

実験室を必要としない農場で完結する牛丘疹性口炎の迅速診断法の確立

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

全国で発生している牛丘疹性口炎の確定診断は、実験室での検査が必要である。症状が似ている口蹄疫と牛丘疹性口炎が鑑別できない場合や、発生状況から牛丘疹性口炎が強く疑われていても口蹄疫の可能性を否定できない場合には、牛丘疹性口炎の診断より口蹄疫の病性鑑定が優先して実施される。検査で口蹄疫が否定されるまでの約2日は家畜の移動や交通が規制され、当該農場だけでなく、畜産関係者、自治体に加え、畜産に関わりのない地域住民の生活まで混乱する。本研究は、牛丘疹性口炎の検査・診断のために実験室まで移動せずに農場内で完結する牛丘疹性口炎の迅速診断法の確立を目的とした。

■ 方 法

国内外の牛丘疹性口炎ウイルスの塩基配列情報をもとにウイルスエンベロープ遺伝子をターゲットとする LAMP 法用のプライマーセットをデザインした。牛丘疹性口炎の原因となり得る3種類のパラポックスウイルス(牛丘疹性口炎ウイルス、偽牛痘ウイルス、オーフウイルス)とアカシカパラポックスウイルス、アザラシパラポックスウイルス DNA を用いてプライマーセットの特異性、検出感度を評価した。さらに、国内で分離された牛丘疹性口炎ウイルス株、発症牛の口腔内病変部スワブ検体を、農場内での診断のために製作したポータブルコードレスインキュベータを用いて LAMP 反応を実施し、野外での遺伝子診断の可能性を検討した。

さらに、4℃、25℃で1日、2日、4日保存した酵素、反応試薬、目視判定用試薬を用いて同様に LAMP 反応を実施し LAMP 反応への影響を評価した。

■ 結果および考察

牛丘疹性口炎の原因となり得る3種類のパラポックスウイルスを60分以内に高感度に検出、目視で容易に判定できる LAMP 法用プライマーセットをデザインすることに成功した。このプライマーセットを用いた LAMP 反応により、国内で分離された牛丘疹性口炎ウイルス株を検出することができた。牛丘疹性口炎発症牛の口腔内病変部スワブ13検体を用いての LAMP 反応では、9検体を迅速に検出、目視で判定することができた。しかし、残りの3検体については従来法の PCR によりウイルス遺伝子の存在を確認できたにも関わらず、遺伝子を増幅することはできなかった。プライマーの改良が必要と思われた。

LAMP 反応用の酵素、反応試薬、目視判定用試薬は4℃で2日間放置しても安定して遺伝子増幅が可能だった。このことから、緊急時には厳密な保存温度を気にせずに酵素や反応試薬を農場などに持ち運び、野外で LAMP 法による遺伝子診断が可能であることが示唆された。

■ 結 語

実験室に戻らずに農場内で完結する牛丘疹性口炎の迅速診断法の基礎となる技術を確認することができた。今後、プライマーを改良し、臨床検体数を増やしてその有用性を検証し、農場内での迅速診断技術を向上させる予定である。