

PCR 技術講座②

PCR 検査の臨床現場での応用

(有)豊浦獣医科クリニック・SMC (株) 大井宗孝

■はじめに

最近では養豚家向けの雑誌などでも、PCRという言葉をよく目にするようになりました。筆者らの所属する(中)日本養豚開業獣医師協会が麻布大学の協力を得て進めている養豚臨床センター(PCC)の中でも、PCR検査は病理組織検査と併せて疾病診断の中心をなしています。PCRの基礎については、本誌(JASV会誌4号)で麻布大学獣医学部・分子生物学研究室教授の村上賢先生に解説をお願いしましたので、詳細はそちらを参考にして頂くことにして、ここではわれわれ養豚現場の臨床獣医師が現在利用しているPCR検査と今後の応用について話を進めたいと思います。

PCRはポリメラーゼ・チェーン・リアクションの頭文字です。日本語ではDNAポリメラーゼ連鎖反応などと訳されています。DNAはデオキシリボ核酸という化学物質で、長い二重らせん構造をしていて、その中に新しい細胞を作るための4種類の塩基が並んでいます。この塩基三個の並び方に基づいて、いろいろなタンパク質が作り出されることになります。PCRは、このDNAのある特定の部分を短時間で効率的に大量に増やすことのできる技術で、細胞のDNAがコピーされるときには、DNAの二重らせんがほどけて、1本ずつになり、それぞれの鎖を鋳型にしてペアになるDNAが合成されます。

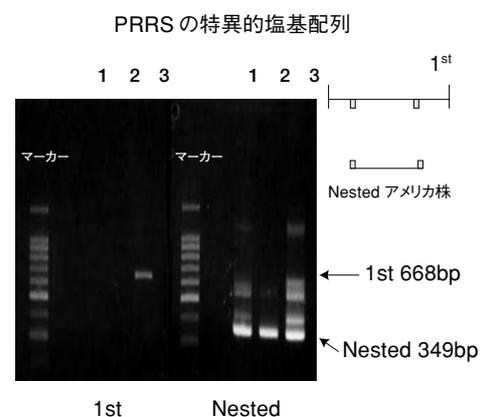
PCRは、このようなDNA複製の反応を人工的に繰り返し行う方法です。

■PCR検査の実際例

多くの養豚家が最も興味のあるPRRS(豚繁殖・呼吸障害症候群)について、筆者のLAB(エス・エム・シー(株))で行っているPCR検査を例に具体的に説明したいと思います。検体は、血清、精液、臓器などを用いますが、最近では精液によるPRRS伝播が問題となってきたことから、精液のPRRSウイルス検出の依頼が増えています。

PCRの手技は、まず増やしたいDNA試料(ここではPRRSが存在するかも知れない精液)に熱を加えて1本の鎖にします。次に、この試料の両端の塩基配列

写真1 PRRSのPCR検査(NestedPCR法)



写真提供：SMC(株)

にぴったりくっつく短いDNA断片（PRRSのプライマー）を結合させます。ここにDNAポリメラーゼという酵素を作用させると、プライマーを起点として試料のDNAを鋳型としたDNAが合成され、1本のDNAが2本になります。そして、再び熱を加えて同じ反応を繰り返せば、倍々に増えていきます。

もし精液中にPRRSのDNAが1分子あれば、理論的には20回の反応で、100万個（2の10乗）のPRRSのDNAに増える計算になります。自動化の進んだ現在のPCR装置では、1時間で数千万倍に増やすことができます。したがって、精液中のPRRSウイルスの有無がほぼ1日で判定できることになります（写真1 PRRSウイルスのバンド）。

表1は、A農場繫留雄豚のPRRSの抗体検査

表1 A農場 繫留雄豚検査結果

雄No	ELISA抗体	中和抗体	PCR
1	0.000	—	+
2	0.203	—	+
3	0.790	—	NT
4	0.184	+	—
5	0.768	+	—
6	0.905	+	—
7	0.118	—	—
8	0.220	—	—
9	1.627	+	—
10	0.118	+	—
11	0.556	—	—
12	0.154	—	+
13	0.456	+	—
14	0.180	—	—
15	0.523	—	—
16	0.154	—	—
17	0.125	—	—
18	0.140	—	—
19	0.722	—	—
20	0.218	—	NT
21	0.112	—	NT
22	0.290	—	+

(SMC未発表データ：2004)

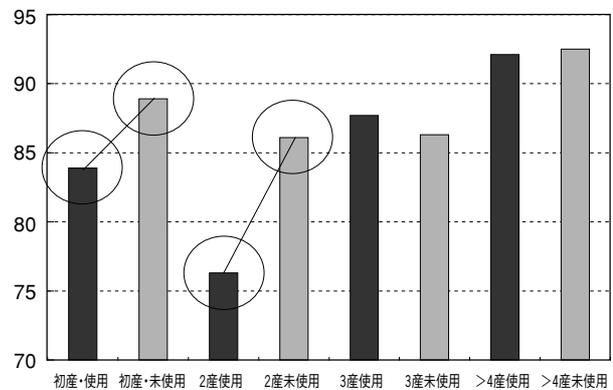
(ELISA抗体と中和抗体)とPCR検査の結果です。ELISA抗体と中和抗体が陰性の雄豚3頭は、PCRでは既に精液中にウイルスの存在が確認できます。当然ですが、このELISA陰性、PCR陽性の雄豚は後（3週間後）のELISA検査では当然陽性になっています。

多くのAIセンターでは、PRRS陰性の確認をPRRSのELISAによる抗体検査で行っています。AIセンターの定期的モニタリングでの抗体検査は、陰性状態の持続を確認する意味で重要です。しかし、感染後の抗体上昇より先にウイルスが精液や血中に出現してPRRSを伝播させる危険性を考えると、精液中のPRRSウイルスを検出できるPCR検査は、PRRS感染拡大を未然に防ぐ意味で大きな武器となります。

また、PRRSウイルスに汚染された精液は疾病の伝播だけでなく、受胎率にも悪影響を及ぼします。図1は、PRRS陽性農場でPRRS汚染精液とPRRS清浄精液を使用したケースでの受胎率の比較です。PRRS陽性農場にもかかわらず、PRRS汚染精液を使用した場合は明らかに分娩率が低下しており、その数字は産歴が低いほど悪い傾向がありました（SMC未発表データ、2004より）。

PRRSやその他伝染性疾病侵入防止のため、多くの農場で外部導入豚は一定の観察期間を設けて再度抗体検査を実施し、陰性を確認してから農場へ入れている

図1 PRRS汚染精液使用2農場の合計受胎率



(SMC未発表データ：2004)

図2 PRRSVおよびPCV2検査結果報告書

サンプルA

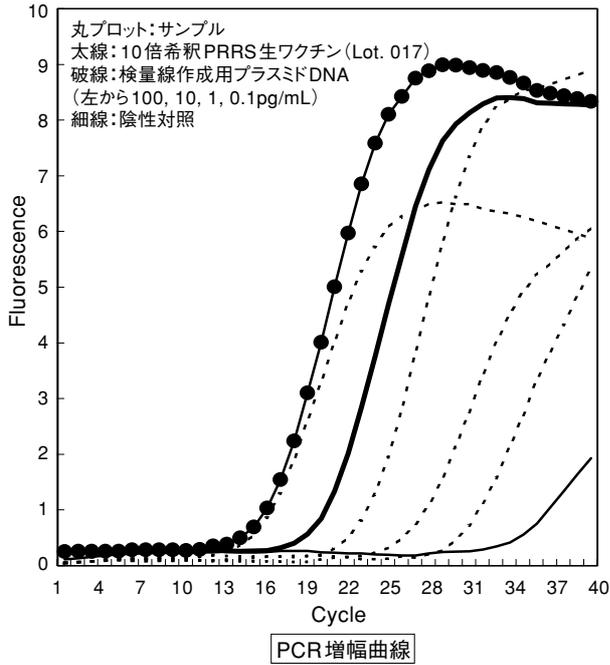
	プラスミドDNAに対する相対量	生ワクチンに対する相対量 (ワクチン原液を10,000とした値)
PRRSV	162.99 pg/mL	3020
PCV2	0.009 pg/mL*	—

*ウイルス量が少なかったため、正確な相対値の算出が不可能(数値は参考値)

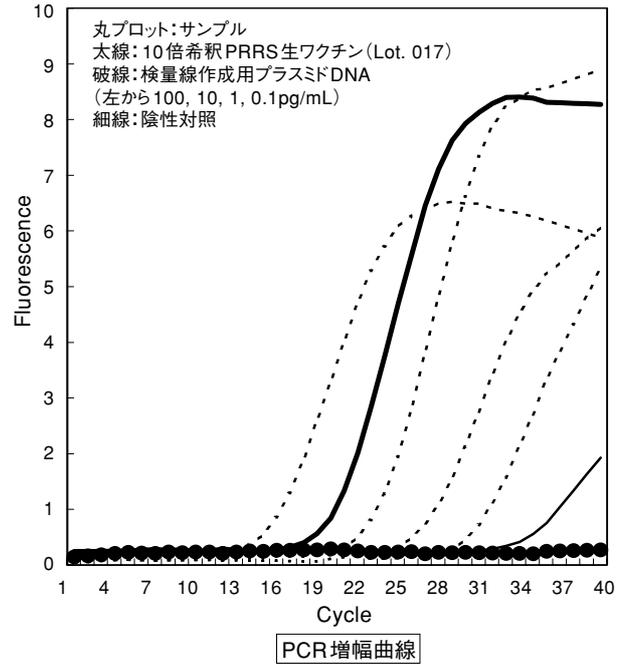
サンプルB

	プラスミドDNAに対する相対量	生ワクチンに対する相対量 (ワクチン原液を10,000とした値)
PRRSV	Not Detected	—
PCV2	2.02 pg/mL	—

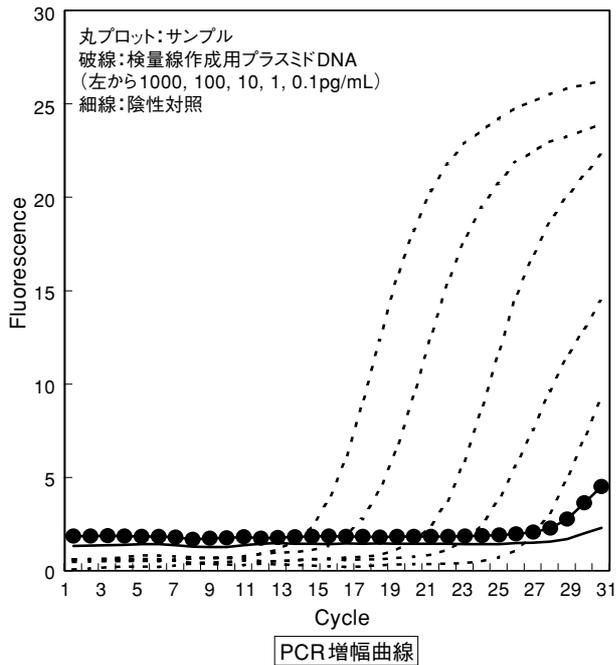
PRRSV



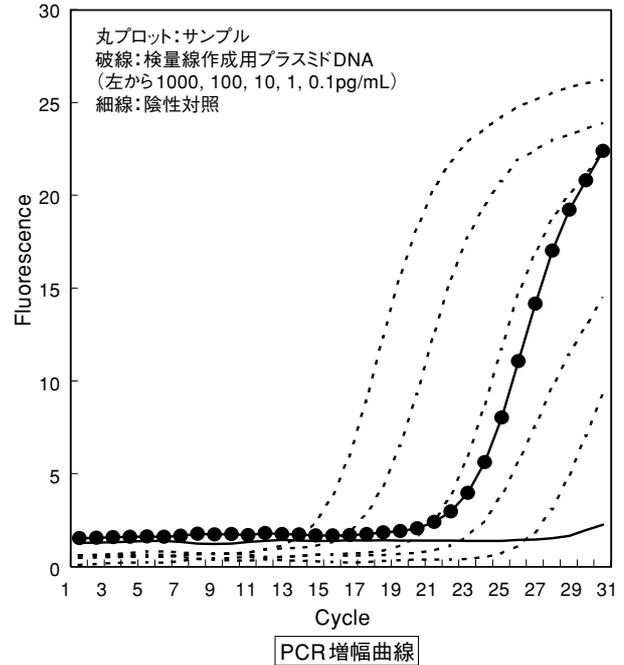
PRRSV



PCV2



PCV2



と思います。販売先のPRRS抗体陰性は確認していても、前述のように感染から抗体の検出までにはタイムラグが発生しますから、隔離観察はこのタイムラグによって発生する問題を防いでくれます。しかし、明確な隔離・観察施設を持たない農場では導入豚にウイルスが存在しないことを確認する意味で、導入時にPRRSのPCR検査を取り入れています。

現在PCR検査は、細菌病では増殖性腸炎（PPE）、大腸菌（浮腫病など）、パスツレラ症（DNTの有無）、胸膜肺炎（App）、サルモネラ症、豚赤痢などの診断、またウイルス病ではPRRS、PMWS（サーコウイルスⅡ型）、インフルエンザなどの呼吸器病やTGE（伝染性胃腸炎）・PED（豚流行性下痢症）などの消化器病の診断に広く応用されています。

■ PCR検査の今後

PCR検査の検査対象疾病は、今後も多くなっていくことが予想されますが、現行のPCR法は病原体のDNA（遺伝子）の有無を検査しています。したがって、その検体から病原体が検出されたとしても、必ずしもその病原体が疾病に関与していると断定することはできません。しかし、従来の病原体の有無だけをみるPCR検査から、その病原体の量を定量できる新たなリアルタイムPCR法という検査法が開発されました。

このリアルタイムPCR法を用いて検査をすると、PCRの増幅産物をエンドポイントで確認する従来の方法に比べて、病原体の正確な量を定量することができるので、複数の病原体が関与する最近の豚疾病の診断には威力を発揮します。もちろん確定診断は病理検査など更に精査することが必須ですが、この方法は病原体の量を比較できるので、有意に増量している病原体が関与しているのではないかと推測することができます。

図2のサンプルAとBはリアルタイムPCR法での検査結果です。子豚の血清を検査材料にPRRSウイルス（PRRSV）とサーコウイルスⅡ型（PCV2）を検査しました。Aサンプルの農場ではPRRSの抗体陽性豚が確認されており、離乳後子豚に腹壁がヘコヘコするなどの異常呼吸や衰弱豚が確認されています。畜主は衰

弱、削瘦して行くものの原因にPCV2によるPMWS（豚離乳後多臓器性発育不良症候群）も混在していると推測していました。しかし検査では、PRRSVが主体（左グラフ上段の丸プロットの線）でPCV2（左グラフ下段）はこの症例では関与していないことが推察できます。B農場（グラフ右の上段、下段）では反対にPRRSVは陰性でPCV2が検出されています。

このように、PCR検査は今後の豚疾病診断のための重要なツールとなるほか、農場防疫の面でも導入豚や精液の品質管理などにも利用範囲が広がることが予想されます。

近年のAI普及と共に流通する精液量も増え、精液による疾病侵入の話聞く機会が増えています。この流通精液による疾病の伝播を防ぐには精液から伝播する可能性がある疾病の検査は必須となります。現行の豚精液の保存期間を考えると採取してから短時間での結果が必要となりますが、PCRによる検査を利用すれば、迅速に結果を出すことができます。

（中）日本養豚開業獣医師協会では、今後、このPCR検査を含めた疾病診断を麻布大学PCCの協力を得て強力に推し進めます。このことが養豚現場の問題解決の一助になってくれると確信しています。