

短 報

## 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

内藤 学<sup>1)</sup>\*・陰山聡一<sup>1)</sup>・藤井貴志<sup>1)</sup>・福田茂夫<sup>1)</sup>・平山博樹<sup>1)</sup>・南橋 昭<sup>1)</sup>・鈴木 渉<sup>2)</sup>

- 1) 道総研畜産試験場 (〒081-0038 上川郡新得町西5線39番地)  
2) 栄研化学株式会社 (〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木143)

\*連絡担当者：内藤 学

Tel : 0156-64-0617 Fax : 0156-64-3484

E-mail : naitou-akira@hro.or.jp

### 【要 約】

牛糞便の培養検査において分離されたコロニーの *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌、MAP) 同定検査に、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が応用できるか否か検証した。糞便培養検査において分離された49コロニーについて、4種類のDNA抽出法を用いてLAMP法によりヨーネ菌特異的DNA配列の検出を行ったところ、いずれの抽出法を用いてもヨーネ菌を検出することが可能で、リアルタイムPCRおよびPCR-アガロースゲル電気泳動と結果が一致した。また、北海道内の家畜保健衛生所(家保)職員に同様の方法でLAMP法による検査を依頼したところ、すべて結果はPCR法と一致した。以上のことから、家保における現行のヨーネ菌同定用のPCR検査と同様に、LAMP法による検査が応用可能であることが示唆された。

キーワード：細菌コロニー、LAMP法、ヨーネ菌

### 【緒 論】

ヨーネ病はヨーネ菌 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* の感染で発症する牛、めん羊、山羊などの反芻家畜における慢性腸炎で家畜法定伝染病に指定されている。成牛群50頭規模の酪農農場において感染牛が発生した場合、7年間で829万円の経済的損失が試算されている[5]。北海道の家畜保健衛生所(家保)では、ヨーネ病検査は糞便試料を接種したヨーネ菌用培地を3ヶ月間培養後、培地上の疑わしい細菌コロニー(以下コロニー)のDNAを抽出し、PCRなどによりヨーネ菌に特異的遺伝子を検出することで同定・診断している。しかし、糞便試料の検査にはさらなる迅速性と

利便性が要求されていることから、検査手法について継続的な研究がおこなわれている[4][7]。これまで著者らは遺伝子増幅技術の一つであるLAMP法[6]を用いて、ヨーネ菌に特異的な配列(IS900)を検出するプライマーの開発[3]に取り組んできた。今回、LAMP法によるヨーネ菌同定法の応用の可能性を探るため、糞便培養して発育したコロニーについて異なるDNA抽出法に対するLAMP法によるヨーネ菌検出について、リアルタイムPCR法およびPCR-アガロースゲル電気泳動(PCR-AGE)法と比較し検証した。また、家保職員にLAMP法によるヨーネ菌同定検査を依頼し、実証試験をおこなったので報告する。

### 【材料および方法】

家保から分与された患畜糞便試料を道立畜産試験場(現・道総研畜産試験場)においてヨー

受付：2012年4月17日  
受理：2012年7月6日

ネ病検査マニュアル [1] に基づき希釈、ヨーネ菌用培地「共立」(共立製薬) で最大6カ月培養して得られた49コロニーを用いた。DNAの抽出は家保が実際に行っている方法を踏まえ、以下の4通りの方法でおこなった。微量冷却遠心機は日立工機CR15Dを使用した。

a. InstaGene法(以下、IG法:ヨーネ病検査マニュアル [1])

マイクロチューブに滅菌蒸留水300 $\mu$ Lで菌浮遊液を作製する。8,262G(10,000rpm)で5分遠心し上清を除去する。その沈渣に簡易DNA抽出剤(BioRad社:InstaGene)を200 $\mu$ L添加し、ピペッティングにより良く攪拌・混合する。56 $^{\circ}$ Cで15分間ヌクレアーゼ不活性化後、100 $^{\circ}$ Cで細胞溶解のため8分間処理する。その後8,262G(10,000rpm)で5分間遠心し、上清を反応に用いる。

b. DEXPAT法(以下、DX法)

マイクロチューブに滅菌蒸留水50 $\mu$ Lで菌浮遊液を作製する。良く混和したDEXPAT(TaKaRa)約100 $\mu$ Lを含む別のチューブに、作製した菌浮遊液全量を加える。100 $^{\circ}$ Cで10分間細胞破壊処理後、11,897G(12,000rpm)で5分間遠心し、さらに別のチューブに上清を移し滅菌蒸留水で2倍希釈して反応に用いる。

c. TE buffer法(以下、TE法)

マイクロチューブにTE buffer(10mmol/L Tris-HCl(pH8.0) + 1mmol/L EDTA(pH8.0))300 $\mu$ Lで菌浮遊液を作製する。100 $^{\circ}$ Cで10分間細胞破壊処理する。8,262G(10,000rpm)で5分間遠心し、上清を反応に用いる。

d. Tris-HCl法(以下、Tris法)

マイクロチューブに10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)300 $\mu$ Lで菌浮遊液を作製する。100 $^{\circ}$ Cで10分間細胞破壊処理する。11,897G(12,000rpm)で5分間遠心し、上清を反応に用いる。

同一試料をLAMP法、リアルタイムPCR法そしてPCR-AGE法に供した。LAMP反応は次の通り行った。1チューブあたり2 $\times$ LAMP反応ミックス12.5 $\mu$ L、10 $\times$ ヨーネ菌用F17プライマー2.5 $\mu$ L(以上栄研化学)、Bst polymerase 1.0 $\mu$ L(New England Biolabs)、滅菌蒸留水4.0 $\mu$ L、テンプレートDNA 5.0 $\mu$ Lの合計25.0 $\mu$ Lで実行した。すべての試料および

対照(陽性:ヨーネ菌プラスミドDNA、陰性:滅菌蒸留水)について2反復おこなった。リアルタイム濁度測定装置Realoop-30(モリテックス)を使用して65 $^{\circ}$ Cの等温反応開始後、60分以内に濁度0.1以上を示した試料をヨーネ菌陽性とし、Tt値(濁度0.1を超えた時間:分)を記録した。リアルタイムPCR法およびPCR-AGE法は「ヨーネ病検査マニュアル[1]」に従った。

次に、十勝家保および釧路家保の家保職員にLAMP法によるヨーネ菌同定検査を依頼した。それぞれの家保で患畜と判定された糞便から得られたコロニーについて、十勝家保では50試料、釧路家保では25試料を供試した。コロニーからのDNA抽出は十勝家保ではDX法、釧路家保ではTE法を用いた。LAMP反応条件は畜産試験場における試験と同様とした。

## 【結果】

表1に各試料におけるLAMP法のTt値、リアルタイムPCR法のCt値(増幅産物が一定量に達したサイクル数)およびPCR-AGE法の検出結果(+ or -)を示した。DNA抽出法に関わらず、LAMP法による結果はリアルタイムPCR法、PCR-AGE法の結果と一致した。またLAMP法のTt値(平均値 $\pm$ 標準偏差:分)はIG法、DX法、TE法およびTris法でそれぞれ12.5 $\pm$ 0.6、13.7 $\pm$ 0.9、12.6 $\pm$ 0.6および13.3 $\pm$ 0.6と有意差はなく、反応曲線の推移にも差は見られなかった(図1)。

家保職員によるLAMP法のヨーネ菌同定検査では、十勝家保、釧路家保ともすべての試料でPCR検査と一致した(表2)。Tt値の範囲は十勝家保では10~19分、釧路家保では11~15分であった。またLAMP法で判定が困難な試料はなかった。

## 【考察】

LAMP法によるコロニーからのヨーネ菌検出結果は、DNA抽出法に関わらずリアルタイムPCR法およびPCR-AGE法の判定結果と一致した。また家保の職員が行った場合でもすべてPCR検査の結果と同一の結果が得られた。以上のことからLAMP法はヨーネ菌同定検査として応用可能であると思われた。このことは、

**Table 1** Comparison of MAP detective test for faecal cultured bacterial colonies with 4 different extraction ways

No.	LAMP Tt Value <sup>a)</sup> (min) extraction				realtimePCR Ct Value <sup>b)</sup> extraction				PCR-AGE <sup>c)</sup> extraction			
	IG	DX	TE	Tris	IG	DX	TE	Tris	IG	DX	TE	Tris
1	12.5	13.1	11.9	13.2	15.1	13.2	15.2	15.4	+	+	+	+
2	12.8	13.5	12.2	13.4	15.8	13.7	17.0	16.2	+	+	+	+
3	13.1	15.5	12.6	14.3	16.8	17.4	17.9	18.1	+	+	+	+
4	12.7	14.3	12.6	13.9	15.0	13.6	17.6	16.6	+	+	+	+
5	12.1	13.1	12.2	13.2	12.3	12.5	16.0	14.5	+	+	+	+
6	12.0	13.1	12.1	13.0	11.5	12.2	13.2	14.7	+	+	+	+
7	12.6	13.5	12.5	13.8	14.3	13.5	17.3	16.5	+	+	+	+
8	13.5	14.4	12.8	13.5	18.3	16.0	17.9	16.7	+	+	+	+
9	12.5	13.4	12.3	14.3	14.2	13.6	17.3	16.9	+	+	+	+
10	12.4	12.9	11.6	13.1	13.2	11.0	14.4	14.4	+	+	+	+
11	12.3	13.1	12.0	13.6	13.0	12.1	14.1	16.2	+	+	+	+
12	12.6	13.2	11.7	13.6	14.9	13.2	14.7	15.8	+	+	+	+
13	12.0	12.8	11.8	13.5	12.3	11.3	13.9	15.8	+	+	+	+
14	13.7	14.5	13.6	13.9	18.4	16.6	19.3	19.9	+	+	+	+
15	14.5	16.3	14.5	15.1	21.1	19.5	23.5	24.0	+	+	+	+
16	12.6	13.4	12.5	12.6	12.7	12.4	15.3	15.3	+	+	+	+
17	12.0	12.4	12.1	12.3	10.7	10.9	13.6	13.3	+	+	+	+
18	14.3	15.3	14.0	14.9	19.9	17.0	20.5	22.5	+	+	+	+
19	12.2	12.8	12.6	12.8	11.6	11.6	14.6	14.6	+	+	+	+
20	13.0	12.8	12.5	13.0	15.1	12.4	14.8	15.0	+	+	+	+
21	12.6	13.6	12.7	13.3	13.3	14.3	15.1	16.2	+	+	+	+
22	12.0	11.8	12.1	12.4	10.2	10.2	13.4	13.1	+	+	+	+
23	13.0	13.7	12.2	13.0	15.1	14.4	14.1	15.4	+	+	+	+
24	12.8	13.3	12.8	13.4	14.3	13.7	16.4	16.3	+	+	+	+
25	12.0	12.0	12.4	12.9	10.8	10.5	12.6	14.3	+	+	+	+
26	12.0	12.2	12.0	12.4	9.6	10.8	12.0	13.1	+	+	+	+
27	12.0	13.3	12.1	12.3	10.6	13.3	13.2	13.0	+	+	+	+
28	12.0	14.1	12.6	13.2	12.8	13.8	13.2	15.4	+	+	+	+
29	12.0	13.8	12.4	13.4	12.0	12.9	14.4	15.4	+	+	+	+
30	12.6	14.6	13.3	13.5	14.7	14.3	15.9	14.8	+	+	+	+
31	12.3	14.5	12.8	13.7	13.1	14.2	14.2	15.4	+	+	+	+
32	12.1	13.4	12.1	12.8	12.8	12.6	13.1	13.6	+	+	+	+
33	12.5	15.0	13.5	14.5	13.3	16.2	16.8	18.0	+	+	+	+
34	12.7	15.1	14.1	14.0	14.6	15.8	18.7	18.6	+	+	+	+
35	12.5	14.5	13.0	14.0	13.9	14.4	15.2	17.3	+	+	+	+
36	12.0	13.3	12.9	13.3	11.7	12.4	14.9	15.1	+	+	+	+
37	12.3	13.7	13.2	13.2	13.8	14.1	15.7	15.2	+	+	+	+
38	12.0	13.6	12.5	13.2	11.9	13.2	13.2	14.6	+	+	+	+
39	12.0	13.2	12.1	12.6	10.4	12.2	12.9	13.1	+	+	+	+
40	12.0	12.8	12.1	12.8	10.9	11.4	13.4	14.1	+	+	+	+
41	12.7	13.9	13.1	13.8	15.1	13.8	16.0	16.5	+	+	+	+
42	12.5	14.7	13.6	14.1	16.2	16.6	17.0	19.5	+	+	+	+
43	12.1	14.0	12.7	12.7	13.2	13.5	14.3	14.6	+	+	+	+
44	12.0	13.6	12.7	12.6	11.2	12.6	13.6	14.6	+	+	+	+
45	12.1	13.7	12.5	13.0	13.6	12.9	13.8	14.9	+	+	+	+
46	12.0	13.4	12.4	12.9	12.8	12.6	13.7	14.9	+	+	+	+
47	12.3	15.3	13.3	13.4	13.2	15.5	16.2	15.4	+	+	+	+
48	12.0	14.3	13.0	13.0	11.8	13.5	14.2	14.8	+	+	+	+
49	12.8	14.5	13.1	13.5	14.0	15.8	15.9	17.0	+	+	+	+
AVG	12.5	13.7	12.6	13.3	13.6	13.6	15.3	15.8				
SD	0.6	0.9	0.6	0.6	2.4	1.9	2.2	2.2				

IG : InstaGene method                      DX : DEXPAT method  
TE : TE buffer method                      Tris : Tris-HCl method  
a) Tt Value : the Time when turbidity exceeded 0.1  
b) Ct Value : the Cycle of PCR products reached Threshold value  
c) + : positive

家畜保健衛生所で PCR 法によって行われているヨーネ菌培地に発生したコロニーのヨーネ菌同定法について、現在採用している抽出法をそのまま用いて、検出法の部分だけを LAMP 法で代替可能であることを示唆している。本試験ではリアルタイム濁度測定装置を用いたため LAMP 法の反応時間を 60 分と設定したが、実証試験における Tt 値は最大 19 分であった。反応時間設定を 60 分未満にしても濁度等の判定に支障がなければ、陽性の確認時間がさらに

短縮されると類推される。このことは高価な装置を必要とし判定までに約 150 分かかる現行のリアルタイム PCR 法より短時間に安価なヨーネ菌の遺伝子検査が可能であることを示唆している。ただし、本試験で用いたプライマーによる LAMP 法では、スウェーデンで分離されたヨーネ菌の IS900 と高い相同性を持つ類似抗酸菌 *Mycobacterium. sp.* 2333 株 [2] と交差することが確認されている。このような抗酸菌は日本ではこれまで見つかってはいないが、交差

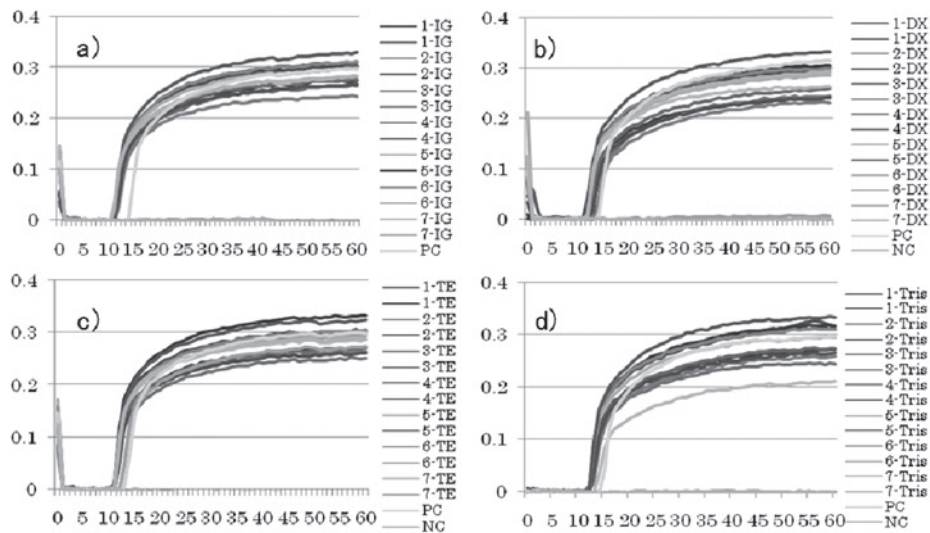


Fig. 1 Representative results of LAMP (reaction curve) for faecal cultured bacterial colonies with 4 different extraction ways

- a) InstaGene method                      b) DEXPAT method  
c) TE buffer method                        d) Tris-HCl method

horizontal axis : time of LAMP reaction (min)  
vertical axis : turbidity with DNA amplification  
PC : positive control    NC : negative control

Table 2 Result of MAP detective test for faecal cultured bacterial colonies in LHSC

No.	LAMP			
	T-LHSC <sup>a)</sup>		K-LHSC <sup>b)</sup>	
	+	-	+	-
PCR	50	0	25	0
	0	0	0	0

a) T-LHSC : Tokachi Livestock Hygiene Service Center  
DNA extraction : DEXPAT method  
b) K-LHSC : Kushiro Livestock Hygiene Service Center  
DNA extraction : TE buffer method

のないようにLAMPプライマーを改良している。具体的には、両者の配列を比較してIS900に特に相同性の高い領域を精査し、FIPプライマーおよびLoopプライマーの再設計による特異性向上を目指している。さらに判定を容易にするため、蛍光目視判定可能な反応系を開発する予定である。

### 【謝 辞】

本試験に対して多大なご協力をいただいた北海道庁畜産振興課および中岡祐司氏（現根室家保指導課長）ほか道内家畜保健衛生所の関係各位、およびこの執筆にあたり多大なご指導・ご助言をいただいた動物衛生研究所、森康行氏に深謝いたします。

### 【引用文献】

1. (独) 動物衛生研究所 ヨーネ病検査マニュアル  
<http://www.niah.affrc.go.jp/disease/paratuberculosis/index.html>
2. Englund S., G. Bolske, K.-E. Johansson. 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. 209: 267-271
3. Enosawa, M., 2003. Use of Loop-Mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* J. Clin. Microbiol. 37: 4359-4365.
4. Kawaji, S., Deborah L. Taylor, Y. Mori, R. J. Whittington. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. Vet. Microbiol. 125: 36-48
5. 窪田 さと子 2009. 畜産フードシステムにおける家畜衛生管理の経済学的研究. 帯広畜産大学学術情報リポジトリ  
<http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/2439>
6. Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T.

- Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e63
7. Soumya, M. P., R. M. Pillai, P. X. Antony, H. K. Mukhopadhyay, V. N. Rao 2009. Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faecal samples. *Vet. Res. Commun* 10

### Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* for cattle faecal cultured bacterial colonies by LAMP (loop-mediated isothermal amplification) method

Akira Naito<sup>1)</sup>, Souichi Kageyama<sup>1)</sup>, Takashi Fujii<sup>1)</sup>, Shigeo Fukuda<sup>1)</sup>, Hiroki Hirayama<sup>1)</sup>, Akira Minamihashi<sup>1)</sup>, Wataru Suzuki<sup>2)</sup>

1) Hokkaido Research Organization, Animal Research Center

2) Eiken Chemical Co.LTD,

\* representative author: Akira Naito

Tel: 0156-64-0617 Fax: 0156-64-3484 E-mail: naitou-akira@hro.or.jp

We have evaluated the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to identify *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from faecal cultured bacterial colonies grown on a culture medium. We have also compared four different extraction methods using 49 isolates to detect MAP with LAMP method. In all of four extraction methods, the LAMP indicated almost the same results with those of real-time PCR and PCR-Agarose Gel-Electrophoresis tests. In addition, the results from the LAMP test performed by veterinarians for the Hokkaido Livestock Hygiene Service Center were completely consistent with those of PCR method. These results suggest that LAMP test can substitute for real-time PCR or PCR-Agarose Gel-Electrophoresis test to identify MAP from isolated colonies.

Key Words: faecal cultured bacterial colony, LAMP method, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)