

## Random Amplification DNA Fingerprintingによる 牛乳房炎主要原因菌種の同定

勝田 賢<sup>1)\*</sup>, 江口 正志<sup>2)</sup>, 坪井 孝益<sup>3)</sup>, 横山 隆<sup>3)</sup>, 西森 敬<sup>4)</sup>, 内田 郁夫<sup>4)</sup>,  
田中 聖<sup>4)</sup>, 西森 知子<sup>4)</sup>, 今井 邦俊<sup>4)</sup>

(平成13年7月31日 受付)

### Application of random amplification DNA fingerprinting for identification of bacteria isolated from bovine mastitis

Ken KATSUDA<sup>1)\*</sup>, Masashi EGUCHI<sup>2)</sup>, Takamitsu TSUBOI<sup>3)</sup>, Takashi YOKOYAMA<sup>3)</sup>, Kei NISHIMORI<sup>4)</sup>,  
Ikuo UCHIDA<sup>4)</sup>, Kiyoshi TANAKA<sup>4)</sup>, Tomoko NISHIMORI<sup>4)</sup> & Kunitoshi IMAI<sup>4)</sup>

Random Amplification DNA Fingerprinting (RAPD) 法により乳房炎主要原因菌であるブドウ球菌, レンサ状球菌, 大腸菌群の同定方法を検討した。乳房炎乳汁から分離されたレンサ状球菌 (8菌種; 296株), ブドウ球菌 (9菌種; 215株), 大腸菌群 (8菌種; 151株) を市販簡易同定キットで同定し, 選定したプライマーを用いてRAPD法を実施した。その結果, ブドウ球菌およびレンサ状球菌の菌種識別に有望なプライマー-OEP-04 (gTgACATgCC), 大腸菌群の菌種識別に有望なプライマー-AP-45 (gTCAACgAAg) を得ることができた。供試レンサ状球菌は全て識別されたが, 供試ブドウ球菌中 *Staphylococcus hyicus* と *Staphylococcus simulans* は識別できなかった。しかし, これら2菌種は他の供試ブドウ球菌と識別された。供試大腸菌群のうち *Serratia marcescens* は菌種に共通な遺伝子増幅産物は認められず, この菌種の識別に選定したプライマーによるRAPD法の応用は不可能と考えられたが, 他の7菌種はRAPD法により識別可能であった。以上のことから, 一部の例外を除き, RAPD法により乳房炎主要菌種の同定は可能と考えられる。

#### 1. はじめに

牛の乳房炎は, 生産乳量の低下, 乳質の低下, 乳の廃棄等生産性の低下を来し, さらに衛生対策費の増大を

もたらす等, 酪農経営上最も大きな問題となっている。

乳房炎を起こす細菌は100種類以上存在すると言われている。その原因細菌を正確に特定することは科学的に乳房炎の病状を把握し, 的確な措置を講ずるための大原則である。原因細菌の同定は, 基本的には生化学的性状検査により実施されている。最近では生化学的性状や酵素プロファイルを検査する各種簡易同定キットが導入され, 菌種同定が簡便に行えるようになってきている。しかし, 生化学的性状や酵素プロファイルに基づく同定が容易でない細菌もある。例えば動物由来のレンサ球菌属の1~10%が, ブドウ球菌の1~50%が生化学的性状や酵素プロファイルが一致しないために同定不能であると報告されている<sup>1)~4)</sup>。これは, 殆どの簡易同定キットのデータベースは人由来細菌の性状に基づいて構築されており, その生化学的性状や酵素プロファイルが動物由来菌

- 1) 農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部 (現: 動物衛生研究所七戸研究施設)  
〒039-2586 青森県上北郡七戸町字海内31
- 2) 農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部 (現: 動物衛生研究所疫学研究部)
- 3) 農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部 (現: 動物衛生研究所感染症研究部)
- 4) 農林水産省家畜衛生試験場北海道支場 (現: 動物衛生研究所北海道支所)

\* Corresponding author; Mailing address: Shichinohe Research Unit, National Institute of Animal Health  
Shichinohe, Kamikita, Aomori, 039-2586 Japan. Tel: +81-176-62-5115. Fax: +81-176-62-5117. E-mail: katsuda@affrc.go.jp

種と必ずしも一致しないためと考えられる。

わが国では乳房炎原因細菌の同定は家畜保健衛生所で実施されているほか、農業共済組合診療所の臨床獣医等により診療行為の合間に行われることが多く、作業の簡便化、効率化、同定精度の向上などが求められている。

最近、Random Amplification DNA Fingerprinting (RAPD) 法を応用した簡便且つ迅速な乳房炎原因菌の同定手法が報告された<sup>5)~7)</sup>。Gillespieらはこの手法が従来の生化学的性状検査に基づく同定方法に比べて簡便、安価、迅速と報告している<sup>8)</sup>。しかしわが国においては、本法に関する検討はなされていない。本法は、菌種同定という極めて基礎的な細菌学的手法であり、しかも応用性が高いと考えられることから早急に評価し、長所、短所、限界等を明確にする必要性があると考え、「Random Amplification DNA Fingerprinting による乳房炎主要原因菌種同定法の評価」の場内プロジェクトを実施した。

本稿では、場内プロジェクトで得られた結果をもとに、乳房炎主要原因菌のうちのブドウ球菌、レンサ球菌、大腸菌群のRAPD法による同定方法を紹介する。

## 2. RAPD法による乳房炎主要原因菌種の同定

乳房炎主要原因菌であるブドウ球菌、レンサ球菌、大腸菌群のRAPD法による同定に適したプライマーを選定すべく、10塩基長のプライマー20種類を比較検討した結果、ブドウ球菌およびレンサ球菌にはプライマー OEP-04 (gTgACA TgCC) が、大腸菌群にはプライマー AP-45 (gTCAACgAAg) が菌種型別に有望なプライマーと考えられた。

乳房炎乳汁から分離され、市販簡易同定キット (ブドウ球菌: N-IDテスト・SP-18, レンサ球菌: API20 STREP, 大腸菌群: IDテスト・EB-20) により同定された、レンサ球菌: 8菌種, 296株, ブドウ球菌: 9菌種, 215株, 大腸菌群: 8菌種, 151株について選定したプライマーを用いてRAPD-PCRを実施した。

すなわち、純培養した細菌から遺伝子抽出キットである InstaGene Matrix (BIO-RAD) を用いて菌体DNAを抽出し、これをテンプレートとして、ブドウ球菌とレンサ球菌にはプライマーOEP-04を用い、大腸菌群にはプライマーAP-45を用いて、RAPD-PCRを行った。RAPD-PCRの反応液組成および遺伝子増幅プログラムは表1及び表2に示した。検出された遺伝子増幅産物を Molecular Analyst Software Ver.1.6 (BIO-RAD) で解析し、菌種内に共通し、他菌種と識別できる遺伝子増幅産物群を検索した。

Table 1 The RAPD reaction buffer

| Reagents                          | Final concentration |
|-----------------------------------|---------------------|
| DNA                               | 15 ~ 40ng           |
| primer                            | 20pmol              |
| Taq polymerase                    | 1U                  |
| dNTPs                             | 250mM (each)        |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 3mM                 |
| MgCl <sub>2</sub> free PCR buffer | 25 μl               |

Table 2 DNA amplification program

| Cycles                | Temperature/min       |
|-----------------------|-----------------------|
| 1 94 /5min            | 35 /5min 72 /5min     |
| 35 94 /1.5min         | 35 /1.5min 72 /1.5min |
| 1                     | 72 /10min             |
| Total time : 182.5min |                       |

供試したレンサ球菌の菌種及び菌株数は表3に示した通りである。レンサ球菌 (プライマー: OEP-04) では、菌種同定に使用できると考えられる2~5本の同一菌種内に共通な大きさの遺伝子増幅産物が認められ、今回供試した8菌種は全てRAPD法により識別された (表3)。

供試したブドウ球菌の菌種及び菌株数は表4に示した通りである。ブドウ球菌 (プライマー: OEP-04) の内、*Staphylococcus simulans*と*Staphylococcus hyicus*を除く7菌種では、菌種同定に使用できると考えられる3~5本の同一菌種内に共通な大きさの遺伝子増幅産物が認められた。*S. simulans*では5本 (1041, 796, 651, 533, 419bp) の*S. hyicus*では3本 (796, 651, 533bp) の菌種内に共通な大きさの遺伝子増幅産物が認められた。しかし、*S. hyicus*にも1041bpと419bpの大きさの遺伝子増幅産物が同時に認められた菌株が存在したことから、これら2菌種の識別は困難であった。なお、これら2菌種は他の供試ブドウ球菌とは識別された (表4)。

大腸菌群として*Serratia marcescens*の他、表5に示した菌種及び菌株数を供試した。大腸菌群 (プライマー: AP-45) の内、*S. marcescens*では菌種内に共通の遺伝子増幅は認められなかった。残り7菌種では、菌種同定に使用できると考えられる2~6本の同一菌種内に共通な大きさの遺伝子増幅が認められ、RAPD法による菌種識別は可能と考えられた (表5)。

Table 3 Amplified DNA fragment profiles using RAPD assay of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine mastitic milk

| Organisms              | No. of strains | DNA fragment size (bp) |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|----------------|------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        |                | 1334                   | 1207 | 1118 | 1018 | 958 | 901 | 815 | 752 | 720 | 684 | 639 | 571 | 539 | 485 | 458 | 420 | 374 | 312 | 153 | 101 |
| <i>S. uberis</i>       | 130            |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>S. dysgalactiae</i> | 72             |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>S. bovis</i>        | 41             |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>S. agalactiae</i>   | 2              |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>A. viridans</i>     | 38             |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>E. faecalis</i>     | 8              |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>E. durans</i>       | 2              |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>E. faecium</i>      | 3              |                        |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Table 4 Amplified DNA fragment profiles using RAPD assay of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitic milk

| Organisms              | No. of strains | DNA fragment size (bp) |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|------------------------|----------------|------------------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|                        |                | 1795                   | 1485 | 1210 | 1173 | 1041 | 918 | 860 | 796 | 758 | 742 | 699 | 651 | 624 | 571 | 559 | 533 | 508 | 489 | 433 | 419 | 367 | 282 | 239 | 151 | 98 |
| <i>S. aureus</i>       | 162            |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. chromogenes</i>  | 15             |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. epidermidis</i>  | 6              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. haemolyticus</i> | 2              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. kloosii</i>      | 4              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. lentus</i>       | 3              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. simulans</i>     | 8              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. hyicus</i>       | 7              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| <i>S. xylosus</i>      | 8              |                        |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |

## Coagulase Negative Staphylococci (CNS)

Table 5 Amplified DNA fragment profiles using RAPD assay of coli-forms isolated from bovine mastitic milk

| Organisms                    | No. of strains | DNA fragment size (bp) |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------|----------------|------------------------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                              |                | 2341                   | 1968 | 1304 | 1158 | 1142 | 1071 | 993 | 949 | 851 | 801 | 648 | 620 | 547 | 517 | 465 |
| <i>Escherichia coli</i>      | 126            |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Citrobacter freundii</i>  | 2              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Klebsiella oxtoca</i>     | 7              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 3              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Enterobacter cloacae</i>  | 2              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Proteus penneri</i>       | 2              |                        |      |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

以上の結果に基づき、レンサ状球菌、ブドウ球菌および大腸菌群の既知株の遺伝子増幅産物パターンと未知株の遺伝子増幅産物パターンとを比較することにより菌種を同定する手順を図1～図3に例示した。

## 3. RAPD法と市販簡易同定キットの比較

図1に示した手順に従い、未同定レンサ状球菌100株をRAPD法により同定した後、レンサ状球菌の簡易同定キ

ットであるAPI20 STREPによる同定を行い、それらの成績を比較した。

RAPD法による同定結果とAPI20 STREPによる同定結果は、1株を除き完全に一致し、その一致率は99%であった。両法で同定結果が異なった1株は、RAPD法では*Streptococcus uberis*と同定されたが、API20 STREPでは判定不能であった(表6)。

今回供試したレンサ状球菌の内、API20 STREPで判

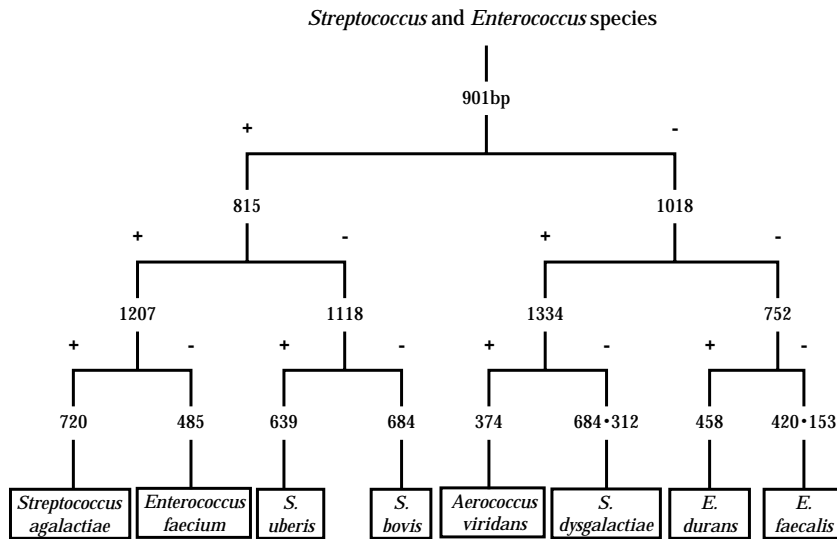


Figure 1 Differentiation of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using RAPD

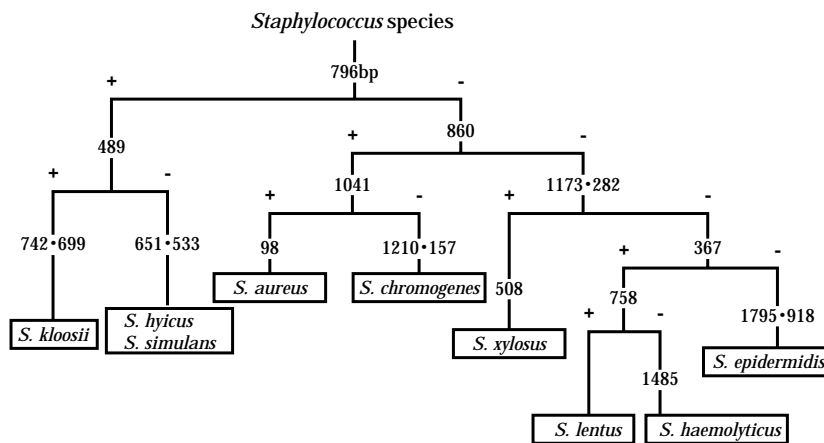


Figure 2 Differentiation of *Staphylococcus* species using RAPD

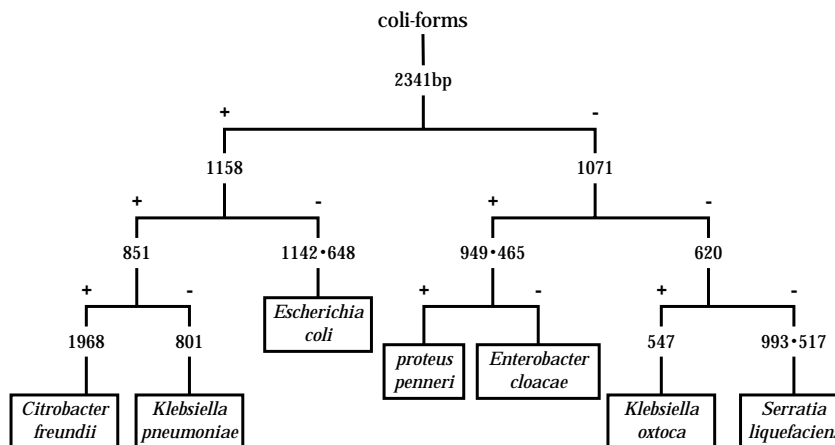


Figure 3 Differentiation of coli-forms using RAPD

定不能であった16株について、RAPD法による同定を行ったところ、4株が*S. uberis*、3株が*Streptococcus dysgalactiae*、1株が*Aerococcus viridans*と推定されたが、残り8株はRAPD法によっても同定不能であった(表7)。

Table 6 Comparison of two methods for species identification of *Streptococcus* isolates

|                        | RAPD | API 20 STREP |
|------------------------|------|--------------|
| <i>S. uberis</i>       | 52   | 51           |
| <i>S. dysgalactiae</i> | 30   | 30           |
| <i>S. bovis</i>        | 11   | 11           |
| <i>A. viridans</i>     | 6    | 6            |
| <i>E. faecalis</i>     | 1    | 1            |

Table 7 The result by RAPD assay of the 16 *Streptococcus* isolates in which unidentified in the API20 Strep system

| Organism               | No. of strains |
|------------------------|----------------|
| <i>S. uberis</i>       | 4              |
| <i>S. dysgalactiae</i> | 3              |
| <i>A. viridans</i>     | 1              |
| Unidentified           | 8              |

#### 4. 同定コストおよび時間の比較

RAPD法と汎用されている簡易同定キットによる菌種同定に要するコストを比較した。RAPD法による同定にかかる消耗品のコストは、1検体当たり451円と、簡易同定キットによる同定に比較し、160円~600円程度安価であった(表8)。ただしRAPD法による菌種同定を実施するためには、デンシトメーター、解析用コンピュータ

Table 8 Cost comparison of RAPD and Rapid Identification Systems

| RAPD (yen)            | Rapid Identification Systems (yen) |               |                               |                 |                              |              |      |
|-----------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|--------------|------|
|                       | Coli-forms                         |               | <i>Staphylococcus</i> species |                 | <i>Streptococcus</i> species |              |      |
| TBE buffer            | 19                                 | ID-test・EB-20 | 540                           | N-ID-test・SP-18 | 592                          | API 20 STREP | 1040 |
| Molecular marker      | 42                                 | Reagents      | 70                            | Reagents        | 70                           | Reagents     | 22   |
| Primer                | 15                                 |               |                               |                 |                              |              |      |
| <i>Taq</i> polymerase | 120                                |               |                               |                 |                              |              |      |
| Insta-Gene            | 60                                 |               |                               |                 |                              |              |      |
| Agarose gel           | 35                                 |               |                               |                 |                              |              |      |
| Polaroid film         | 125                                |               |                               |                 |                              |              |      |
| Disposables/misc      | 35                                 |               |                               |                 |                              |              |      |
|                       | 451                                |               | 610                           |                 | 662                          |              | 1062 |

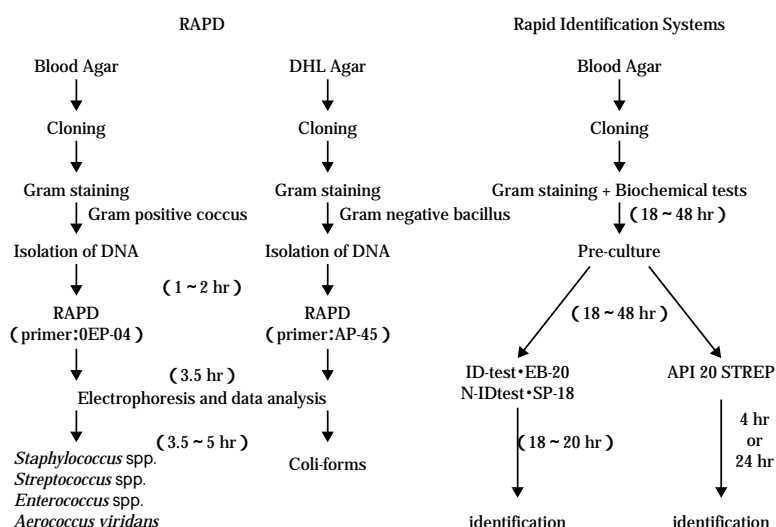


Figure 4 Identification method by the RAPD and Rapid Identification System

ー及びソフト等の購入に大きな経費を要する。

また、同定する菌の純化後、簡易同定キットでは菌種同定までに、2~3日を要するが、RAPD法では8~10時間程度で判定が可能であった(図4)。

## 5. まとめ

- 1) 一部の例外を除き、2種類のプライマーを使ったRAPD法により乳房炎主要菌種(ブドウ球菌, レンサ状球菌, 大腸菌群)の同定は可能と考えられる。
- 2) ただし、異なる菌種で同一の遺伝子増幅パターンを示すものや、共通の遺伝子増幅が認められない菌種も存在し、これらの菌種については今回選定したプライマーを用いたRAPD法による菌種同定は困難である。
- 3) RAPD法では従来の市販簡易同定キットによる同定に比較し経費(消耗品費)及び時間が節減される。ただしデンストメーター, 解析用コンピューター及びソフト等の購入に大きな経費を要する。
- 4) 菌種間に共通なバンド以外にも多数のバンドが認められ、簡便に使用できる専用解析ソフトがないため、結果の解析が煩雑である。
- 5) 以上のことから、RAPD法による菌種同定は、迅速で経済的な方法と考えられるが、現段階では簡便な同定方法として普及しうるとは考えにくい。しかしながら、今後より多くの菌株, 菌種を用いたデータベースが構築され専用解析ソフトが開発されれば有用な迅速簡易同定法となる可能性は十分に考えられる。

なお、本稿についての技術的な問い合わせは、七戸研究施設環境衛生研究室勝田賢(katsuda@affrc.go.jp)までお願いしたい。

## 参考文献

- 1) Facklam, R.R., Rhoden, D.L., Smith, P.B. : Evaluation of the Rapid Strep system for the identification of clinical isolates of *Streptococcus* species. J Clin. Microbiol. 20, 894-898 (1984).
- 2) Jayarao, B.M., Oliver, S.P., Matthews, K.R., King, S.H. : Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of *Streptococcus* species of bovine origin. Vet. Microbiol. 26, 301-308 (1991).
- 3) Matthews, K.R., Oliver, S.P., King, S.H. : Comparison of Vitek Gram-Positive identification system with API Staph-Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin. J. Clin. Microbiol. 28, 1649-1651 (1990).
- 4) Watts, J.L. : Evaluation of the Rapid Strep System for identification of gram-positive, catalase-negative cocci isolated from bovine intramammary infections. J. Dairy. Sci. 72, 2728-2732 (1989).
- 5) Jayarao, B.M., Keane, K.A., Gillespie, B.E., Luther, D.A., Oliver, S.P. : DNA fingerprinting: A new technique for identifying mastitis pathogens. Proc. Natl. Mastitis. Council. 167-177 (1993).
- 6) Lam, T.J.G.M., Lipman, L.J.A., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A. : Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. Am. J. Vet. Res. 57, 39-42 (1996).
- 7) Jayarao, B.M., Gillespie, B.E., Oliver, S.P. : Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. J. Food Protec. 59, 615-620 (1996).
- 8) Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. : Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. J Dairy Sci. 80, 471-476 (1997).

## Summary

### Application of random amplification DNA fingerprinting for identification of bacteria isolated from bovine mastitis

Ken KATSUDA<sup>1)</sup>, Masashi EGUCHI<sup>2)</sup>, Takamitsu TSUBOI<sup>3)</sup>, Takashi YOKOYAMA<sup>3)</sup>, Kei NISHIMORI<sup>4)</sup>,  
Ikuo UCHIDA<sup>4)</sup>, Kiyoshi TANAKA<sup>4)</sup>, Tomoko NISHIMORI<sup>4)</sup> & Kunitoshi IMAI<sup>4)</sup>

A polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting system for species identification of bacteria isolated from mastitic milk was developed using random amplified polymorphic DNA. A total of 662 isolates belonging to coliforms, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Enterococcus* species were used to develop the system. It is apparent from the present study that primer OEP-04 generated DNA fragments that can be used for differentiation and identification of members of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus* species. The RAPD analysis of coliforms species using primer AP-45 has shown promising results for differentiation and identification of those bacteria. This technique is cost effective, simple to perform and may be adopted as a fast and easy identification technique by other laboratories involved in diagnosis of mastitis pathogens when a dedicated analysis software is developed in the future.