

豚丹毒菌の迅速診断法の開発

Development of a rapid detection method for Erysipelothrix

岡谷友三アレシヤンドレ, 村上 賢, 森田英利, 加藤行男

麻布大学獣医学部

Alexandre T. Okatani, Masaru Murakami, Hidetoshi Morita, Yukio Kato

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The aim of this study was to develop a rapid detection method of *Erysipelothrix* species. DNA of *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, and *Erysipelothrix* spp. serovar 13 and serovar 18 were extracted and submitted for detection and sequencing of the *gyrB* gene. Among the primers tested for amplifying the *gyrB*, the universal primer set UP1/UP2r showed the best result, and a DNA fragment were obtained from the *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* and *Erysipelothrix* spp. serovar 13. DNA amplification band from *Erysipelothrix* spp. serovar 18 was obtained by a primer derived from the above primer set. The obtained fragments were introduced in the pGEM-T Easy Vector and submitted for sequencing. LAMP primers sets were generated from the obtained sequence, and, among the generated primer sets, one primer set was able to detect the 4 strains tested, and another set was able to detect the *E. tonsillarum* and the strain of serovar 13.

1. 目的

豚丹毒菌は、人では類丹毒を、豚では豚丹毒を引き起こす代表的な人獣共通感染症の原因菌として知られている (1)。本菌は豚においては、急性型の敗血症、亜急性型の蕁麻疹、慢性型の心内膜炎や関節炎を引き起こし (2)、家畜の届出伝染病に指定されている。

本菌の迅速な検出・同定法としていくつかのPCR法が開発されているが (3, 4, 5)、PCR法は患部等から採取された検体に含まれる蛋白質やその他の物質がPCR反応を阻害し、多くの場合、菌の検出が出来ないことが知られている。一方、最近開発されたLoop-mediated isothermal amplification (LAMP法)はPCRより特異性が高く、かつ検体中に含まれる物質による菌の検出阻害も少ない (6)。また、最短で30分で菌の検出・同定が可能のため、LAMP法は様々

な菌種に応用されている (7, 8)。しかし、豚丹毒菌を検出する系ははまだ報告されていない。本研究では、豚丹毒菌に感染した豚や鶏等の家畜ならびに人の患部等の検体から本菌の迅速検出を行うため、LAMP法を用いた豚丹毒菌の迅速検出・同定法の開発を試みる。

2. 材料と方法

供試菌株として *E. rhusiopathiae* CCUG221T (血清型2型)、*E. tonsillarum* ATCC43339 (血清型7型)、*Erysipelothrix* spp. Pécs56 (血清型13型)、*Erysipelothrix* spp. 715 (血清型18型)の4菌株を用いた。

豚丹毒菌の *gyrB* 遺伝子の塩基配列解析。予備実験として、表1に示した11のPCRプライマーを用いて供試菌株の *gyrB* 遺伝子の増幅を試みた。その結果、プライマー UP1/UP2rで *E. rhusiopathiae*, *E.*

Table 1. PCR primers tested for amplifying *Erysipelothrix* spp. *gyrB* gene

Primer	Sequence
MTUB-f	TCGGACGCGTATGCGATATC
MTUB-r	ACATACAGTTCGGACTTGCG
FN2005-f	GGGTGACTGCATTGTCAGATGTA
FN2005-r	GGACGTGTTACTTCACGCGCTTTTT
REF	GTI GGI CCICAY MGI GA
GB-1R	TGC TTG AGA ATC CAG TA
GYB-1X	CAY TAY GAR GGI GGI AT
GYB-2R	ATR TGI GCI CCR TCI AC
GB-2	CAA TCA CGG ATA AGC TA
IGA-R	AAA TAA CTG GCT CAC GT
UP1-1	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG GAC GCA GGA GGA AAA TTC GA
UP2r-1	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCA TCA ACA TCA GCA TCA GTC AT
UP1-2	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG GAT GCA GGA GGA AAA TTC GA
UP2r-2	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCG TCA ACA TCA GCA TCA GTC AT
UP1-3	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG GAT GCA GGA GGA AAG TTC GA
UP2r-3	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCG TCA ACG TCA GCA TCA GTC AT
UP1-4	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG GAT GCA GGA GGA AAG TTT GA
UP2r-4	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCG TCA ACG TCA GCG TCA GTC AT
UP1	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA
UP2r	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT
UP1S	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA
UP2S	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CC

tonsillarum, および血清型 13 型の菌株で増幅産物が得られ, プライマー UP1-1/UP2r-1, UP1-2/UP2r-2 および UP1-3/UP2r-3 で血清型 18 型から増幅産物が得られた。したがって, *gyrB* 遺伝子の増幅にはプライマー UP1/UP2r および UP1-1/UP2r-1 を用い, 塩基配列解析は以下の通りに行った。PCR 増幅産物を電気泳動し, 得られた DNA 断片をアガロースゲルから切り出し, Wizard Genomic DNA Purification Kit を用いて精製した。精製した DNA 断片を pGEM-T Easy Vector Systems のプラスミドに組み込み, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit により塩基配列の決定を行った。

LAMP プライマーの設定および LAMP 反応。シーケンシングで得られた *gyrB* 遺伝子断片の塩基配列を基に, LAMP プライマー設定用の専用ソフト PrimerExplorer V4 を用いて LAMP プライマーを設定した。LAMP 反応は, 設定したプライマーおよび

LAMP 法専用の市販 DNA 増幅試薬キットを用い, 60.5 °C に設定した恒温槽内でキットの説明書に従って行った。

3. 結果と考察

LAMP 法は遺伝子配列の 6 つの領域を含む 4 種類 (FIP, BIP, F3 および B3) のプライマー (以下, プライマーセット) を設定することにより, 標的遺伝子配列を特異的に増幅できる (6)。本研究では, 供試した *Erysipelothrix rhusiopathiae* の *gyrB* 遺伝子領域の塩基配列を基にプライマーセットを設定した結果, 5 つのプライマーセットが設定された。その中, プライマーセット ER2 では *E. tonsillarum* および *Erysipelothrix* spp. 血清型 13 型で LAMP 特有の増幅産物が得られ, プライマーセット ER3 では供試した 4 菌株すべてで増幅産物が得られた (図 1)。

上記 2 つのプライマーセットでは 1 時間から 1 時

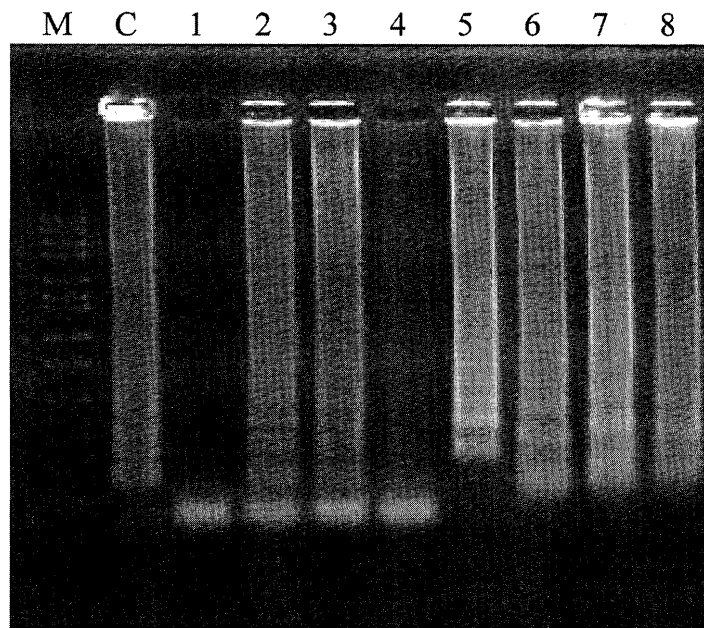


Fig. 1. Agerose gel electrophoresis of LAMP amplified products for *gyr B* gene *Erysipelothrix* spp.. Lanes 1 to 4 are the results from the primer set ER2; lanes 5 to 8 are from the primer set ER3; lanes 1 and 5 are DNA of *E. rhusiopathiae*; lanes 2 and 6 are DNA of *E. tonsillarum*; lanes 3 and 7 are DNA of *Erysipelothrix* spp. serovar 13; lanes 4 and 8 are DNA of *Erysipelothrix* serovar 18; lane M, Hi-Lo DNA marker; lane C, positive control for LAMP reaction.

間半の反応でチューブ内の液体が混濁し、視覚的にも標的DNAの増幅が確認できた。プライマーセットER3では*E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*ならびに*Erysipelothrix* spp. 血清型13型および18型の供試菌株で増幅産物が得られた一方、プライマーセットER2では*E. tonsillarum*および血清型13型のみで増幅産物が得られた。今後、他の菌種のDNAを用い、各プライマーセットの特異性を検討する必要があるが、以上のことから、プライマーセットER3を用いた場合には*Erysipelothrix*属菌の迅速な検出が可能であり、プライマーセットER2の結果から、*gyrB*遺伝子領域を標的とした*E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*ならびに血清型13型および血清型18型のそれぞれを特異的に検出・同定できるLAMP法の開発が可能と考えられた。

4. 要 約

本研究では、LAMP法を用い、*gyrB*遺伝子を標的とした豚丹毒菌の迅速な検出法の開発を行った。供試菌株として*E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *Erysipelothrix* spp 血清型13型および血清型18型を用

いた。各菌株のDNAを抽出、複数のプライマーを用いてPCRで標的遺伝子の増幅を試みた。供試したPCRプライマーのうち、プライマーUP1/UP2rで*E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*および血清型13型で増幅産物が得られ、血清型18型の菌株からは前述のプライマーを基に設定したプライマーで増幅産物が得られた。PCRで得られた増幅産物を精製、遺伝子配列の決定を行い、LAMPプライマーを設定した。設定されたLAMPプライマーのうち、1つのプライマーセットでは供試した4菌株すべてが検出可能で、また、他のプライマーセットでは*E. tonsillarum*および血清型13型の菌株の検出が可能であった。

引用文献

- 1) Brooke, C. J. and Riley, T. V., *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational disease. J. Med. Microbiol., 48: 789-799, 1999.
- 2) Wood, R. L., and Henderson, L. M., Erysipelas, p.629-638. In B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allire, and D. J. Taylor (ed), Diseases of Swine, 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, 2006.

- 3) Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Ishikawa, K., Takahashi, T., Nakamura, M., Ezaki, T., and Morita, H., Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. J. Clin. Microbiol., 32: 1526-1531, 1994.
- 4) Shimoji, Y., Mori, Y., Hyakutake, K., Sekizaki, T., and Yokomizo, Y., Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. J. Clin. Microbiol., 36: 86-89,
- 5) Takeshi, K., Makino, S., Ikeda, T., Takada, N., Nakashiro, A., Nakanishi, K., Oguma, K., Katoh, Y., Suganuma, H., and Ohyama, T., Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. J. Clin. Microbiol. 37: 4093-4098, 1999.
- 6) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res., 28: E63, 2000.
- 7) Misawa, Y., Yoshida, A., Saito, R., Yoshida, H., Okuzumi, N., Ito, N., Okada, M., Moriya, K., Koike, K., Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. J. Infect. Chemother., 13: 134-140, 2007.
- 8) Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T., and Ikedo, M., Sensitive and rapid detection of vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. J. Med. Microbiol., 56: 398-406, 2007.