

動物検疫所が実施する遺伝子検査について

農林水産省動物検疫所精密検査部病理・理化学検査課

柳澤 成江

私が獣医大学の学生だった遠い昔、微生物学の授業で「コッホの4原則」というのを習いました。ドイツの細菌学者ロベルト・コッホ（1843～1910）が提唱した伝染病の病原体を特定するための指針です。それは、「伝染病に罹患した動物の体内には特定の微生物が存在する」「その微生物は体外で分離培養することができる」「分離培養できた微生物は感受性のある動物に感染して同じ病気を引き起こす」「その動物から同じ微生物が分離培養できる」というものでした。コッホの時代はまだウイルスは発見されていなかったのもこれは細菌病に関する考えでしたし、現在はこの原則に当てはまらない病原微生物も存在することがわかっていますが、今も伝染病を診断する上での大原則であることに変わりありません。

では、動物検疫所ではどのように輸入家畜の検査を実施しているのでしょうか？

本日は、動物検疫所がどのように伝染病の検査と診断を実施しているのかをご紹介します。私の課は遺伝子検査を担当していますので、遺伝子検査をどの場面で活用しているか、結果をどのように解釈しているのかについて解説します。難しい専門用語はなるべく避けますので、学術用語とは異なる語句もあることをご了承ください。

1 何を検査しているの？

動物検疫所では、輸入家畜が「伝染病を拡げるおそれがない」ことを検査しています。ですので内科や外科の病気は対象外です。そして、ここでいう伝染病というのは家畜伝染病予防法という監視伝染病のことです。全ての伝染病を対象にしているわけではないのです。

監視伝染病は「動物種」と「伝染病名」の組合せで決まっていますが、全部で99疾病もあります。輸入検疫期間は牛や豚は15日間、馬は10日間です。こんな短期間で全ての対象疾病の感染の有無を総当たり戦で確認するなんて物理的に不可能ですよ。どうしょう？

ちなみに、検疫の英語名 quarantine は、イタリア語で40を指す quarantena から来ているそうです。昔、ヨーロッパでは、外国から来た船を潜伏期間を見込んだ40日間停泊させて、船内で伝染病が発生しないかを確認していたそうです。隔離検疫の原点ですね。

現代の動物検疫所においても1つにはこの方法をとっています。急性の伝染病であれば、輸出国での輸出検疫開始から日本国での輸入検疫終了までの間に、何らかの症状が出る（発症する）だろうから、その症状を捉えて診断するというやり方です。

でも、この方法は急性伝染病には有効ですが、潜伏期が長かったり、症状が乏しかった

りする疾病では見逃す可能性がありますよね？そこで、そのような疾病は、症状の有無にかかわらず精密検査を実施することにしています。

2 どんな検査方法があるの？

精密検査の方法には大きく分けて2つあります。病原学的検査と抗体検査です。

病原学的検査とは、病原検索とも言い、感染している病原体を見つける検査のことをいいます。

大前提は、感染動物から採取した材料を培養して、原因病原体を分離することです。冒頭のコッホの原則がこれです。この方法は「感染していることが証明できる」確実な方法なのですが、培養には時間がかかってしまったり、うまく培養できる方法がなかったりで、時間制限がある動物検疫所にとっては不向きです。

そこで、遺伝子検査や抗原検査でまずは病原体の「形跡」を見つけ、形跡が見つかったら培養して「生きている（感染性のある）病原体が居るか」を調べるという「2段階捜査」を実施しています。遺伝子検査は病原体の遺伝子を探す検査、抗原検査は病原体を構成している蛋白質を探す検査で、その蛋白質にだけくっつく抗体という物質を使います。抗原検査の原理は次の抗体検査と同じです。

抗体検査は、血清学的検査とか免疫学的検査ともいいます。

動物は、体内に異物が侵入すると、免疫細胞が異物を認識し、その異物だけを標的とする特異的な抗体を産生して、抗体が異物を攻撃します。これを免疫反応と呼び、免疫源となる異物を抗原と呼びます。抗原と抗体が出会うと抗原抗体反応が起きます。

動物が伝染病に感染すると、その病原体を撃退しようとして抗体が血液中に産生されますので、その抗体を検出する方法が抗体検査です。

3 いろいろな検査方法があるけれど、どんなふうを選んでいるの？

いちばん大事なことは感染を見逃さないことです。いちばん適した時期にいちばん適した方法をどんぴしゃで実施するのが理想です。そのためにはまずは敵を知ることが大事です。典型的な感染経過を説明します。皆さんがインフルエンザに感染した時のことを思い出してください。感染直後から潜伏期間中は症状もなく病原学的検査も抗体検査も陰性です。その間にも体内で病原体が増えて来て、発症する少し前から病原体が検出可能となり、他個体への感染源にもなります。発症後しばらくすると免疫抗体が産生されて、抗体によって病原体が体内から駆逐され、症状が回復します。抗体が持続している間は同じ病原体に感染することはありません。このような典型的な伝染病では、感染中盤までは病原学的検査、感染終盤は抗体検査が適しています。

これは1個体での話で、1つの検疫群（ロットと呼んでいます）の全ての個体が同じ感染経過を辿っているわけではありません。ある個体は発病寸前、ある個体は発病中、ある個体はもう治った後かもしれません。ですので、1つの疾病について、病原学的検査と抗体検査を組み合わせることで、群内のいずれかの個体が検査で陽性になるように検査を組んで、見逃しを防いでいます。

4 検査結果を解釈する

検査で導き出された結果を解釈するには想像力が必要です。馬のインフルエンザ感染を例にとってみましょう。

例 1

馬Aはインフルエンザワクチンを接種していなかったので抗体を持っていませんでした。ある日、インフルエンザに感染してしまい、症状が現れたので遺伝子検査を実施したところ陽性でした。そこで培養検査をした結果、馬インフルエンザウイルスが分離されました。その後体調が悪化して死亡してしまいました。死亡時の抗体検査は陰性でした。

例 2

馬Bはインフルエンザワクチンを接種していなかったので抗体を持っていませんでした。ある日、インフルエンザに感染してしまい、症状が現れたので遺伝子検査を実施したところ陽性でした。そこで培養検査をした結果、馬インフルエンザウイルスが分離されました。その後回復し、回復後に抗体検査をしたところ、抗体が陽転していました。

例 3

馬Cはインフルエンザワクチンを接種していたので抗体を持っていました。ある日同じ畜舎の馬が発病したため、遺伝子検査を実施したところ、陽性でした。そこで培養検査しましたが、ウイルスは分離されませんでした。回復後に抗体検査をしたところ、前回の抗体価よりも4倍高くなっていました。

例 4

馬Dはインフルエンザワクチンを接種していたので抗体を持っていました。ある日同じ畜舎の馬が発病したため、遺伝子検査を実施したところ、陰性でした。後日抗体検査を実施したところ、前回の抗体価よりも4倍高くなっていました。

例 5

馬Eは、インフルエンザワクチンを接種していたので抗体を持っていました。ある日同じ畜舎の馬が発病したため、遺伝子検査を実施したところ、陰性でした。後日抗体検査を実施したところ、前回の抗体価と同じ値でした。

皆さんは、馬A～Eの違いがわかりましたでしょうか？

馬AとBは、生きた病原体が分離されているので感染が証明されています。抵抗力がなかったAは抗体を産生する前に死に、Bは産生した抗体によってウイルスを撃退して回復しました。

馬Cは遺伝子検査陽性でウイルス分離陰性です。この馬はインフルエンザに感染したのでしょうか？答えはYES。抗体価が上昇しているのは、生体がウイルスを認識して免疫反応が起きた証拠なのです。

では馬Dは？これも抗体価が上昇しているのでYESです。

CもDもワクチンの抗体があったので、感染はしたけれど不顕性感染（症状が出ない）でした。不顕性感染でもウイルスを排泄して感染源になりますが、CもDも生きたウイルスは分離されなかったので感染源になった可能性は低いです。CとDで遺伝子検査の結果が異なっているのは、不顕性の度合いがDの方が軽かったからだと考えられます。

では馬Eは感染したのでしょうか？答えはNOです。抗体価に変化がなく、感染した形跡は認められません。

どうでしょうか？検査結果の解釈の仕方のイメージが掴めたでしょうか？実際には疾病の種類によって異なり、抗体が陽転しても持続感染する疾病もあります。また、発病馬といつから同居していたのか、収容場所は近いのか、など、様々な要素がありますので、検査結果を基に、客観的に解釈を進め、診断と検疫対応を決めて行きます。

5 遺伝子検査とは？

では、本日の本題である遺伝子検査についてお話していきましょう。

遺伝子検査とは、生物が持っている遺伝子を検出したり、遺伝子の配列情報を調べることです。遺伝情報とは生物の構造や機能を掌るタンパク質のアミノ酸配列の情報をいいます。

遺伝子のことを核酸といいます。核酸にはDNA（デオキシリボ核酸）とRNA（リボ核酸）があります。DNAには4つの塩基（A：アデニン、G：グアニン、T：チミン、C：シトシン）があり、塩基3つの組合せから20種類のアミノ酸が作られます。アミノ酸から様々な蛋白質が合成されます。蛋白質は生命体の素材ですので、遺伝子は生命の設計図なのです。

皆さんは遺伝子検査と聞いて何を想像しますか？私は「科捜研の女」とか「法医学教室の午後」など警察の鑑識捜査を思い浮かべます。遺留物の血痕や髪の毛から犯人を特定していくあれです。他に、遺伝病の検査や遺伝子組み換え食品の検査など、ひと言で遺伝子検査と言っても、様々な目的に利用されているのです。

では、動物検疫所では、どんな検査で遺伝子検査を実施しているのでしょうか？

「生体や畜産物から直接、病原体の遺伝子を検出する。」「培養した培地中に、目的の病原体が発育したかどうかをその病原体遺伝子を検出することで確認する。」「畜産物の動物種を調べる。」「飼料用魚粉中に反芻動物の蛋白質が含まれていないか確認する。」などに使っています。

輸入動物で、症状の有無にかかわらず実施している遺伝子検査

動物種	疾病名
牛	ヨーネ病、アナプラズマ病
豚	豚流行性下痢
馬	馬ピロプラズマ病、馬インフルエンザ、馬伝染性子宮炎
初生ひな	鳥インフルエンザ、サルモネラ症

輸入畜産物で、必要に応じて実施している遺伝子検査

畜産物の種類	検査
飼料用魚粉	反芻動物蛋白質の検出（BSE が対象）
畜産物	動物種鑑別、病原体遺伝子の検出（アフリカ豚コレラ）

遺伝子検査のメリット：

- ・ 病原体の培養が難しかったり、培養に時間がかかる疾病に有効。
- ・ 病原体遺伝子の存在の有無を確認することによって、培養結果を待たなくても迅速に陰性か陰性でないかの判断が可能。
- ・ 例え生きた病原体が分離できなくても、遺伝子の配列情報から、病原性の有無や遺伝子型別やデータベース上の株との近縁性などがわかる。

遺伝子検査の注意点：

- ・ 死んでいる（感染源とはならない）病原体の遺伝子も検出される。
- ・ 材料中に増幅を阻害する物質が含まれていると、偽の陰性となる場合がある。
- ・ 似た遺伝子配列を持つ別の遺伝子を増幅させてしまうことがある（非特異的な増幅）。

6 遺伝子検査の原理

動物検疫所が普段実施している遺伝子検査法には以下のようなものがあります。

- ・ PCR 法、RT-PCR 法
- ・ realtimePCR 法、realtimeRT-PCR 法
- ・ LAMP 法

「RT-○○」という方法を耳にすることがよくあると思います。ウイルスの遺伝子検査で見かける方法です。私達人間や細菌はDNAを遺伝子として複製を行っていますが、ウイルスの中にはRNAを遺伝子としているものがあります（インフルエンザなどがそうです）。RNAを遺伝子としているウイルスの検査をする場合、逆転写反応（reverse transcription：略してRT）という一手間をかけて、DNAを作ります。RT-○○と聞いたらああ、RNAウイルスの検査なんだなあと思うぐらいでいいと思います。

このように遺伝子検査にはいくつかの方法がありますが、原理はどれも同じです。あまり詳しく説明すると途中で聞くのが嫌になってしまうので、簡単に説明します。

生体内での DNA の複製方法を人工的に再現したのが PCR（Polymerase Chain Reaction）法です。

生体内では

DNA は塩基が繋がった 2 本の鎖がくっついた二重らせん構造をしているという話は聞いたことがあるでしょうか？DNA には 4 種類の塩基（A：アデニン、T：チミン、G：グアニン、C：シトシン）があります。いつもペア（A と T、G と C）を組んでいて、決まった相手とし

か手を繋ぎません。DNA は塩基が連なった 2 本の鎖が、ペア同士が手を繋いだ状態で存在しています。

DNA が合成される時は、このペアの手繋ぎが酵素で離れて 1 本鎖になり、そこに増幅のきっかけとなる短い塩基配列（プライマーという）が相補的（A には T が、C には G がくつつくこと）に結合して、そこから酵素により次々と相補的な塩基が合成されて鎖が伸びていきます。これで、2 本鎖 DNA 1 組から 2 本鎖 DNA が 2 組できました。合成された鎖が伸びていく方向は決まっていますので、鎖がこんがらがってしまうことはありません。

生体内の反応を人工的に再現すると

人工的に再現するにはどうしているのでしょうか？

2 本鎖 DNA は熱（94～98℃）をかけると塩基の手繋ぎが離れて 1 本鎖に分かれ、温度が下がる（50～65℃）と再びペア塩基が手を繋いで 2 本鎖になるという性質があります。そこで、人工的に作ったプライマーと塩基を作る素材（DNA 合成酵素）を混ぜて、人工的に熱を上げ下げしてみれば？

プライマーとは、人工的に塩基（A、T、C、G）を繋げて作った 1 本の短い鎖です。プライマーは増やしたい部分の遺伝子配列を挟むように 2 種類用意します。もし検査材料中に目的とする病原体の遺伝子がいれば、病原体の遺伝子の鎖にプライマーがくつつきます。温度を上げ下げしていくうちに、プライマーに挟まれた部分の遺伝子配列が、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍・・・と 2 倍算でどんどん増えて行きます。これが PCR 法の原理です。

遺伝子配列のどこを増やすのがいいか？

皆さんが何かの病原体の遺伝子を PCR 法で検出したいとしたら、どんなプライマーが欲しいですか？

- ・プライマーに挟まれて増幅される遺伝子の配列が、他の病原体と共通する配列だったら、区別がつかなくて嫌ですね。
- ・プライマーが結合する部分の塩基配列が、どんどん変異していくような部分だったらプライマーがくつつかなくなってしまう、増幅しなくなってしまう。これも嫌ですね。

何かの病原体の遺伝子を検出したい時に使用するプライマーは、その病原体にしかない（特異的な）配列で、塩基配列が簡単には変異しない安定的な部分が適しています。

では、何の病原体かはわかっている遺伝子について、遺伝子の変異の確認や遺伝子型別をしたい時に使うプライマーはどうでしょう？

プライマーが結合する部分は安定的な配列で、増幅される配列が病原体の株によってそれぞれ違って来る、という方法もありですし、プライマー結合部が変異しやすい部分で、増幅すれば何型、増幅しなければ何型という方法もありですね。

遺伝子検査の目的によって、増幅させたい領域が異なるということをご理解いただけたでしょうか？一番大事なのは、目的の遺伝子だけが増幅することです。そのために間違った増幅を防いだり、見分けたりする方法もあります。

7 PCR 法の手順

検査材料には目的の病原体が入っていそうな材料を用います。血液、鼻腔スワブ、糞便、臓器などです。「目的の病原体が入っていそうな材料を使う」というのは伝染病の診断では一番重要なんです。当たり前なようで、案外難しいんです。

まずは材料から遺伝子（=核酸）を抽出する作業を行います。市販の遺伝子抽出試薬で細胞や核を壊して核酸を取り出します。この中には病原体の核酸もいるかもしれませんが採材した動物の核酸も含まれています。

ターゲットとする病原体を検出するためのプライマーと、DNA を合成するための原料に、検体の核酸を添加して、サーマルサイクラーという温度を上げ下げする装置にかけます。温度を上げ下げする工程を 40 サイクル程度繰り返すと、プライマーで挟まれた部分の塩基配列が 1 サイクル毎に 2 倍に増えて行きます。

増幅工程終了後に、アガロースゲル電気泳動という方法で、目的の遺伝子が増えたかどうかを確認します。増幅させた後の検体を、ゲル（四角い平べったい寒天の板みたいな物）の中に入れて電気を流すと、小さいサイズの遺伝子ほど遠くへ流れていきます。プライマーで挟まれた塩基数（増幅した遺伝子の鎖の長さ）はわかっていますので、そのサイズのバンドが検出されていれば陽性、検出されていなければ陰性です。

電気泳動せずに遺伝子の増幅を確認できる PCR 法をリアルタイム PCR 法といいます。試薬の中に蛍光を発する物質を入れておき、蛍光強度の増加で遺伝子の増幅状況がリアルタイムでわかる、という方法です。

PCR 検査は、検査したい検体と、陰性とわかっているもの（陰性コントロール）と陽性とわかっているもの（陽性コントロール）とを一緒に行います。陰性であるべきものは陰性、陽性であるべきものは陽性という結果にならないければ、その検査は正しいとはいえません。

結果が陽性だった場合、シーケンサーという装置で増幅された遺伝子の塩基配列を読むことができます。その配列をデータベースと比較することで、確かに目的の遺伝子が増幅されていたという裏付けが得られますし、いつ、どこで分離された株と近縁か、などの情報を得ることができます。

8 ヨーネ病定量リアルタイム PCR 法の紹介

本日最後のお話になりました。

現在動物検疫所が実施している遺伝子検査の中で、一番活躍しているのはやはりヨーネ病でしょうか。どんな検査方法なのかご紹介したいと思います。

ヨーネ病という病気は、だいたい生後 6 ヶ月以内に感染して、長い潜伏期に入ります。分娩等のストレスで発症しますが、それまでの長い年月、病原学的検査でも抗体検査でも見つけることが難しい病気です。潜伏期の間、間欠的に糞便中に菌を排菌しますが、採材した時がちょうど排菌してる時とは限りませんし、ヨーネ菌の培養には 12 週間もかかりま

す。まったく動物検疫所泣かせの病気です。

ヨーネ病は、生きている菌が分離培養されれば患畜です。ですが菌の培養には時間がかかります。そこで、現在は、定量リアルタイム PCR 法で、反応液（糞便から核酸を抽出した液）の遺伝子量が 0.001pg 以上あれば患畜と診断しています。

定量リアルタイム PCR 法というのは、目的の遺伝子の有無だけでなく、遺伝子量もわかる方法です。検体と一緒に既知濃度の陽性 DNA を増幅させて、検量線を作成します。ヨーネ病の場合は 1pg、0.1pg、0.01pg、0.001pg の DNA で検量線を作成します。そして、検体の遺伝子増幅を検量線へ当てはめることで、検体の遺伝子量を算出します。

動物衛生研究部門の研究の結果、遺伝子量 0.001pg 以上で糞便培養陽性と高い一致率を示します。このデータに基づき、遺伝子量 0.001pg 以上（定量陽性と呼んでいます）は糞便培養陽性と同等とみなし、培養結果を待たずに患畜と診断しています。速やかに患畜を牛群から排除することで、感染の機会を減らすことができます。

定性陽性牛は、感染してるの？

遺伝子量が 0.001pg 未満（DNA 陽性とか定性陽性と呼んでいます）だった場合、その牛は感染してるの？してないの？

これは難しい判断です。わかることは、「牛の体内からヨーネ菌遺伝子が出てきた。」という状況証拠だけです。真に感染していて、たまたまその日は排菌量が少なかったかもしれないし、感染はしてないけれど菌をたまたま飲み込んでそれが排泄されただけかもしれません（通過菌といいます）。

「牛の体内からヨーネ菌遺伝子が出てきた。」という状況証拠から言えることは、「その牛は、ヨーネ菌が存在する環境にいたことがある。」ということです。

定量陽性牛や定性陽性牛を解剖して腸管付属リンパ節の PCR を実施すると、陽性になる場合もならない場合もあります。通過菌であっても定量陽性にもなりますし、菌が生きていれば培養検査で陽性になりますので、本当に感染していたかを確認するためには、臓器内からヨーネ菌を見つけるしかないのです。これでようやく「感染していた（体内の臓器に菌が取り込まれていた）」という判断になります。

輸入検疫中の検査でヨーネ菌の遺伝子が見つかった場合

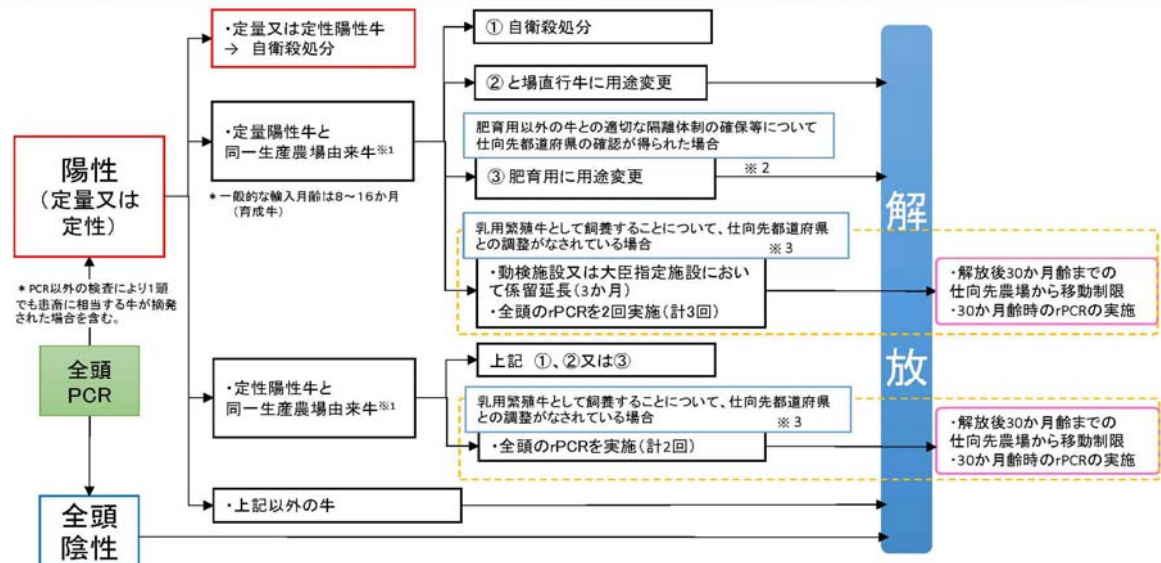
定量陽性又は定性陽性の牛が見つかった場合、「牛のヨーネ病防疫対策要領」に順じた検疫対応をとっています。

牛のヨーネ病防疫対策要領

定性陽性牛は自主淘汰を推進。

ヨーネ病発生農場（カテゴリーⅡ農場）から牛を導入する場合は、過去 6 ヶ月以内に最低 3 ヶ月間隔を空けた 2 回以上の抗原検査（遺伝子検査又は培養又はその両方）により陰性が確認すること。併せて導入後に 1 回以上の抗原検査を実施すること。

豪州産繁殖用牛のヨーネ病検査に係るフローチャート



※1 ヨーネ病は年齢により疾病感受性に差があることが知られており、6か月齢以下の子牛は感受性が高いことから、生後6か月の間に定量又は定性陽性牛と同居した牛は感染の可能性が否定できないため、本フローチャートにおいて、生産農場とは『牛が出生以降6か月間に飼養された農場』と定義する。

※2 摘発状況等を勘案した上で、必要に応じて再検査(rPCR)を実施する。

※3 詳細については、別紙「輸入検査でヨーネ病が摘発された際の対応」を参照。

定量又は定性陽性牛と同一生産農場由来牛について、乳用繁殖用として解放する場合、定量陽性牛の同居牛については3か月間係留を延長し、全頭のrPCR検査を2回行った上で、陰性を確認して解放する。定性陽性牛の同居牛については、係留期間中に再度rPCR検査を行い、陰性を確認した上で解放する。解放後は、原則として30か月齢まで仕向先農場からの移動を制限するとともに、30か月齢時のrPCR検査の実施を指示する。

※4 摘発の規模が大きく、豪州において適切な措置が講じられていないと判断された場合には、乳用繁殖用としては解放を認めない場合がある。

定量陽性牛は患畜として殺処分します。

定性陽性牛は、感染が成立しているかどうかは遺伝子検査だけでは判断できませんが、菌が排泄されたのは明白ですので、将来の発症リスクを考慮して自主淘汰をお願いしています。

ヨーネ病は6か月齢以下の子牛で感受性が高い疾病であることから、生後6か月齢までの間に定量陽性牛や定性陽性牛と同じ生産農場で飼育されていた牛は、ヨーネ菌が居た環境下で育っているため菌に感染している可能性があります。ですので、同一生産農場由来の牛については追加検査を行っていますが、果たして感染しているのかいないのか、その結果が出るまでには長い月日がかかります。いちばん望ましいのは、ヨーネ菌が居ない環境で生まれ育った牛を輸入することです。

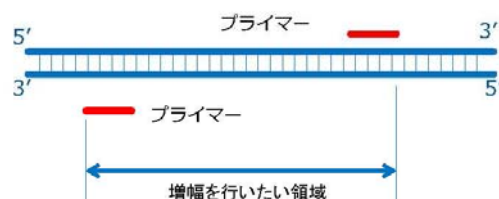
以上で本日のお話は終わりです。

遺伝子検査が伝染病の診断に取り入れられるようになり、培養検査より格段に早く診断ができるようになりました。鳥インフルエンザや豚コレラなど初動防疫が何より重要な疾病にとって、遺伝子検査は最強の武器です。

今では遺伝子診断によって将来の病気予測までできるようになり、疾病診断のあり方も大きく変わろうとしています。

2. PCR の原理

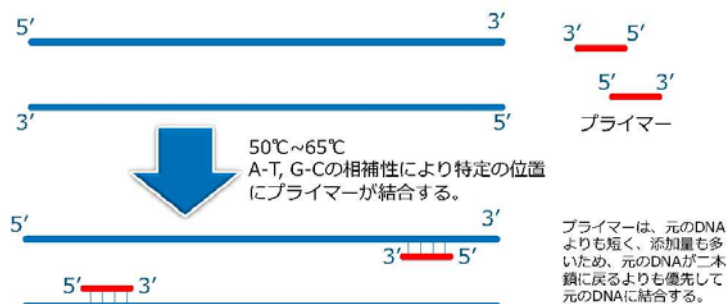
- ① まず、増幅を行いたい領域を設定し、プライマーを設計します。プライマーは増幅を行いたい領域を挟むようにペアで設計します。



- ② ステップ 1 では、鋳型となる二本鎖 DNA を熱変性させて一本鎖 DNA に解離させます。DNA は塩基間の水素結合により二本鎖になっていますが、94℃から 98℃に温度を上昇させると、その塩基間の水素結合が切断され、二本鎖 DNA が一本鎖に解離します。



- ③ ステップ 2 では、一本鎖になった DNA にプライマーを結合させます。温度を 50℃から 65℃に下げると、一本鎖になった DNA は再び二本鎖に戻ろうとしますが、反応液に加えてあるプライマーは、元の DNA よりも短く、量も多いため、元の DNA が二本鎖に戻るよりも優先して鋳型の DNA に結合します。この時、塩基の A-T, G-C の相補性により、特定の位置にプライマーは結合します。

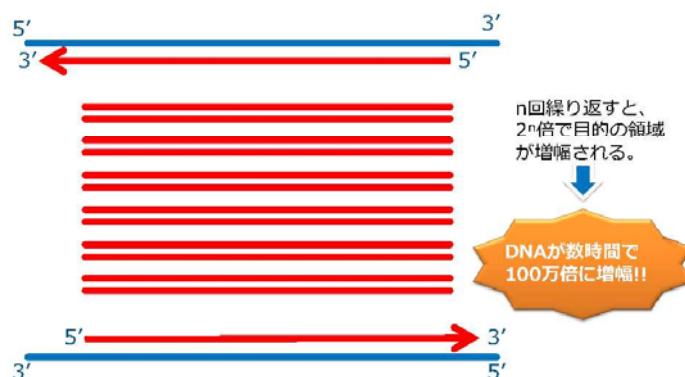


- ④ ステップ 3 では、DNA ポリメラーゼによって、プライマーから元の DNA の相補鎖が合成されます。

温度を DNA ポリメラーゼの至適温度まで上昇させると、DNA ポリメラーゼによる合成反応が開始されます。



- ⑤ 以上の3ステップの反応を繰り返し行うことにより理論的には n 回で 2^n の n 乗倍に目的の領域が増幅されます。こうして DNA が数時間で 100 万倍に増幅されます。



3. PCR 反応について

1) PCR サイクルの各ステップについて

【熱変性】

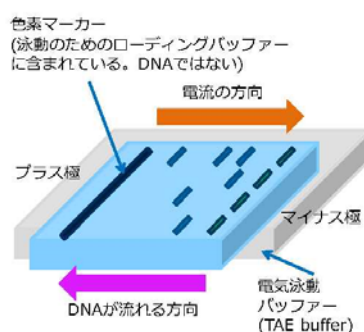
通常、サンプルに含まれる鋳型 DNA は二本鎖 DNA であり、そのままでは DNA 伸長反応に用いることはできません。そこで、熱で一本鎖 DNA に解離(変性)してからサイクルを進めます。これが十分でないと増幅効率が低下し、逆に温度が高すぎたり、長すぎたりすると、酵素の失活を早めることになります。ゲノム DNA を鋳型とする場合は、初期熱変性を完全に行うため時間を長めに設定します(95℃, 1~3 分)。なお、サイクル中の熱変性は増幅産物の解離が目的であるため、1~30 秒程度で十分です。

4. アガロースゲル電気泳動について

1) アガロースゲル電気泳動の原理

寒天の主成分であるアガロースを使用した電気泳動により、核酸（DNA）をその大きさに応じて分離する方法です。PCR が終了したのち、反応産物が目的のものであるかどうかを確認するために行います。

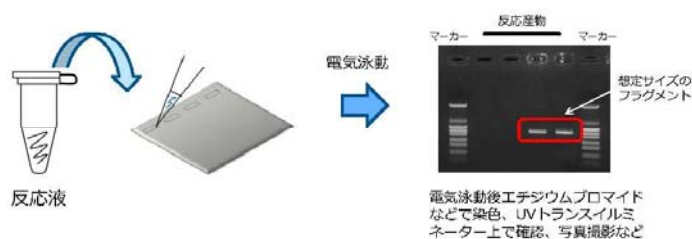
アガロースは二種類の糖が結合しあつて網目状の構造をとっており、その網目を DNA が動いていく際に、大きな DNA は網目に引っかかりながら移動するため移動速度が遅く、小さな DNA は網目に引っかかりにくいので移動速度が速いという性質を利用することで、DNA を長さによって分離することができます。DNA は水溶液中ではマイナスの電荷を帯びているため、電場におかれるとプラス極側に移動します。



2) アガロースゲル電気泳動の用途 (PCR 増幅産物の確認法)

【PCR 増幅産物のサイズの確認】

プライマー設計で想定した大きさの増幅断片が得られていることをアガロースゲル電気泳動で確認します。PCRの反応液の一部を泳動の目安となる色素を含み、比重を高めるためのローディングバッファーと混合し、アガロースゲルのウェル（窪み）にブレイヤーします。電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドなどで染色を行うと UV トランスイルミネーター上で DNA が確認できますので、写真撮影を行います。増幅断片の大きさは、同時に泳動するサイズマーカーより確認します。



III. ヨーネ病遺伝子検査（糞便中のヨーネ菌 DNA の検出）

ヨーネ菌には種々の特異的遺伝子や挿入配列（IS）が存在し、それらを利用した Polymerase Chain Reaction（PCR）によるヨーネ菌遺伝子検出系が既に多く報告されている。それらの中でヨーネ菌 IS900 をターゲットとする PCR は、本 IS がヨーネ菌に 15～20 コピー存在するため（Green, 1989）、高い感度が得られる検出系として有用である。一方、IS900 の DNA 塩基配列にヨーネ菌株間の差は殆どないが、スウェーデンで分離されたヨーネ菌以外の抗酸菌である *Mycobacterium* sp. 2333 株は、IS900 と高い相同性（94%）有する IS を保有することが報告されている（Englund, 2002）。そこで、*Mycobacterium* sp. 2333 株を含めヨーネ菌と類似した抗酸菌とは交差しないように PCR 用のプライマーを設計し、種々のリアルタイム PCR 用反応液を比較検討することにより、感度と特異性ともに優れた検査法が確立された。

1. 測定の原理（蛍光色素を用いたインターカレーション法）

ヨーネ菌のみが持つ IS900 中の特定塩基配列を、PCR により試験管内で増幅する。この時、二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光色素である SYBR Green I を反応系に添加しておくことにより、反応の進行に伴って増幅された二本鎖 DNA に SYBR Green I が取り込まれ（インターカレーション）、DNA への結合により蛍光強度が増加する（図 1）。PCR の伸展反応過程で反応液の蛍光強度を測定することにより、PCR 産物の増加をリアルタイムで検出することが可能となる。

インターカレーション法によるリアルタイム PCR では、非特異的な DNA が増幅された場合にも蛍光強度が増すため、特異的反応と非特異的反応を区別するために解離温度解析（メルトカーブ解析、あるいはディソシエーション解析）を行う。二本鎖 DNA はその塩基配列により Tm 値（二本鎖 DNA の半分が一本鎖に解離する温度）が決まるため、PCR 後に反応液の温度を少しずつ上昇させ、二本鎖が一本鎖に分かれる温度、つまり DNA に取り込まれていた蛍光色素が外れて、蛍光強度が急激に低下する温度を分析する。図 2 に示した例では、増幅された IS900 の PCR 産物は 88℃付近から一本鎖に分かれはじめるが、非特異的増幅産物は 80℃付近から蛍光強度が下がり始めるので、両者を簡単に区別することが可能である。さらに、リアルタイム PCR 検査では PCR によりターゲット遺伝子の増幅が指数関数的に起こる領域内に閾値を設定し、蛍光増幅曲線が閾値と交差する点を Threshold cycle（Ct）値とし（図 3-A）、Ct 値から各サンプル中のターゲット遺伝子の初期濃度を算出することが可能である。初期 DNA 濃度算出用の検量線を作製するために、異なる濃度の参照 DNA の Ct 値に対してそれぞれの DNA の含有量（対数値）をプロットし（図 3-B）、検量線の一次関数式を求める。本式を用いて、未知サンプルの Ct 値よりサンプル中のターゲット遺伝子量を算出することが出来る（図 3-B）。

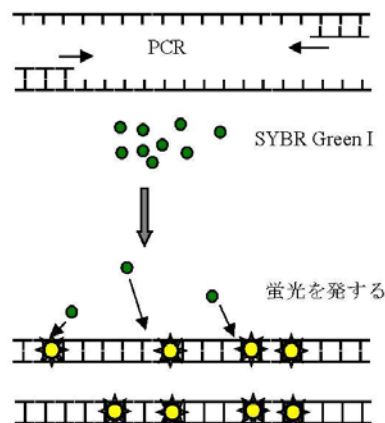


図 1. SYBR Green I インターカレーター法

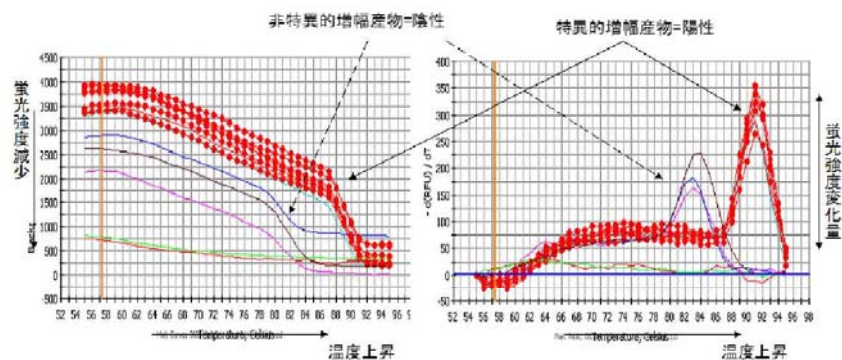


図2. 融解曲線解析による特異性の検討
左図：温度上昇により解離温度に達すると蛍光強度が低下する。
右図：上記のデータを一次微分した結果

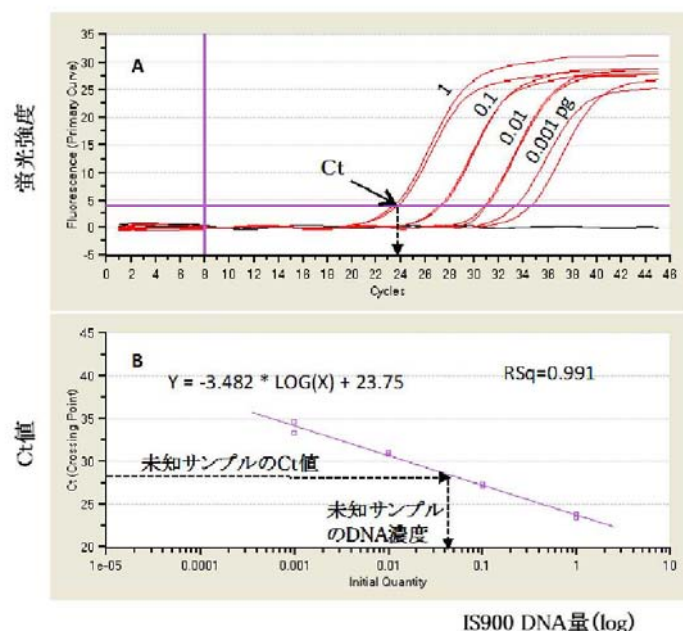


図3. スレッシュホルド・サイクル値 (Ct値) および検量線による糞便中
ヨーネ菌IS900DNA量の算出法
A: 指示陽性DNAを10倍階段希釈し、各well当たり1~ 0.001 pgの
DNAを添加した時の蛍光増幅曲線
B: 各濃度の指示陽性DNAサンプルにおけるCt値より求められた検
量線 ($Y = -3.482 * \text{Log}(X) + 23.75$) より被検サンプル中のヨーネ菌DNA
濃度を計算する。

試験成立条件：

- ① 指示陽性 DNA の原液（濃度 1 pg / 2.5 μl）におけるスレッシュホールド・サイクル（Cycle of threshold; Ct）値が 24±3 サイクルであり、指示陽性 DNA の 1,000 倍希釈液（濃度 0.001 pg / 2.5 μl）において、2 穴中 1 穴以上陽性となる。
- ② ヨーネ菌 DNA 濃度と Ct 値との用量-反応式の相関係数（R）の二乗値（R²）は 0.9 以上であり、PCR 効率（Efficiency）は 80～120% である。

*PCR 効率（Efficiency）：リアルタイム PCR の効率は下記の計算式により算出する。

$$\text{PCR 効率 (\%)} = (10^{1/(\text{slope} - 1)} - 1) \times 100$$

Slope：検量線の傾き（X 軸を初期 DNA 濃度（log10）、Y 軸を Ct 値とした場合）

- ③ 指示陽性 DNA の融解曲線解析（一次微分）におけるピークは、各リアルタイム PCR 装置毎の所定の解離温度の範囲内に認める（解離温度：融解曲線解析におけるピークは温度上昇に伴う蛍光強度の減少を一次微分し、プラスマイナスを反転させたグラフであり、そのピーク位置を解離温度とする）。

表 2. 各リアルタイム PCR 装置における解離温度

メーカー名	機種名	解離温度
アプライドバイオシステムズ	ABI7300	87.0°C±1.5°C
	ABI7500	
	ABI7500Fast	
	ABI7900HT *	
	StepOnePlus	
	QuantStudio 3/5 *	
ロシュダイアグノスティック	LightCycler 480 II	88.0°C±1.5°C
	LightCycler 96 *	
	LightCycler Nano *	
パイオ・ラッドラボラトリーズ	iCycler	91.0°C±1.5°C
	Chromo4	87.0°C±1.5°C
	CFX96	86.5°C±1.5°C
アジレントテクノロジー	Mx3000p	88.8°C±1.5°C
タカラバイオ	DiceTP800	87.0°C±1.5°C

*：動衛研で解離温度を確認したリアルタイム PCR 機種

- ④ 陰性対照は、蛍光強度の上昇を認めない。もしくは認めた場合、融解曲線解析において指示陽性 DNA と同じ解離温度で蛍光値のピークを認めてはならない（蛍光強度の上昇：横軸にサイクル数、縦軸に蛍光強度をプロットしたグラフにおいては、蛍光増幅曲線の立ち上がりとして表示される）。

4) 判定

試験成立条件を全て満たし、かつ反応液の蛍光強度が上昇し、1 穴以上で融解曲線解析においてヨーネ菌指示陽性 DNA と同様な解離温度を示した検体をヨーネ菌 DNA 陽性、蛍光強度が上昇しなかった、あるいはヨーネ菌指示陽性 DNA と異なる解離温度を示した検体は DNA 陰性とする。陽性となった検体については、指示陽性 DNA を用いた用量-反応式から検体中のヨーネ菌 DNA 濃度が計算される。なお、DNA 濃度 0.001 pg / 2.5 μl 以上のとき、ヨーネ菌分離成績と高い一致率を示す。ヨーネ菌感染の有無の判定は、家畜伝染病予防法施行規則の別表 1 の判定基準（指示陽性調整液を用いた用量-反応式からヨーネ菌 DNA 濃度を計算し、検体調整液 0.025 cc 中の DNA 量が 0.001 pg 以上と判定された検体を陽性とし、それ以外の検体を陰性とする。）に従って行う。