

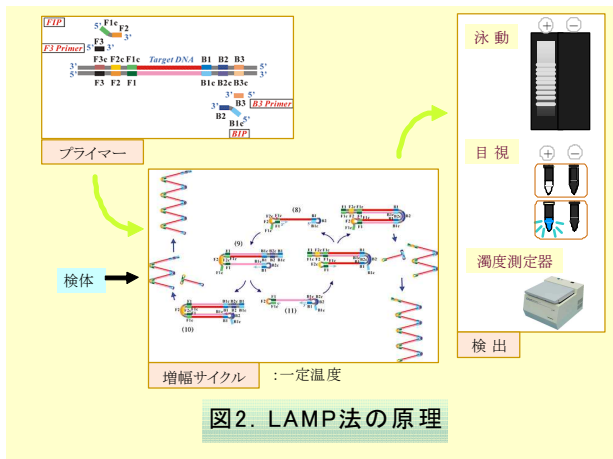
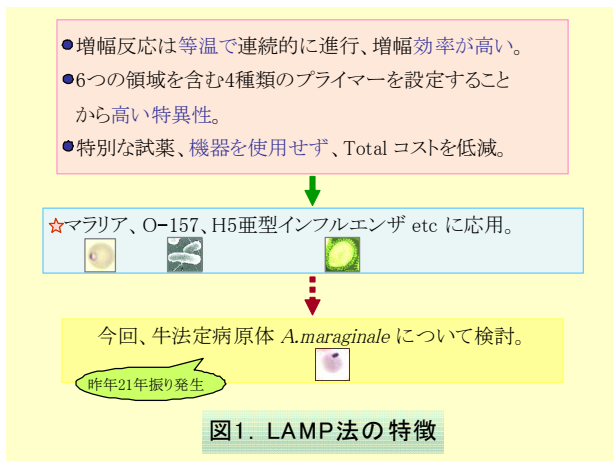
【短 報】

# LAMP 法による簡便で迅速な *Anaplasma marginale* 遺伝子検出法

座喜味 聡、大城 守

LAMP 法は PCR 法と異なり、遺伝子の増幅反応が全て一定温度で進行し、かつその効率は高く、また標的遺伝子の 6 つの領域を認識する 4 種のプライマーを設定することから、特異性も高いとされる。さらに、サーマルサイクラーなど特別な機器を必要としないことから、Total コストを低減出来る。現在、マラリア、O-157、新型インフルエンザなど多くの感染症に応用され、すでに一部商品化されている(図 1)。その原理を図 2 に示す。

今回、昨年本県で 21 年振りに発生した牛の法定伝染病アナプラズマ病の病原体である *A.marginale* について、応用を検討したので報告する。



## 材料と方法

*A.marginale* は県内分離株を用い、サンプル、DNA の抽出、および LAMP 反応は表 1 のとおり実施した。特異性の検討では *A.marginale* の他、表1に示した

住血微生物 DNA を、感度試験では感染血、あるいはクローニングした DNA を希釈し、サンプルとした。

表 1. 材料と方法

- *Anaplasma marginale* 株: H20年県内分離株
- 血液サンプル: H20年県内飼養高齢牛4頭から採取
- DNA抽出: Blood & Tissue genomic mini(Viogene)
- LAMP反応: i プライマー設計 PrimerExplorer V4  
 ii 反応液 Loopamp DNA Amplification kit 20ul  
 Mixed primer 3ul, DNAサンプル 2ul  
 iii 反応 68~60℃、60~180分
- LAMP特異性: *A.marginale* 7株、*A.centrale*、*A.bovis*、*A.phagocytophilum*、*Babesia bigemina*、*B.bovis*、*Theileria orientalis*、*Eperythrozoon wenyoni*等のDNA
- LAMP感度: i *A.marginale* 感染血を健康牛血で希釈  
 ii cloned DNA を希釈

## 結果

*A.marginale* の *msp1 α*、*GroEL*、および *16SrRNA* 3 種の遺伝子について、専用ソフトを用いてプライマー設計を試みたところ、*GroEL* と *16S* について、このように 3 種のプライマーセットが設計出来た(表 2)。

表 2. プライマー設計

遺伝子	ID No	primer	sequence
<i>msp1 α</i>	F3	} 種内変異大きく設計出来ず	
	B3		
	FIP		
	BIP		
<i>GroEL</i>	F3	CAGCTGTGAAGGCACCTG	ID3
	B3	TCTGCTGGTAATGCTGTCAG	
	FIP	CCACGATTTTCGCACCGGTA-GGCGACAGAAGAAAGACAT	} AC-richで設計出来ず
	BIP	CGTACTGCTAAGACTGTGGCG-GTTGCTGTCGACCGCTTCC	
	Loop F		
	Loop R		
<i>16SrRNA</i>	F3	GTGTCGCATCTCGAC	ID2
	B3	CCGTACCAACCTATCGTT	
	FIP	GTGATCTCCGGGACCCATAGG-TGCTGTTGTTGCACTGC	ID1
	BIP	AGAGCATAAAGCCCGAGGAAC-CTGAGACGCCTCTGAGT	
	Loop F	ACGGTAAAGCCCTTTGG	
Loop R	GGCAGTCCTATCGCAACA		
<i>16SrRNA</i>	F3	TGCAACGGGAAAAACCTTAC	ID1
	B3	CCCCACCTTCTCTCAGTT	
	FIP	CCATGACGACCTGTGGAG-CACTTCTGACATGGAGGCT	
	BIP	TGTTGGTTAAGTCCCGCAACG-AGTTTCTTAAAGTGCCCGG	

図 3 に今回の LAMP 法の陽性反応を示した。

目視では、溶液が白濁、あるいは UV 照射で強い蛍光を発することにより、明確に判定できた。泳動では、陽性は特徴的なハシゴ状産物として確認され、制限酵素によりこれらが 1 ~ 2 本のバンドに集約されることも大きな特徴であった。陰性では全く産物は見られなかった。目視でも確認できる溶液の白濁を、濁度測定器でグラフとしてリアルタイムにモニターすることも

きる。以下、反応条件の検討には、主にこの濁度測定器を使用した。

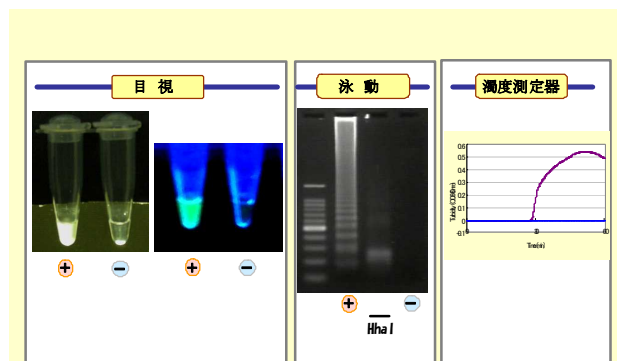


図3. LAMP 陽性反応

3種のプライマーセットによる増幅効果の比較では、GroEL に対する ID3 プライマーセットが、最も早く反応がでたが(図4)、2番目の ID2 プライマーセットを選定した。その理由を以下に述べる。

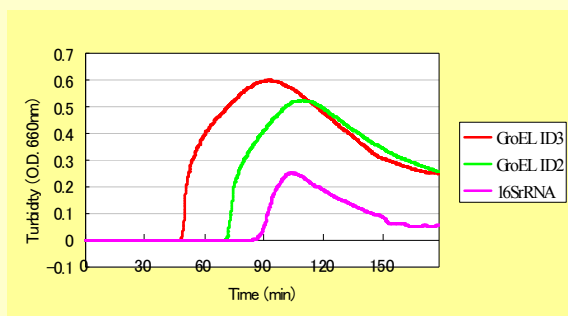


図4. プライマーセットによる増幅効率の比較

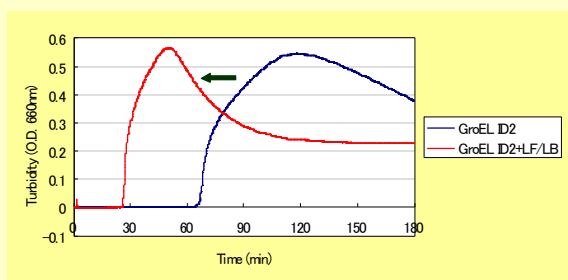


図5. Loopプライマーによる増幅効率の促進

LAMP 反応は、最低4つのプライマーが必要だが、さらに LOOP プライマーと呼ばれる2つのプライマーを加えることで、反応速度が 1/2 から 1/3 に短縮される。図5は、ID2 プライマーセットに LOOP プライマー

を加えた結果で、反応時間が半分以下に短縮された。

一方、最も早い ID3 プライマーセットは、選定領域が AC-rich のため LOOP プライマーが設計できず、さらなる時間短縮化が困難なため見送られた。

反応温度の検討を 60 ~ 68 °C の条件で実施した結果、酵素の至適温度範囲で最も反応が早い、65 °C を設定温度とした(図6)。

以上のことから、LAMP 反応の基本条件を ID3 プライマーセットを使用した、65 °C、一時間とした。

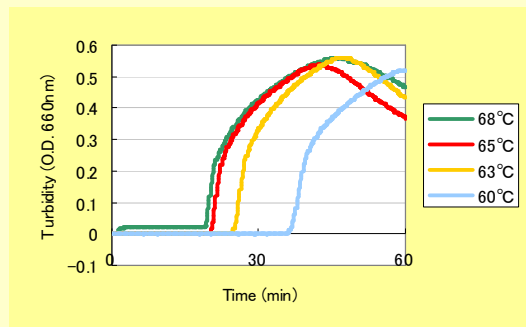


図6. 至適反応温度

特異性の検討結果を図7に示した。県内で分離された、異なる MPSP 遺伝子型を持つ7種の *A. marginale* 株に対しては、全て20分以内に反応が出現した。

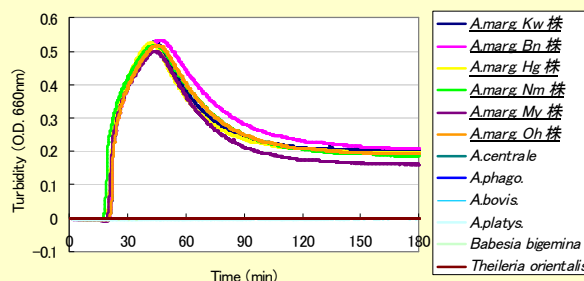
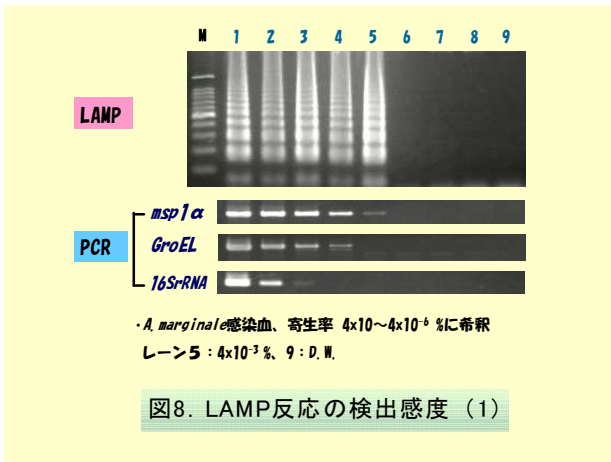


図7. LAMP 反応の特異性

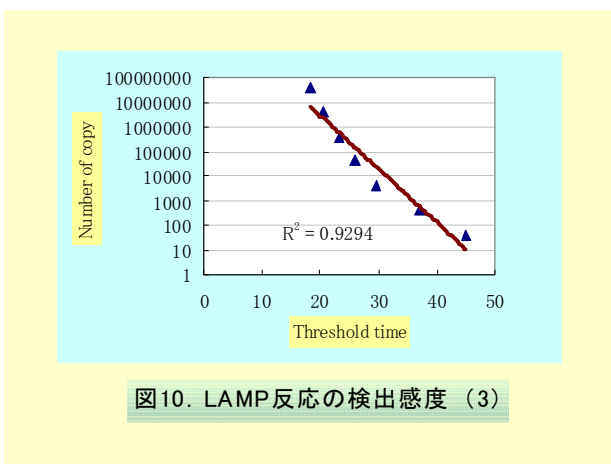
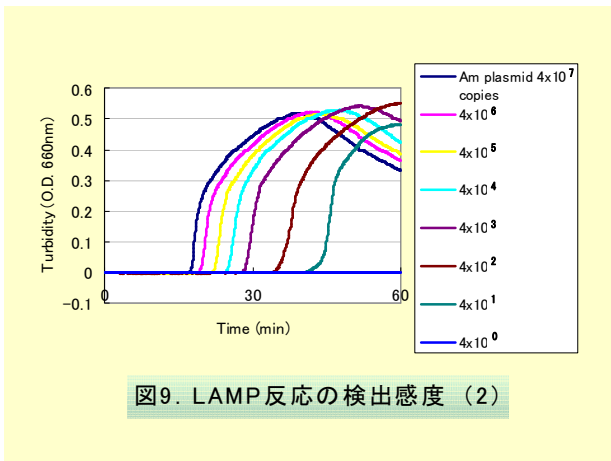
一方、*A.centrale*, *A.phagocytophium*, *A.bovis*, *A.platys*, *B.bigemina*, *Theileria orientalis*, など、その他ここには示していないものを含め、10種の住血微生物 DNA については、3時間まで延長して観察したが、反応は全く見られなかった。

検出感度試験では、感染血の希釈系列を、LAMP と3種類の PCR で比較検査した(図8)。

LAMP ではレーン5の0.004%寄生率まで検出可能で、*msp1* α PCR と同等、GroEL および 16S rRNA PCR より1ケタから2ケタ高い感度だった(図8)。



さらに正確に感度を測定するため、ベクタープラスミドにクローニングした *GroEL* 遺伝子の希釈系列を測定したところ、遺伝子のコピー数に依存して反応の出現時間は延長され、サンプルに最低 40 コピーの遺伝子が存在すれば検出可能と判明した(図9)。



また、反応溶液の濁度が 0.1 に達する時間を横軸に、遺伝子のコピー数を縦軸にプロットすると、高い相関係数の直線が得られ、濁度測定器を用いることにより定量的に *A. marginale* を検出することが可能であることも確認された(図10)。

県内の *A. marginale* 持続感染牛 4 頭について、経

時的に採血し、PCR と LAMP による検査結果を比較したところ、全ての結果が一致した。なお、判定に要した時間は、DNA 抽出後 PCR で約 3.5 時間、LAMP で 1 時間、目視での判定も可能だった(表3)。

表3. 持続感染牛におけるPCRとLAMPによる検出結果

		7月3日	7月22日	9月1日	9月30日
No31	PCR	+	-	+	-
	LAMP	+	-	+	-
No33	PCR	+	+	+	-
	LAMP	+	+	+	-
No35	PCR	-	+	+	-
	LAMP	-	+	+	-
No52	PCR	+	-	+	-
	LAMP	+	-	+	-

\*所要時間: PCR→3.5時間、LAMP→1時間。

### まとめと考察

*A. marginale* の *GroEL* を対象とした新たな LAMP 法は、65℃、1 時間の系で良好な結果がえられ、目視判定も可能だった。特異性および検出感度は従来の PCR 検査と同等に良好で、濁度測定器により定量的検査も可能だった。また手技は溶液を混ぜて加温するだけと、極めて簡便で、PCR 機器のない現場家保でもキャリア牛の摘発など、迅速検査法としての利用が期待された(表4)。

表4. まとめ

- 1) *A. marginale* の *GroEL* を対象とした LAMP 法は、65℃、1 時間の系で良好な結果が得られ、目視判定も可能。
- 2) 特異性および検出感度は従来の PCR 検査と同等に良好で、測定器により定量的検査も可能。
- 3) 手技は極めて簡便で、PCR 機器のない現場家保でもキャリア牛の摘発など、迅速検査法として期待。

本報告の補足として、今後の発展方向あるいは発展状況について説明すると、第1に、現在 PCR も LAMP も、血液から DNA を抽出して検体としているが、抽出を必要としない血液の direct LAMP を、人のマラリアの事例を参考に検討を開始している。第2に、アナプラズマ病による被害の出ている多くに国々でも活用できるように、外国株 DNA を入手し今回の LAMP で検出可能であることを実際に確認したいと考えている(表5)。

表5. 発展方向 (状況)

1. DNA抽出を必要としない、血液検体のdirect LAMP

→ マラリアの事例を参照に血液の加熱処理を検討。

2. 外国株も増幅(検出)可能であることの確認

世界の多くの国々でアナプラズマによる被害が発生。

→ 外国株DNAを入手、実際に増幅を確認。

第3に、*A.marginale* の近縁種である *A.centale* についても、国内に分布し鑑別が必要であることから、特異 LAMP の開発が必要と考えている。ほぼ完成しており、図 11 のように反応時間は LOOP プライマーの追加により 1/3 以下の 30 分以内に短縮、また *A.marginale* や DW とは全く反応しなかった。

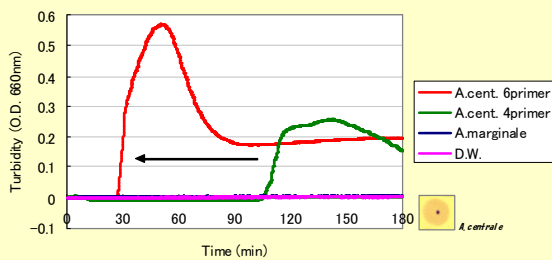


図11. 近縁種 *A.centale* の特異LAMP開発

さらに進めて、*A.marginale* と *A.centale* を同時に検出し、区別可能な multi-LAMP についてもほぼその骨格は出来上がっている。ハシゴ状 LAMP 産物を、たった一つの制限酵素で区別するもので、*A.marginale* と *A.centale* でバンドパターンは異なり、両者の混合では合わさったパターンになるものである(図 12)。

現在、これら酵素による切断や泳動も必要のない、反応後すぐにこのように異なる蛍光色で鑑別ができる、さらに簡便な multi-LAMP 反応系を検討している(図 12)。

また、一般的に PCR ではマルチ化すると、検出感度が 10 倍～ 100 倍低下すると言われているが、LAMP 法ではそのような感度の低下がほとんど無いとされていることも、利点の一つと考えている。

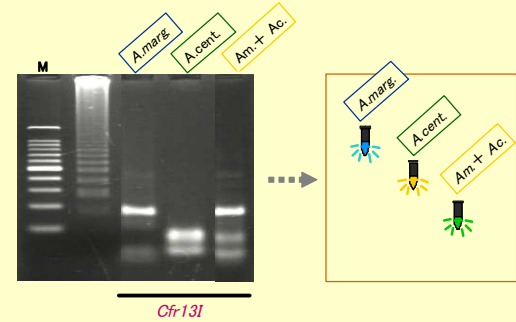


図12. *A.marginale* と *A.centale* の multi-LAMP 開発

参考文献

- 1) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. 2001. Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150-154.
- 2) Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by Loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16: 223-229.
- 3) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, M., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Res.* 28:e63.

その他

研究課題名:

研究期間:

研究担当: 原虫・寄生虫分野

発表論文等: