

病性鑑定において PCR を利用する際の注意事項

家畜衛生分野においても疾病診断・検査に PCR 技術が応用可能となり、本病性鑑定指針の改訂においても各診断指針の各論において PCR 検査の利用について参考資料が組み込まれている。PCR は便利な技術だが、疾病の診断に応用する場合、その取扱いについては慎重にせねばならない点が多い。そこで本項では、PCR 検査の原理に次いでその利点、欠点と限界、留意点を理解するための解説をまとめ、最後に参考として病性鑑定において利用が想定される PCR の応用例を示した。

(1) PCR の原理

遺伝子の本体は核酸である。核酸には DNA と RNA があり、細菌を含むほとんどの生物の遺伝形質は DNA によって規定されているが、一部のウイルス(RNA ウイルス)では RNA によって規定されている。PCR とは、DNA ポリメラーゼの働きでヌクレオチドを重合させる DNA 鎖伸長反応を繰り返し行い、その結果検査材料中の特定の DNA 断片だけを大量に増幅する技術である。DNA ポリメラーゼとは、1本鎖 DNA を鋳型(テンプレート)としてそれに相補的な DNA 鎖を合成する酵素であり、PCR には耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いる。DNA の合成には、鋳型に相補的な数塩基から数十塩基のプライマーと呼ばれる短い DNA 鎖を必要とし、そのプライマーをきっかけに DNA 鎖が 5' 末端から 3' 末端へ一方向性に伸長する。したがって、目的の DNA 領域を増幅する場合、その領域を挟む位置で、2 本鎖 DNA のそれぞれに相補的かつ特異的なプライマーのペアを合成し、これらを検査材料中の DNA に対して過剰量添加した状態で、DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖の伸長反応を繰り返し行う。その結果、片方のプライマーから伸長した DNA 鎖が、次のサイクルでは新たにテンプレートとなって、もう一方のプライマーが相補的に結合し次の鎖を前のプライマー部分まで伸長する。このように反応を繰り返せば、2 つのプライマーに挟まれた部分だけが増幅される。この反応は、① 2 本鎖 DNA の 1 本鎖 DNA への高温での熱変性(denature)、② 検査材料中の標的 DNA への適切な温度でのプライマーの対合(annealing)、③ DNA ポリメラーゼの至適温度による伸長反応(extension)の 3 ステップの温度制御を繰り返して行う(②と③を同じ温度とする 2 ステップの温度制御を行う場合もある)。その温度制御はプログラムした専用機器の使用で自動的に行うことができる。PCR は DNA 依存性 DNA ポリメラーゼによ

るため、RNA ウイルス遺伝子や mRNA などの RNA を検出する場合には予め逆転写酵素 (RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ) により DNA に置換する逆転写反応を行う必要がある。これを Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) という。

PCR 法によれば、検査材料中のわずかな核酸も増幅することができるため、そこにある程度の病原体核酸が存在すれば、その病原体を培養することなく検出することも可能な場合がある。PCR 法で標的とした核酸断片が正しく増幅されているかを確認するためには、一般的に電気泳動で増幅産物が理論通りの大きさに泳動されるかによって行うが、時には後述するようにさらに精密な解析を実施して、その特異性を確認する必要がある。

(2) PCR の利点

- ① 少量の標的核酸を短時間に増幅できる。
- ② 調べようとする病原体は異なっても、検査方法は基本的に同じである。
- ③ 病原体は死滅していても標的核酸が保存されていれば増幅できるため、材料の保存が容易であり、さらに、危険な病原体でも不活化した後に検査することができる。
- ④ Nested PCR (後述) などを利用すれば十分に感度を上げることができる。
- ⑤ 標的核酸の定量が可能な手技もある。

(3) PCR の欠点と限界

- ① PCR は少量の検査材料で行うことができるが、臓器、組織など生体材料を検査に用いる場合、採材部位や材料の前処理によって検出率が異なり、陰性であっても生体全体に対して病原体の存在を否定できない。
- ② 増幅には限界がある。理論上は通常 Conventional PCR (後述) で 25 または 30 サイクルで理想的に反応が起きた場合、それぞれ 2^{25} (約 $10^{7.5}$) または 2^{30} (10^9) 倍に増幅されるが、実際にはその途中で反応阻害物の生成などにより反応効率が低下するため増幅には限界があり、核酸が検出可能な量にまで増幅できない場合には陰性となる。増幅した核酸を電気泳動などで検出する場合、一般的には被検材料中に 10 個から 100 個以上の標的核酸 (DNA) が存在しないと再現性良く検出できない。したがって、PCR の結果が陰性であったとしても、病原体の存在を否定できない。

- ③ 血液・糞便など生体材料を検査に用いる場合、検査材料中の阻害物質の影響を受けることがある。したがって、予めそれらの阻害物質を除く精製作業が必要なことがあるが、それでも完全ではない。また、検査材料の保存状態や凍結融解の回数、核酸精製の方法・条件などは PCR の効率および結果に大きな影響を与えることがあるため、予備的な検討を行うことが望ましい。
- ④ 病原体は活性を失っていても、標的となる核酸が存在すれば反応は陽性となるため、病原体の生死を判別できない。
- ⑤ 陽性対照からの汚染、あるいは以前の検査や実験など検査中の汚染による誤った陽性の危険性がある。また、検査材料由来ばかりでなく、緩衝液やポリメラーゼ等に至るまで使用する試薬への核酸の混入が誤った陽性を招く危険性がある。特に、PCR 産物には高濃度の核酸が含まれており、その試薬類への混入は容易に偽陽性を引き起こし得るため、検査後の PCR 産物の取扱いには注意が必要である。
- ⑥ 病原体が同定される以前の陽性反応では、たとえ予想される長さの断片が増幅されても塩基配列を確認するまでは病原体の証明にならない。
- ⑦ Conventional PCR では定量ができないため、ウイルスや細菌などで一過性の存在や保菌をその病態の病原因子と見誤ることが危惧される。PCR は他の検査法と比較して、抗体価や臨床像との相関が低いことも多いので注意が必要である。
- ⑧ プライマーの品質は重要である。信頼のおける製品を用いるとともに、ロットを変更する際には予備的な検討を行うことが望ましい。

(4) PCR の利用にあたっての留意点

最も重要なことは、PCR の成績だけで病原体を同定することは不可能であること、技術的限界から陰性の証明はできないことである。PCR の利点および欠点をもとに、その利用に対して適用除外または注意を要する用法と適用が許容される用法について参考例を示した。

① 適用除外または注意を要する用法例

- ・病原体が微量にしか含まれない試料に対する病原体の陰性証明
- ・環境中に同種の微生物が含まれる状態での病原体検出
- ・病原体が同定される以前あるいは病原体が分離できない場合において PCR のみで陽性証明すること

② 適用が許容される用法例

- ・PCRにより増幅した核酸断片の塩基配列を確認後、初動防疫に生かす。
- ・地域や農場における病原体汚染度を調べるためのサーベイランス。ただし病原体によっては培養法に比べて感度が低いことがある。
- ・他の微生物学的検査成績の補助的手段として病原体の同定に利用する。
- ・純培養された病原体の型別（同定は、他の方法と組み合わせて行うべきである。）
- ・検出感度が十分検定されたPCR法を用いた定量

(5) PCRの種類または応用法

PCR検査には、目的に応じて様々な手技や反応方法が考案されている。その中でも、疾病の検査に応用されることが想定される基本的な反応方法について示す。

① Conventional PCR（通常のPCR）

目的の標的核酸(DNA)断片を増幅するために、1組のプライマーを用いて、反応を25～35サイクル繰り返す通常のPCR。

② Nested PCR

1回のPCRでは十分な検出感度が得られない場合、増幅したPCR産物を次の反応のテンプレートにして、その内側に設計した別のプライマーペアを用いて、さらにもう一度PCRを繰り返すと非常に高い増幅効率および高い特異性が得られる。一方で、汚染による誤った陽性の危険性も高まる。最初のPCR反応に対して入れ子になるようにPCRを行うので、Nested PCRと言う。

③ Multiplex PCR

複数の標的核酸(DNA)のそれぞれに対する特異的プライマーを混合した状態で、それぞれのPCR反応を1本の反応チューブ内で同時に行う。その結果、大腸菌のように複数の病原遺伝子を保有する病原体や、肺炎などのように複数の病原体が想定される検体に対して、1本のチューブで反応を行い、1レーンの電気泳動で検出できる。これに対して、1対のプライマーだけを用いる通常のConventional PCRをMonoplex PCRとも言う。

④ PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

PCR産物の制限酵素切断パターンを電気泳動で比較する方法。同種の病原

体において、特定の核酸を標的とした PCR を行い、その増幅断片の制限酵素切断パターンの違いで、血清型や生物型などの型別を行うことに利用される。

⑤ Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

「(1) PCRの原理」で解説したように、PCRの最初のステップで逆転写酵素を用い、RNAをcDNAにした後、通常のPCR反応を行う方法。RNAの存在を検出できる。RNAウイルスゲノム中の遺伝子を検出することや、mRNAの検出による遺伝子の発現を調べることに利用される。省略名称が後述のReal-Time PCRと混同されやすいため、略称を用いる時には初めに必ず正式名を示す。

⑥ Real-Time PCR

PCRによって増幅したDNA断片を、種々の方法によって発光させて、それを専用の光学機器で検出する方法。高い感度と定量が可能なのが利点である。安易にRT PCRと略称するとReverse Transcription-PCRと混同されることに注意。増幅したDNA断片の発光には、SYBR Green法に代表されるインターカレーターを用いる手法や、TaqMan法に代表される増幅DNA特異的プローブを用いる手法などが一般的に用いられる。前者の場合は増幅終了後に融解曲線解析を行い、増幅の特異性を担保する必要がある。また、Real-Time PCRにより定量を行う場合は標準DNAの階段希釈液などを用いた検量線を作成し、定量性を保証し得るような条件で増幅が行われていることを確認する必要がある。

⑦ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

AFLPHA (Amplified Fragment Length Polymorphism Hazy Association)、AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)、DNA Amplification fingerprinting 等とも呼ばれる。比較的特異性の低いプライマー(多くの場合、プライマーは1対でなくて1本を用いる)、あるいはゲノム中の繰り返し配列に対するプライマーを用いてPCRを行い、増幅された色々な長さのDNA断片のパターンによって、病原体の株間の相違などを検査する。特異性が低い条件での増幅なため、再現性に乏しい欠点がある。

⑧ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

標的核酸(DNA)を含むゲノムDNA等を1または2種類の制限酵素で切断した後、その切断末端に相補的に連結できるような短い2本鎖DNA(アダプター)を結合させる。そして、そのアダプター配列に相補的なプライマーを用いてPCRを行

う。その結果、様々な長さのDNA断片が増幅される。断片の増幅パターンによって病原体株間の相違を比較する分子疫学的解析に利用される。RAPDの再現性の低さを解消した方法で、PCR自体はアダプター配列に対して行われることから反応の特異性が保たれる。

⑨ Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法、Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids (ICAN)法

従来のPCR法とは異なった概念の遺伝子増幅法で、温度サイクルによらず一定の温度でアニーリングと伸長反応が繰り返し行われるようにしたもの。温度制御に通常のPCR用機器を必要とせず、結果の判定も反応液の混濁状態から肉眼で判定することもできる。

⑩ in situ PCR

組織切片上でPCRを行い、増幅したDNA断片を蛍光標識するなどして可視化し、組織上の細胞あるいは細胞内のどの部位に標的核酸が存在するかを検査する方法。

⑪ NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)

逆転写酵素およびT7と呼ばれるバクテリオファージのプロモーター配列とそれに特異的なRNAポリメラーゼを利用したRNA増幅法。T7プロモーター配列を含むプライマーで標的RNAから逆転写酵素により2本鎖cDNAを合成する。これに対してT7RNAポリメラーゼで、標的RNAを大量に複製する。このRNAから再びcDNAを合成し、さらにcDNAから標的RNAを複製する反応を繰り返して標的RNAを大量に増幅する。増幅したRNAは蛍光プローブや核酸クロマトグラフィーにより検出する。感度、特異性は高いが、操作が煩雑。