

リアルタイム PCR による糞便からの サルモネラ属菌 H 抗原短時間血清型別法の構築

(国研) 農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究部門動物感染症研究領域細菌グループ・研究員 中山 ももこ

■ 目的

家畜のサルモネラ症の鑑別診断においては鞭毛(H)抗原の血清型別が必須だが、2種の抗原相を型別する必要があり、家畜糞便等のサンプルからの増菌・分離培養と併せて時間と労力がかかることが課題だった。

過去に当研究室は、*Salmonella enterica* serovar (*S.*) Typhimurium の実験株に対し、菌集団中の H 抗原の遺伝子数を短時間かつ定量的に評価できるリアルタイム PCR 系(ST-H-realtime-PCR)を確立した。本手法と糞便からの菌 DNA 抽出系を組み合わせ、増菌・分離培養を省き家畜糞便から直接血清型別できる画期的な検査手法の構築に発展できると考えた。そこで本研究では、新規の H 抗原血清型別法の開発と実用化に向け、様々な *S. Typhimurium* 野外分離株に対する ST-H-realtime-PCR の有用性を検証し、ST-H-realtime-PCR を基盤とした家畜糞便から直接 H 抗原を検査できる手法を構築することを目的とした。

■ 方 法

はじめに、様々な *S. Typhimurium* 野外分離株に対する ST-H-realtime-PCR の有用性を検証するために *S. Typhimurium* 野外分離株 3 株 (L-2386, L-2988, L-2993) を用いて H 抗原凝集反応試験と ST-H-realtime-PCR を実施し、両実験結果を比較した。次に、ST-H-realtime-PCR を糞便由来サンプルに最適化するために、*S. Typhimurium* 実験株 (χ 3306 株) をスパイクしたマウス糞便及び感染マウス由来糞便を用いて、糞便からの菌 DNA 抽出系及び ST-H-realtime-PCR の条件を検討した。最後に、家畜糞便から直接 *S. Typhimurium* の H 抗原を検査できる手法の構築を目指して、 χ 3306 株をスパイクしたウシ糞便を用いて、マウス糞便で確立した条件で糞便からの菌 DNA 抽出及び ST-H-realtime-PCR を実施した。

■ 結果および考察

ST-H-realtime-PCR は、様々な *S. Typhimurium* 野外分離株に利用できることが示された。また、マウス糞便で確立された糞便からの菌 DNA 抽出法及び ST-H-realtime-PCR の反応条件はウシ糞便にも応用できた。本手法は、糞便に含まれる菌あるいは宿主細胞より網羅的に DNA を抽出するため、宿主種の違いが ST-H-realtime-PCR の反応性に影響を与える懸念があった。しかし、マウス糞便及びウシ糞便で得られた結果の間に差異は無く、本手法の宿主汎用性が高いことが示唆された。今後、豚あるいは鶏等、他の家畜種由来の糞便についても応用可能か検討する余地がある。

■ 結 語

Salmonella 属菌集団中の H 抗原の血清型別及び発現状態の解析は、従来、凝集反応試験により行われてきたが、時間と労力がかかることが課題となっていた。本研究では、*S. Typhimurium* 実験株のみならず野外分離株においても、ST-H-realtime-PCR を用いることで菌集団中の H 抗原の発現状態を解析できることを明らかにした。また、マウス及びウシ由来糞便に対して、糞便中の菌集団における H 抗原の発現状態を直接解析できる系を確立した。本研究で確立された方法は、凝集反応試験に比べて短時間かつ定量的に解析できるという利点があり、家畜糞便から直接血清型別ができる画期的な新規の H 抗原血清型別法の開発と実用化に貢献できる。