

【目的】今年度よりヨーネ病の確定検査試薬がヨーネ・ファインドプロ（FP）となったが、ヨーネ菌遺伝子陰性の成立条件としてインターナルコントロール（IC）が検出されなければ判定不能となる。しかし、今回IC不検出となる事例が発生したため、IC不検出となった場合の検体処理方法について比較検討した。また、陰性判定にも関わらず陽性判定された検体よりも高い最終蛍光強度（EPF）を示す検体があったため、試験結果解析時の最低最終蛍光強度（MinimalEPF）についても検討した。

【材料と方法】ヨーネ病患者畜から採材した直腸便、乳房上リンパ節（LN）、回盲LN、回腸LN、空腸LN、空腸、回盲部より上位1m部（1m）、回盲部より上位10cm部を用いてDNAを抽出した。各検体につき抽出DNA原液、Tris-EDTA（TE）で2倍希釈したDNA（TE2）、TEで5倍希釈したDNA（TE5）、DNA精製キットNucleoSpin Inhibitor Removal（Takara bio USA）を用いた精製DNAの計32検体についてFPを用いた検査を実施した。PCR及び解析はLightCycler96（Roshe）を使用した。PCR終了後の解析は、自動解析又はMinimalEPFの手動設定で行った。

【結果】自動解析では、抽出DNA原液の6/8検体（直腸便、乳房上LN、回腸LN、空腸LN、空腸及び1m）、TE2の2/8検体（直腸便及び乳房上LN）で判定不能となった（表1）。TE5及び精製DNAではすべて試験成立となった。

表1 自動解析結果

陽性判定されたウェルのうち最も低いEPFは0.19で、陰性判定されたウェルのうちEPFが0.19を超えていたウェルは3ウェルであった（表2）。MinimalEPFを0.1に設定後、新たに8ウェルが陽性判定となり、抽出DNA原液で5/8検体、TE2で7/8検体試験成立となった（表3）。

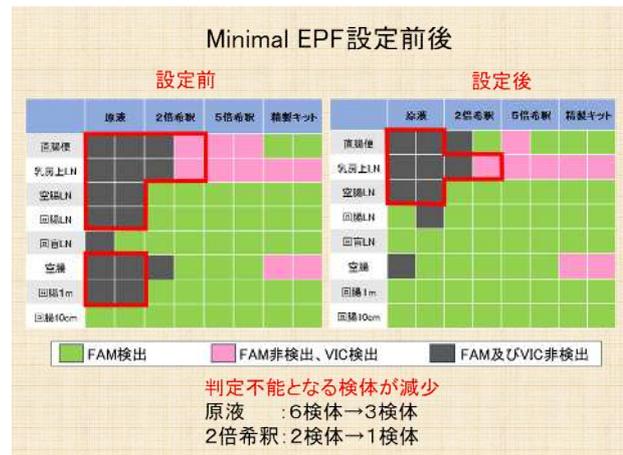
	結果			
	原液	2倍希釈	5倍希釈	精製キット
直腸便	不成立	不成立	FAM非検出、VIC検出	FAM検出
乳房上LN	不成立	不成立	FAM非検出、VIC検出	FAM検出
空腸LN	FAM検出	FAM検出	FAM検出	FAM検出
回腸LN	FAM検出	FAM検出	FAM検出	FAM検出
回盲LN	FAM検出	FAM検出	FAM検出	FAM検出
空腸	不成立	不成立	FAM検出	FAM非検出、VIC検出
回腸1m	不成立	FAM検出	FAM検出	FAM検出
回腸10cm	FAM検出	FAM検出	FAM検出	FAM検出

■ FAM検出
 ■ FAM非検出、VIC検出
 ■ FAM及びVIC非検出

表2 各ウエルのEPF

	原液		2倍希釈		5倍希釈		精製キット	
直腸便	0.04	0.08	0.01	0.17	0.01	0.18	0.22	0.22
乳房上LN	0	0.01	0.01	0	0.01	0	0.01	0
空腸LN	0	0.07	0.19	0.37	0.22	0.28	0.51	0.44
回腸LN	0.31	0.34	0.56	0.72	0.83	0.89	0.86	0.85
回盲LN	0.21	0.26	0.42	0.55	0.58	0.67	0.65	0.67
空腸	0.09	0.1	0.16	0.3	0.32	0.33	0.04	0.01
回腸1m	0.17	0.21	0.37	0.51	0.6	0.63	0.67	0.69
回腸10cm	0.23	0.27	0.42	0.54	0.57	0.57	0.52	0.56

表3 設定後の結果



【考察】ICが不検出となった検体では希釈又は精製することにより成立条件を満たすことができた。そのため、本事例でのIC不成立の原因はPCR 阻害物質の影響と推察された。2倍希釈では試験不成立となる検体があるうえ、1サイクル毎の増幅効率が低かった。そのため、ICが不検出となった検体は5倍以上の希釈または精製キットを使用すべきと考えられた。精製キットによる精製後でも検体中のDNA量は半分以上維持されるため、陽性となるサイクル数の差は1サイクル以内に収まると考えられた。また、阻害物質が多い検体では増幅効率が低下するため、ある程度の蛍光強度の上昇が認められても自動判定では陰性判定される恐れがあり、その場合はMinimalEPFの手動設定を行う必要がある。陰性コントロールでもEPFは0.05を超える場合があるため、MinimalEPFの手動設定値は0.1が適切と考えられた。ヨーネ病確定検査時には採材から検査結果判明まで当該牛の乳の出荷ができないため、再検査による検査時間の延長は農家の損失となる。阻害物質により検査不成立となる場合も考慮し、確定検査を実施する場合には予め抽出DNAの精製を行うか、不成立時の取り決めをしておく必要があると考えられた。