

新しい遺伝子検出技術を用いた 牛の小型ピロプラズマ症の簡易迅速的な診断法の開発

東北大学大学院農学研究科・教授 田仲 哲也

■ 目的

世界各地で家畜に甚大な被害を与えていたタイレリア原虫やバベシア原虫によるピロプラズマ症などのマダニ媒介性感染症が世界経済に与える脅威は甚大であり、その防除費用は世界全体で毎年約3兆円にも及ぶ。そのため、我々が行ってきたマダニ防除のためのワクチン・殺ダニ剤の開発に繋がる研究に極めて重要な情報をもたらすものとして、マダニ媒介性疾病を公衆衛生学的に評価する疫学的研究が必要とされている。これら病原体のPCRによる鑑別手法はすでに確立されているが、簡易迅速的な診断法は確立されていない。そこで、我々は牛のタイレリア原虫による小型ピロプラズマ症の流行実態を、蛍光 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) や蛍光 Recombinase Polymerase Amplification (RPA) などの新しい遺伝子検出技術を用いて調査することを本研究の目的とした。

■ 方 法

1. 鹿児島県および熊本県のタイレリア原虫の疫学調査

島を含めた鹿児島県や熊本県に生息する牛の血液サンプルを採取した。同時に牛に吸血中のマダニや血液採取地周辺のマダニも採取した。得られた血液サンプルや採取されたマダニについて、DNAを抽出した。次に、これらのサンプルについて、PCRによるタイレリア原虫に対するDNA検査を MultiNA キャピラリー電気泳動によって行い、各地域におけるタイレリア原虫の性状を特定し、各地域の流行特性を捕えることを目標とした。

2. 簡易迅速的な蛍光 LAMP と蛍光 RPA を用いた牛の小型ピロプラズマ症の遺伝子検出技術の構築

タイレリア原虫の LAMP や RPA 解析用のプライマーと蛍光プローブを考案した。すでにこれらについては、主要ピロプラズマ表面タンパク質 (MPSP) 遺伝子などを標的としたプライマーを考案済である。最終目標として、島を含めた鹿児島県や熊本県の地域性を鑑み、フィールドで特殊な設備を必要としない簡易迅速的な小型ピロプラズマ症の診断法を開発する。

■ 結果および考察

本研究では、PCR による鹿児島大隅地域、種子島・屋久島地域、熊本地域の牛の *T. orientalis* の疫学調査を行うとともに、LAMP や RPA を用いた牛の *T. orientalis* における迅速的な遺伝子検出法の確立を目的とした。その結果、鹿児島大隅地域における *T. orientalis* の陽性率は 40.0 %、種子島・屋久島地域における *T. orientalis* の陽性率は 88.5 %、熊本地域における *T. orientalis* の陽性率は 59.1 % であった。迅速的な遺伝子增幅法の構築では、蛍光 LAMP および蛍光 RPA が PCR との検査一致度が高く、どちらも遺伝子增幅を開始してから 30 分という短時間で結果が分かるため、迅速的な遺伝子検出法として有用であった。特に、蛍光 RPA に関しては、プライマーとプローブの選択によって *T. orientalis* の遺伝子型まで判別できる可能性が期待できる。

■ 結 語

本提案の蛍光 LAMP や蛍光 RPA などの新しい遺伝子検出技術が開発されることで、牛の小型ピロプラズマ症の検出が簡便かつ迅速に行われることが可能となり、食肉産業や地域経済の持続的な発展に貢献することができる。