortuitum complex*、1 株が *Mycolicibacterium neoaurum* と同定された。

2 PCR の有用性の検討

鏡検及び PCR の判定結果、陽性検体数等を表 3 に示した。鏡検については抗酸菌を確認できた場合を+とし、PCR については、全ての分割検体で陽性を示した場合を+、一部の分割検体で陽性を示した場合を(+)とした。また、所見の少なさ等により採材及び調査ができなかった部位は N/A とした。

表 3 鏡検及び PCR の判定結果の比較

部位	方法	豚									陽性 検体数	検体数
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨		
腸 Ly	鏡検	+	+	+	+	+	+	+	-	N/A	7	8
	PCR	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	N/A	6	
非病変部	鏡検	-	-	+	N/A	-	N/A	-	N/A	N/A	1	5
	PCR	-	-	(+)	N/A	-	N/A	(+)	N/A	N/A	2	
肝臓	鏡検	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	0	8
	PCR	N/A	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	3	
非病変部	鏡検	N/A	-	-	N/A	-	-	-	-	-	0	7
	PCR	N/A	-	-	N/A	-	-	-	-	-	0	

腸 Ly の病変部では、鏡検で抗酸菌が確認できた検体は 7/8 であったが、PCR で陽性を示した検体は 6/8 であり、うち 2 検体は一部の分割検体で陰性を示した。また、腸 Ly の非病変部及び肝臓の病変部では、鏡検では抗酸菌を確認できないが PCR で陽性を示す検体が認められた。肝臓の非病変部では、全ての検体が、鏡検で抗酸菌を確認できず PCR で陰性を示した。

考察

当所で豚 AM 症と判断した豚から分離された菌株を用いて本疾病の原因菌種を調べた結果、3 種類の菌種が同定された。豚 AM 症の原因として *M. avium* 及び *M. intracellulare* が代表的である一方、これまでにも様々な菌種の分離が報告されている[4]。そのため、豚 AM 症の検査法として PCR を用いる場合、幅広い抗酸菌種の検出が可能なプライマーを用いる必要性が示唆された。

今回、豚 AM 症に対する PCR の有用性を検討した結果、腸 Ly の病変部においては、鏡検で抗酸菌が確認できた 7 検体のうち、PCR で全ての分割検体が陽性を示した検体は 4 検体のみであり、残りの 3 検体は一部または全ての分割検体で陰性を示した。このことから、現時点では、PCR より鏡検の方が有用な傾向にあった。一方、腸 Ly の非病変部及び肝臓の病変部においては、鏡検では抗酸菌を確認できなかった検体が、PCR では一部の分割検体で陽性を示す検体を認めたことから、PCR が有用である可能性が示唆された。これまでも、菌量が少ないとにより PCR で偽陰性となる可能性を示唆する報告[1]や、当所と比べて 1 検体あたりの採材量を増やして PCR を検討している報告[5]があることから、DNA 抽出時の検体処理方法について、検討を重ねる必要があると考えられた。

まとめ

当所における豚 AM 症の検査法として PCR の活用を検討した結果、腸 Ly の病変部では PCR より鏡検の方が有用な傾向にあったが、腸 Ly の非病変部及び肝臓の病変部では PCR が有用である可能性が示唆された。判断に苦慮する豚 AM 症事例に対して PCR を効果的に活用するには、DNA 抽出時の検体処理方法のほか、今回用いていない臓器やリンパ節の非病変部位や肉眼所見が乏しい部位等についても検討を要すると考えられた。

引用文献

- [1] 石丸歩, 富田幸子, 山本晃久 : リアルタイム PCR を用いた非定型抗酸菌症検査法の検討, 令和 3 年度全国食肉及び食鳥肉衛生研究発表会誌上発表抄録食肉, 16-18(2021)
- [2] 東谷市郎, 渥美仁, 永田隆光 : 豚の非定型抗酸菌症の病変の分布について, H9 年度食肉衛生技術研修会・衛生発表会資料, 212-214(1997)
- [3] E. T. Richardson, D. Samson, N. Banaei : Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 47, No. 5, 1497-1502(2009)
- [4] Adrian Muwonge : Non Tuberculous Mycobacteria in Swine: Is it a Public Health Problem?, Mycobacterial Diseases, Vol. 2, No. 2, 110-111(2012)
- [5] 西村那美, 橋口栄, 井上伸子, 手塚真弓, 高田勇人, 岸秀樹 : PCR 法を用いた豚非定型抗酸菌症の検査法の検討, 令和 2 年度全国食肉衛生検査所協議会微生物部会総会・研修会資料, 29-31(2020)