

成績概要書 (2004 年 1 月作成)

研究課題：LAMP 法による牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出法の開発

(遺伝子増幅法による牛ヨーネ病迅速診断技術の確立)

担当部署：畜試 畜産工学部 遺伝子工学科、感染予防科

協力分担：(独)動物衛生研究所、栄研化学株式会社

予算区分：道費

研究期間：2001～2003 年度 (平成 13 年～15 年度)

1. 目的

牛ヨーネ病は、ヨーネ菌による下痢を特徴とする法定伝染病である。本病に対する有効な治療はなく、唯一の対策は、感染牛を早期に発見して淘汰することである。現在、診断は主に糞便培養法と ELISA が用いられているが、判定に長期間を要することや排菌数の少ない牛では陽性率が低いなどの欠点があり、迅速で高感度な診断法の開発が求められている。そこで、本病を早期に発見するために、LAMP 法を用いて、牛糞便からヨーネ菌遺伝子を検出する方法を開発する。

2. 方法

1) LAMP 法によるヨーネ菌遺伝子検出法の開発

ヨーネ菌に対する特異的な LAMP 用プライマーを作製して、検出効率の高い反応条件の検討を行った。

2) 牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出法の検討

牛糞便からの核酸調製法および DNA 増幅反応阻害物質の抑制法について検討し、牛糞便からの LAMP 法を用いたヨーネ菌遺伝子検出法の開発を行った。

3. 成果の概要

1) - (1) ヨーネ菌特異的配列 IS900、hspX および F57 を増幅する LAMP 用プライマーを合計 173 セット作製した中から、良好な反応を示すプライマーセット Primer1 および Primer2 を選択した。

1) - (2) それぞれのプライマーセットを用いて LAMP 法における反応の条件およびヨーネ菌の検出感度を検討したところ、Primer1 は 90 分以内にヨーネ菌 DNA1pg まで検出し、Primer2 は 120 分以内に 5pg まで検出した。

1) - (3) 9 菌種 42 株のヨーネ菌類似菌を用いて特異性を検討したところ、Primer1 は類似菌 1 種 2 株で反応がみられた。Primer2 は全ての菌株で反応がみられなかったが、その後報告された類似菌 *M.cookii* str2333 において反応がみられた。

1) - (4) Primer2 を改変して作製した Primer3 は、供試した全ての類似菌で反応がみられず、検出感度が反応時間 90 分間でヨーネ菌 DNA0.01pg と高かった(図 1)ことから、ヨーネ菌遺伝子検出に適している LAMP 用プライマーと考えられ、以下の検討に用いた。

2) - (1) ノンフェノールビーズ法と熱抽出法を比較したところ、熱抽出法と比べて、ノンフェノールビーズ法の核酸抽出効率が高かった。

2) - (2) 反応阻害物質の作用を抑制する Ampdirect[®] 添加の有無による検出率の違いを検討したところ、添加していない反応液は糞便培養法陽性 7 試料のうち 5 試料検出したのに対して、添加した反応液は全て検出した(表 1)。

2) - (3) 培養したヨーネ菌を添加した牛糞便希釈液からヨーネ菌 DNA が 5cfu/ml まで検出できた(図 2)。

2) - (4) 牛糞便 166 試料中、糞便培養法陽性 9 試料について LAMP 法は全て検出し、nested PCR 法は 4 試料を検出した。培養法陰性 157 試料については、LAMP 法は 26 試料、nested PCR 法は 8 試料を検出した(表 2)。

以上のとおり、ヨーネ菌に特異的な LAMP 用プライマーを作製し、LAMP 法による牛糞便からのヨーネ菌遺伝子検出の基礎的条件を確立した。

表 1 Ampdirect^R添加の有無による
検出率の相違 (検出数 / 反応回数)

試料	コロニー数	Ampdirect ^R 添加	無添加 (標準液)
A	1	2/8	1/8
B	1	2/8	0/8
C	2	6/8	0/8
D	2	8/8	4/8
E	3	2/8	1/8
F	4	6/8	5/8
G	14	7/8	6/8
H	0	0/8	0/8

表 2 LAMP 法、糞便培養法
および nestedPCR 法の比較

糞便培養法	LAMP 法 (検出数)	nestedPCR 法 (検出数)
陽性(9)	9	4
陰性(157)	26	8

()は試料数

コロニー数:ヨーネ用培地 3 本に形成したコロニーの合計

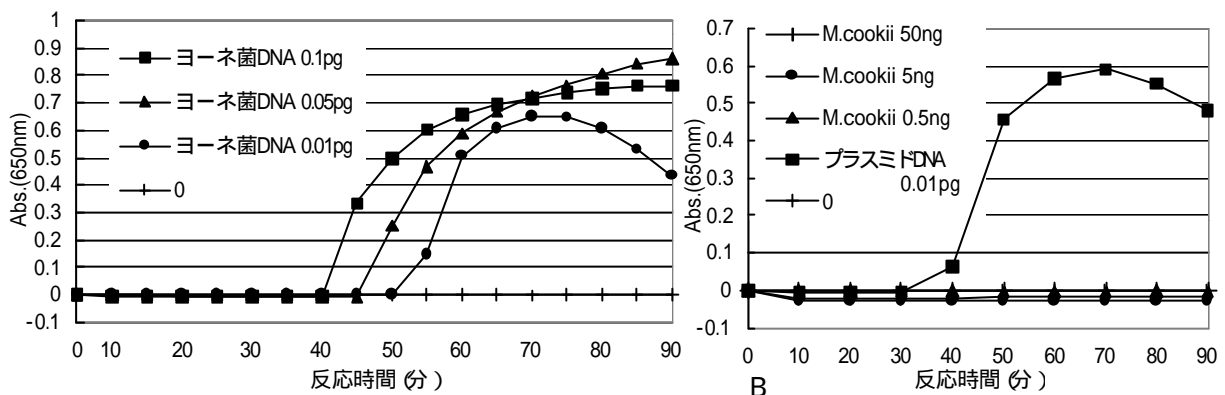


図 1 Primer 3 のヨーネ菌遺伝子検出感度(A)と特異性(B)

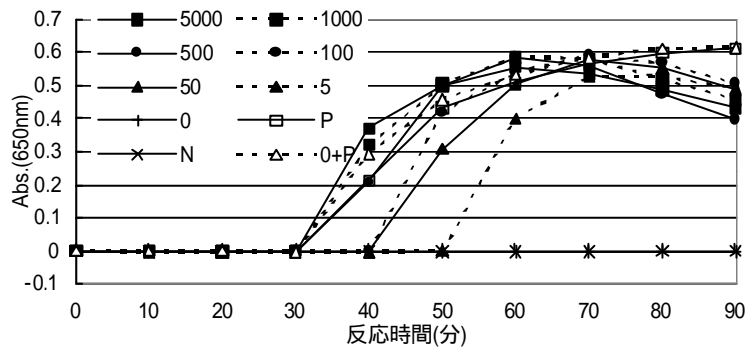


図 2 牛糞便希釈液に添加したヨーネ菌の検出 (単位 cfu/ml)
P : ヨーネ菌 DNA200pg(4×10^4 cfu) N : 蒸留水
0+P : 牛糞便由来 DNA にヨーネ菌 DNA を添加した反応系

4. 成果の活用面と留意点

本技術は「ヨーネ菌検出用プライマーおよびこれを用いたヨーネ病の診断法」として特許出願中である。(特願 2003-159573)

5. 残された問題点とその対応

糞便材料を用いた本法の精度の検討、実用化に向けた多検体処理方法の検討が残されており、平成 16 年度からの試験研究課題の中で検討していく。

また、農水省の診断予防技術向上対策事業において、本法の試験調査が実施されることとなった。