
電源のない野外でも利用可能な家畜感染症のリアルタイム遺伝子診断技術の確立

岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科・准教授 猪島 康雄

■ 目的

全国に蔓延している牛丘疹性口炎、伝染性膿疱性皮膚炎は、地域社会が混乱する口蹄疫と症状が類似しており鑑別が困難な場合がある。申請者が開発した各種の実験室内診断法は世界で広く用いられているが、実験室での診断に限定されていた。そこで、農場などの野外でも牛丘疹性口炎、伝染性膿疱性皮膚炎の診断を可能にするため、携帯型遺伝子増幅装置を開発し、酵素・試薬を冷凍せずに野外に持ち運んでも遺伝子診断が可能であることを明らかにした。

本研究は、これらの成果をさらに発展させ、電源のない野外でも利用可能な家畜感染症のリアルタイム遺伝子診断技術の確立を目的とする。

■ 方法

野外の農場において、発症した動物の口腔内病変部スワブ検体から核酸を抽出する方法として、通常の遺伝子抽出キットと異なり、加熱と遠心操作が不要な Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE) 法を検討した。牛丘疹性口炎、伝染性膿疱性皮膚炎を想定し、ウシ、ヤギ、ヒツジの唾液中に牛丘疹性口炎ウイルス、伝染性膿疱性皮膚炎ウイルスをそれぞれ添加、希釈し核酸を抽出、LAMP 法による遺伝子増幅反応に供し、その有用性を検討した。また、目視判定のために2種類の遺伝子増幅酵素、3種類の色素を遺伝子増幅反応に用いて比較検討した。さらに、判定時間の短縮を目指し、濁度、吸光度、および蛍光測定によるリアルタイムモニタリングを試みた。

■ 結果および考察

牛丘疹性口炎ウイルス、伝染性膿疱性皮膚炎ウイルスを添加したウシ、ヤギ、ヒツジの唾液から PURE 法で抽出した核酸からは、唾液 1mL 中にウイルスが $10^{2.0} \sim 3.0$ TCID₅₀ 程度存在すれば LAMP 法によりウイルス遺伝子を増幅できることを明らかにした。PURE 法による抽出液、遺伝子増幅用の酵素、反作用バッファー、目視判定用の色素の組み合わせの違いにより、色の識別の容易さに大きな違いが生じることを明らかにした。このことは、LAMP 法による遺伝子増幅反応で安易に酵素や色素を変更した場合、本来の結果とは異なる判定(誤診)をしてしまう危険性があることを示唆しており、最適な組み合わせを事前に繰り返し検証しておく必要性を示した。濁度、吸光度、蛍光の測定による遺伝子増幅反応のリアルタイムモニタリングにおいても、それぞれに適した、あるいは不向きな酵素、反応バッファー、色素の組み合わせが異なることを明らかにした。中でも吸光度、蛍光を測定する機器は、モバイルバッテリーで駆動可能で、かつ比較的軽量であることから、野外への持ち運びに適していると思われた。

■ 結語

本研究により、電源のない野外でも利用可能な家畜感染症のリアルタイム遺伝子診断技術の基盤確立に成功した。