

平成24年度 成績概要書

研究課題コード： 6102-674531 (公募型研究)、6102-514591 (一般共同研究)

1. 研究成果

- 1) 研究成果名：LAMP 蛍光判定法によるヨーネ菌の同定
(予算課題名：現場で使える牛ヨーネ病の目視判定法の開発 (H23-24))
(予算課題名：多検体検査に適したヨーネ病遺伝子診断法の改善 (H19-22))
- 2) キーワード：LAMP 法、ヨーネ菌、細菌コロニー、蛍光目視判定
- 3) 成果の要約：ヨーネ菌特異的で反応時間の短い LAMP 用プライマーセットを選定し、ヨーネ菌分離培養法において培地上に発現した細菌コロニーを蛍光目視により判定できる方法を開発した。本法は、これまでと比べて簡便、迅速かつ高額な機器を必要としないヨーネ菌同定法として活用できる。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：畜試・基盤研究部・畜産工学 G・内藤 学
- 2) 共同研究機関 (協力機関)：H 23~24 (動物衛生研究所・栄研化学株式会社)
H 19~22 栄研化学株式会社・株式会社微生物化学研究所
- 3) 研究期間：平成 19~24 年度 (2007~2012 年度)

4. 研究概要

- 1) 研究の背景：ヨーネ病は反芻家畜における法定伝染病の 1 つで、治療法はなく早期に摘発し淘汰することが対策の基本である。ヨーネ病の清浄化に要する時間と経費は畜産農家にとって大きな負担となっている。ヨーネ病の法定検査法の 1 つである糞便からの分離培養法において寒天培地上に発現したヨーネ菌と疑われる細菌コロニーについては、現在 DNA を抽出して PCR 法またはリアルタイム PCR によりヨーネ菌と同定しているが、両者にはそれぞれ所要時間が長い、高額な機器を必要とするなど改善の余地があるため、より迅速で精度の高い検査法の確立が要望されてきた。
- 2) 研究の目的：LAMP 法の優位性を活かし、簡便な操作で培地上に発現した細菌コロニーのヨーネ菌を迅速に同定することができる蛍光目視の判定系を開発する。

5. 研究方法

- 1) ヨーネ菌特異的な LAMP 用プライマーセットの選定
 - ・ねらい：ヨーネ菌に特異的な DNA 配列 IS900 からプライマー設計を行い、類似菌株との交差反応がなく感度の最も高い LAMP 用プライマーセットを選定し、適切な温度条件を検討する。
 - ・試験項目等：基本プライマー 3 組、Loop プライマー組み合わせ 20 通り、計 23 セット
特異性：ヨーネ菌、スウェーデン 2333 株(st2333: *Mycobacterium* sp. 2333)、宮崎 4 株(MYZ4: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* H17-MYZ-4)、宮崎 5 株(MYZ5: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* H17-MYZ-5)、大分 2 株 (OIT2: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* OIT-2)
感度：陽性対照 (IS900 挿入プラスミド DNA 2.04×10^5 copy/ μ L) 10 倍段階希釈液
反応温度 4 段階 (65.0~66.5°C)
- 2) 蛍光目視判定によるヨーネ菌検出系の開発
 - ・ねらい：1) で選定したヨーネ菌検出 LAMP 用プライマーセットと蛍光色素カルセインを組み合わせた蛍光反応系の特異性および感度について検討する。
 - ・試験項目等：1) と同様に特異性および感度の検討
- 3) 開発したヨーネ菌検出 LAMP 蛍光反応系によるコロニー同定の実証
 - ・ねらい：開発したヨーネ菌検出 LAMP 蛍光反応系を用いて、道内の家畜保健衛生所 (家保) において糞便分離培養法で陽性とされた野外試料の細菌コロニーのヨーネ菌同定を行い、一致度を示すとともに、LAMP 専用反応装置によらない反応について検証を行う。
 - ・試験項目等：サンプル：道内家保から分与された野外試料コロニー 50 試料
DNA 抽出法 (DX 法、TE 法、Tris 法) と LAMP 専用反応装置とそれ以外の機器 (PCR 用サーマルサイクラー) での反応

6. 研究の成果

- 1) 新たに設計した LAMP 用プライマー 3 組 23 セットの中からヨーネ菌類似菌 (st2333、MYZ4、MYZ5、OIT2) との交差反応がなく、反応時間が短い LAMP 用プライマーセット PM21(o) を選定した (表 1)。温度条件は $66^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ が適していた (表 2)。
- 2) 蛍光試薬を添加したヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系について、特異性ではヨーネ菌類似菌との交差反応は見られず (写真 1-a)、感度は IS900 挿入プラスミド DNA 10^3 copy/test まで検出 (写真 1-b)、かつ同定済みのヨーネ菌コロニーを正しく検出している (写真 1-c) ことにより、ヨーネ菌同定に適していることが示された。
- 3) 開発したヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系は、DNA 抽出法に関わらず道内家保で陽性と判定された 50 の野外試料全てからヨーネ菌を検出し陽性と判定できた (表 3)。また、LAMP 専用反応装置を用いない場合でも蛍光目視により専用反応装置と遜色なくヨーネ菌の検出が可能であった。

< 具体的データ >

表 1. ヨーネ菌検出 LAMP 用プライマーPM21 による特異性の比較

	Loop無	Loopプライマーセット(h~t)添加										
		h	i	l	m	n	o	p	q	r	s	t
ヨーネ菌	40.3	31.4	28.4	27.0	25.2	27.5	18.6	18.7	19.9	26.4	24.7	27.9
st2333	-	-	-	-	52.6	-	-	44.5	40.6	-	57.3	-
MYZ4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MYZ5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OIT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

st2333: スウェーデン2333株、MYZ4: 宮崎4株、MYZ5: 宮崎5株、OIT2: 大分2株
 数値: Tt値(濁度0.1までの反応時間:分)、 -: 反応なし

表 2. ヨーネ菌検出 LAMP 用プライマー PM21 (o) における至適温度の検討

試料		反応温度(°C)			
		65.0	65.5	66.0	66.5
ヨーネ菌		18.6	18.6	18.3	18.2
st2333		-	-	-	-
陽性対照 ¹⁾	10 ⁶	20.9	20.6	20.0	20.2
(copy/test)	10 ⁵	23.7	23.9	23.0	23.3
	10 ⁴	30.0	32.1	30.0	31.6
	10 ³	-	-	-	-
	10 ²	-	-	-	-
陰性対照 ²⁾		-	-	-	-

1) : IS900挿入プラスミドDNA 2.04 × 10⁵copy/ μL
 2) : 滅菌蒸留水
 数値: Tt値(濁度0.1までの反応時間:分)、 -: 反応なし

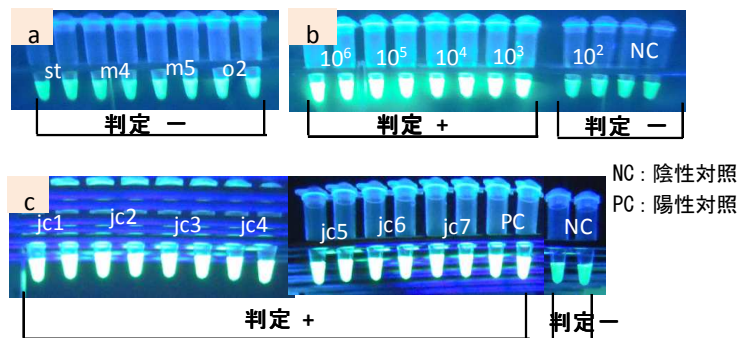


写真 1. ヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系における判定
 a : 特異性の検証 (st: st2333 株、m4: 宮崎 4 株、m5: 宮崎 5 株、o2: 大分 2 株)
 b : 感度の検証 (IS900 挿入プラスミド DNA 10⁶~10²copy/test)
 c : ヨーネ菌コロニー試料(jc1~jc7)を用いた検証
 NC: 陰性対照
 PC: 陽性対照

表 3. ヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系による野外試料コロニーの目視判定結果

畜試LAMP判定	DNA抽出法	DX	TE	Tris	計
陽性	+	20	15	15	50
陰性	-	0	0	0	0

*全てLAMP専用反応装置により2反復とも蛍光を確認

DX: DEXPAT (TaKaRa) 使用

TE: TE buffer(10mmol/L Tris-HCl + 1mmol/L EDTA)使用

Tris: 10mmol/L Tris-HCl 使用

【解説】

LAMP 法: Loop Mediated Isothermal Amplification の略で、一定温度条件下で途中 Loop 上の構造を伴い進行する迅速、簡易、精確な DNA 増幅法。

IS900: ヨーネ菌に特異的な 1451 塩基対からなる DNA 配列。類似菌のスウェーデン 2333 株 (st2333) は相同性が高い (94%) 配列を有していることから、これまで LAMP 法で交差反応が問題となっていた。

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 開発したヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光判定法は、ヨーネ菌用培地による糞便培養で発現した細菌コロニーの同定に用いる。
- (2) ヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系は研究用試薬として利用される。
- (3) 本成果は、栄研化学株式会社・株式会社微生物化学研究所との共同研究、および技術振興機構研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラムフィージビリティスタディステージ探索タイプ (JST A-step 【FS】) により実施した試験をまとめたものである。

2) 残された問題とその対応

なし