

[成果情報名] LAMP 蛍光判定法によるヨーネ菌の同定

[要約] 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 LAMP 法により蛍光目視で判定する方法が開発され、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。

[キーワード] LAMP 法、ヨーネ菌、細菌コロニー、蛍光目視判定

[代表連絡先] 電話 0156-64-0617

[研究所] 道総研畜産試験場・基盤研究部・畜産工学グループ

[背景・ねらい]

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。LAMP 法は 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 増幅法である。そこで 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。

[成果の内容・特徴]

1. ヨーネ菌に特異的な DNA 配列 IS900 を標的配列として設計した LAMP 用プライマーセット PM21(o)は、ヨーネ菌類似菌スウェーデン 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) との交差反応がなく、ヨーネ菌での反応時間が短く(表 1)、反応に適切な温度条件は 66°C 前後である(表 2)。
2. 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)ことから、ヨーネ菌同定に適している。
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において糞便分離培養法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る(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る。

[普及のための参考情報]

1. 普及対象: 道内家畜保健衛生所
2. 予定時期: 2013 年中にプライマーセットが研究用試薬として市販される予定。
3. 留意点: 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。

[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 × 10⁵ copy/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

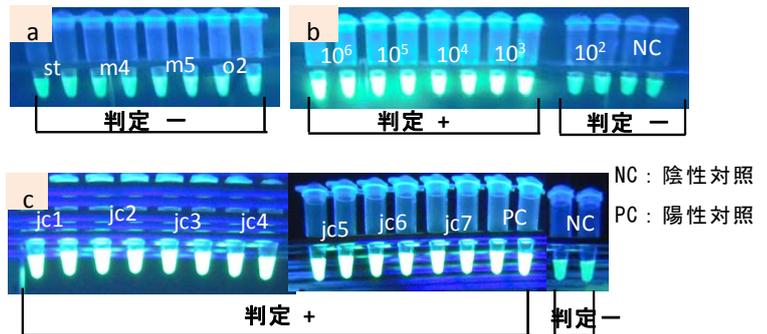


写真 1. ヨーネ菌検出用 LAMP 蛍光反応系における判定
 a : 特異性の検証 (st:st2333株、m4:宮崎4株、m5:宮崎5株、o2:大分2株)
 b : 感度の検証 (IS900挿入プラスミドDNA 10⁶~10²copy/test)
 c : ヨーネ菌コロニー試料(jc1~jc7)を用いた検証

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

(内藤 学)

[その他]

予算区分: JST-Astep・一般共同研究

研究期間: 2007~2012年度

研究担当者: 内藤 学、平山博樹、陰山聡一、南橋 昭、鈴木 渉(栄研化学株式会社)

発表論文等: 1) 内藤ら(2012)「牛糞便培養により分離されたコロニーの LAMP 法によるヨーネ菌同定」家畜感染症学会誌 1 巻 3 号: 133-137

平成 24 年度北海道農業試験会議(成績会議)における課題名および区分

「LAMP 蛍光判定法によるヨーネ菌の同定」(指導参考)