

リアルタイム PCR による *Neospora caninum* の検出

東部家畜保健衛生所

矢野 敦史

1. はじめに

ネオスポラ症は流産胎子を検査に用いる。病変の好発部位として大脳、心臓などが知られているが、組織損傷が強い場合が多く、病理検査が困難な場合がある。また病変が乏しい症例も多く、病理検査だけでは検出できていない場合もあり、胎子臓器の PCR 検査、母牛の抗体検査を実施し、補助診断を行っている。しかし本年、ネオスポラ症を疑う事例であっても、従来の PCR 検査では検出できない事例に遭遇したこと、また抗体検査用診断薬の販売中止が決定し、PCR 検査の補助診断としての重要性が増したことから、新たな方法であるリアルタイム PCR による *Neospora caninum* の検出を試みたので報告する。

2. 試験 1

<材料および方法>

214 日齢で流産した胎子の大脳で、病理検査、免疫染色、Nested-PCR 検査が全て陽性であったものを用いた。大脳から DNA を抽出し DW で 10 倍段階希釈した。

Nested-PCR は、Timothy らが報告のファーストプライマー Np7、Np4 とセカンドプライマー Np7、Np6 を用いた。酵素は SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用した。

リアルタイム PCR は、2 通りの方法で実施した。A は 2002 年に Esther らが報告したプライマーを、B は Nested-PCR のファーストプライマーである Np7 と Np4 の組を用いた。酵素は SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) を使用した。いずれも *Neospora caninum* の特異遺伝子である Nc5 を検出するプライマーである。

全ての PCR 産物について、2~3%アガロースゲルによる電気泳動を実施した。

<成績>

Nested-PCR ではファースト、セカンド PCR とも 10^{-1} まで検出された (写真 1)。リアルタイム PCR では A、B 共に 10^{-2} まで検出され、同等の感度を示した (写真 2)。B はリアルタイム PCR に設計されたプライマーではないが、A と同等の感度を示す良好な結果が得られたため、A、B を用いて野外材料について試験 2、3 を実施した。

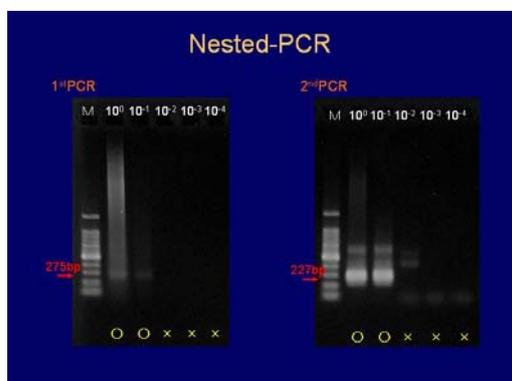


写真 1

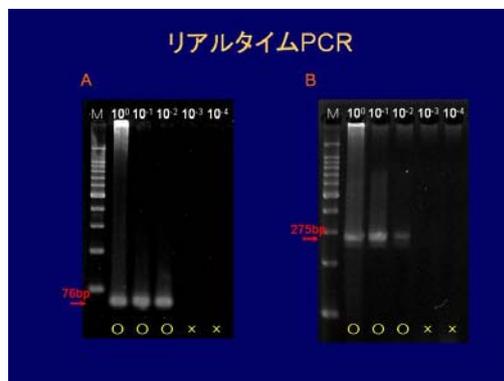


写真 2

3. 試験 2

<材料および方法>

2005～2009年にネオスポラ症、またはその関与が疑われると診断された14症例について、大脳、心臓などの凍結材料からスピнкаラム方式 (QIAGEN) により DNA を抽出した。リアルタイム PCR は試験 1 と同様の方法で実施し、確認のため電気泳動を行った。

<成績>

表 1 の A、B の部分がリアルタイム PCR の結果を示した。陽性の判断は、1 症例について大脳、心臓等の諸臓器を検査しているため、1 臓器でも陽性であったものを陽性とした。参考のため胎子の胎齢、病理検査、免疫染色の結果、母牛の抗体検査の結果も併記した。A では 14 症例中 13 症例、B では 14 症例中 7 症例から検出され、陽性率は A が 92%、B が 50%であった。病理検査が陽性であった 3 症例では、A で 3 症例全てから、B では 1 症例から検出され、これらの母牛の抗体は全て陽性であった。病理検査が不可能であった 5 症例 (表中の NH) については、A で 5 症例全てから、B でも 2 症例から検出され、陽性率は A で 100%、B で 40%であった。胎齢については、ネオスポラ症の好発齢である 90～210 日齢か、それ以上の様々な胎齢から検出された。

臓器別の検出結果は、A では大脳、心臓、腎臓等の陽性率は 50%以上、B では骨格筋が 63%と高く、大脳の陽性率は低値であった (表 2)。

依頼年月日	胎齢	A	B	病理検査 (HC)	抗体検査 (母牛)	
2005.7.15	150	+	-	-	NT	
2007.9.21	176	+	+	NH	+	
2007.12.26	264	+	-	NH	NT	
2008.3.5	260	+	-	+	(-)	+
2009.1.29	197	+	+	+	(+)	+
2009.2.10	210	+	-	+	(-)	+
2009.2.28	117	+	+	-	-	+
2009.6.15	250	-	-	-	-	+
2009.6.24	106	+	+	-	-	+
2009.7.6	183	+	-	NH	+	
2009.7.27	238	+	-	NH	+	
2009.9.3	185	+	+	-	-	+
2009.9.7	160	+	+	-	-	+
2009.10.21	120	+	+	NH	NT	

NH:病理検査不能

表 1

臓器	A		B	
大脳	7 / 13	(54%)	2 / 13	(15%)
脊髄	2 / 4	(50%)	0 / 4	(0%)
心臓	7 / 13	(54%)	5 / 13	(38%)
骨格筋	4 / 8	(50%)	5 / 8	(63%)
舌	4 / 12	(33%)	3 / 12	(25%)
腎臓	7 / 12	(58%)	3 / 12	(25%)

表 2

4. 試験 3

<材料および方法>

1998～2009年にネオスポラ症またはその関与が疑われ、凍結保存材料がなかった 8 症例について、大脳等のパラフィン標本からスピнкаラム方式で DNA を抽出した。リアルタイム PCR は試験 1 と同様の方法で実施し、確認のため電気泳動を行った。

<成績>

表 3 の A、B の部分がリアルタイム PCR の結果を示した。陽性の判断は、1 症例について大脳等の諸臓器を検査しているため、1 臓器でも陽性であったものを陽性とした。参考のため胎子の胎齢、病理検査、免疫染色の結果、母牛の抗体検査の結果も併記した。A では 8 症例中 7 症例、B では 2 症例から検出され、

陽性率は A が 88%、B が 25% であった。病理検査が陽性であった 5 症例において、A では 5 症例全てから、B では 1 症例から検出され、これらの母牛の抗体は全て陽性であった。また胎齢が 40、60 日である早期流産の胎子 2 検体について、A で 2 検体、B で 1 検体から検出できた。

臓器別の検出結果は、A で大脳、心臓の陽性率が高く、B では臓器別で大差はなかった (表 4)。

依頼年月日	胎齢	A	B	病理検査 (IHC)	抗体検査 (母牛)
1998. 4. 14	不明	+	-	+	+
2002. 8. 20	177	+	-	+	+
2003. 2. 17	214	+	-	+	+
2004. 7. 9	40	+	-	-	+
2005. 2. 22	60	+	+	-	+
2008. 3. 5	260	+	-	+	+
2009. 1. 29	197	+	+	+	+
2009. 6. 29	60	-	-	-	+

表 3

臓器	A	B
大脳	5 / 6 (83%)	2 / 6 (33%)
脊髄	1 / 4 (25%)	1 / 4 (25%)
心臓	1 / 1 (100%)	1 / 1 (25%)
腎臓	0 / 2 (0%)	1 / 2 (25%)

表 4

5. まとめと考察

試験 1 において、リアルタイム PCR は Nested-PCR より検出感度が高く、リアルタイム PCR の A、B の 2 通りの方法の検出感度は同等であることから、リアルタイム PCR は従来の Nested-PCR より簡便かつ有用と思われた。試験 2、3 において、凍結材料の陽性率は A が 93%、B が 50%、病理検査が不可能であった材料の陽性率、A が 100%、B が 40%、パラフィン標本の陽性率は A が 88%、B が 25% であった。このことから、試験 1 では A、B と同等の検出感度であったが、野外材料の試験には A が適していることがわかった。また A では凍結材料以外にも陽性率が高いことから、保存条件が違ってもその影響を受けず、検出が可能であることが示された。特にパラフィン標本では短い領域を増幅する A が適当と思われた。試験 2 において、A では大脳以外でも陽性率が高く、B では骨格筋の陽性率が高く、大脳では低値であった。播谷らの報告の通り、大脳以外の臓器でも陽性率が高いことが示され、大脳以外の臓器についても検査を実施する重要性が再確認された。試験 3 では 60 日齢以下の胎子からも検出されたことから、これまであまり実施されていない早期流産胎子についてもネオスポラ症に関する検査を実施する必要性が示唆された。

<参考文献>

- 1.) Timothy V. BASZLER, et al : Journal of Clinical Microbiology, Dec, 4059-4064 (1999)
- 2.) 竹田博ら : 北海道業績発表会 (2002)
- 3.) Esther Collantes-Fernandez, et al : Journal of Clinical Microbiology, Apr, 1194-1198 (2002)
- 4.) Norbert Muller, et al : Journal of Clinical Microbiology, Jan, 252-255 (2002)