

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380178

研究課題名(和文) 口蹄疫と類症鑑別が困難な反芻獣のパラポックスウイルス感染症の迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid diagnostic methods for parapoxvirus infection in ruminants

研究代表者

猪島 康雄 (Inoshima, Yasuo)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20355184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：口蹄疫と類症鑑別が困難なパラポックスウイルス感染症を迅速に診断するため、パラポックスウイルスに特異的なLAMP法を2種類デザインした。一つは、牛丘疹性口炎ウイルスを100コピー/反応あれば検出できるLAMP法、もう一つは、5種類のパラポックスウイルスをすべて検出できるLAMP法である。また、野外での診断を可能にするため、電源を必要としないコードレス恒温維持装置を製作した。以上より、パラポックスウイルス感染症を野外で迅速に遺伝子診断することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：For rapid diagnosis of parapoxvirus infection, which symptom is similar to that of foot-and-mouth disease, a new LAMP assay to detect parapoxvirus envelope gene was developed. Moreover, a cordless incubator was developed for on-site visual diagnosis. It is considered that the diagnosis method using the LAMP assay with the cordless incubator could be a powerful tool for rapid outdoor diagnosis of parapoxvirus infection with no electricity.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：パラポックスウイルス 牛丘疹性口炎 感染症 診断法 類症鑑別 LAMP

1. 研究開始当初の背景

産業動物や野生動物のパラポックスウイルス感染症(PPV)の皮膚病変は、口蹄疫などの重要な感染性皮膚疾病と類似しているため、類症鑑別が極めて重要である。本研究課題を申請した2010年の4月に、国内で10年ぶりに口蹄疫が発生し、約27万頭の家畜が殺処分され、経済被害は未曾有の2,350億円となった。それ以来、農場の発生状況等からPPV感染症と診断しながらも、万が一のことを考慮した口蹄疫の病性鑑定が急増した。病性鑑定により口蹄疫が否定されるまでのあいだ、地域の社会生活が制限されることから、現場の獣医師のみならず、畜産関連産業、自治体の負担が過大となっていた。そのため、簡単な作業のみでPPV感染症を短時間に検査可能な、新たな診断法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、実験室外で利用可能な、PPV感染症の新たな迅速診断法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新たなPPV迅速遺伝子診断法の開発

結果が判明するまでに数時間を要する従来のPCR法に代わる、新たな迅速遺伝子診断法としてPPV遺伝子特異的なLAMP法の開発を試みた。多くの遺伝子情報がデータベース上に蓄積されている、ウイルスエンベロップ領域を標的としたLAMP用プライマーを多数デザインした。BPSV標準株のエンベロップ領域をプラスミドにクローニングし、 $10^6 \sim 1$ コピー/反応の希釈列を作成し、検出感度を従来のPCR法と比較した。

PPV属に属すすべてのウイルスを検出することを目指し、牛丘疹性口炎ウイルス(BPSV)、偽牛痘ウイルス(PCPV)、オーフウイルス(ORFV)、アカシカパラポックスウイルス(PVNZ)、およびアザラシパラポックスウイルス(SPPV)のDNAを用いて、検出可能か検討した。

牛の臨床材料から分離されたウイルス株4株を用いて、野外のウイルス株も検出可能か検討した。

(2) コードレス恒温維持装置の開発

実験室の外でも遺伝子増幅反応を可能にするため、電源を必要としないコードレス恒温維持装置を製作した。保温型とバッテリー型と2種類の恒温維持装置を製作した。保温型は、ヒーターで加温後、電源をはずし、航空機の断熱材で包んだポットを発泡スチロール箱に入れることにより、設定温度を保つようにデザインした。バッテリー型は、バッテリーにより電源を確保し、設定温度を保つようにデザインした。反応時間として1時間

以上、設定温度が安定しているか評価した。

また、目視による判定を容易にするため、検出試薬を3種類(Loopamp 蛍光目視検出試薬 FDR、ハイドロキシナフトールブルー HNB、D-Quick)を比較した。

(3) 野外臨床材料DNAでの実用性評価

丘疹性口炎を発症した牛の病変部スワブを採材し、DNAを抽出し、従来のPCR法でPPV遺伝子が確認できた検体を、野外臨床材料とした。複数の県から13検体を収集し、上記のLAMP法、コードレス恒温維持装置を用いた診断法の実用性を評価した。

4. 研究成果

(1) 新たなPPV迅速遺伝子診断法の開発

BPSVプラスミドの希釈列を用いて、 10^2 コピー/反応の検出感度を持ち、非特異的な遺伝子の増幅がない、LAMPプライマーの組み合わせをデザインすることができた。デザインしたLAMPプライマーを用いて、リアルタイム濁度測定装置を利用すれば、40分以内にBPSV遺伝子の検出が可能で、最適反応条件を決定した(図1)。従来のPCR法が、反応をスタートさせてから、反応終了後に増幅産物を泳動し、判定に至るまで、2~3時間必要とすることから、反応から判定までにかかる時間の大幅な短縮に成功した。

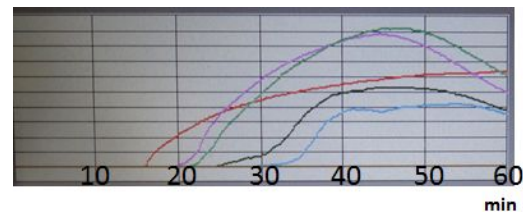


図1. 検出感度の向上と検出時間の短縮

デザインしたLAMPプライマーを用いて、5種類のPPV DNAの検出を検討したところ、口蹄疫との類症鑑別で問題となる、牛丘疹性口炎ウイルス(BPSV)、偽牛痘ウイルス(PCPV)、オーフウイルス(ORFV)の3種類については1時間以内に検出することが可能だった。しかし、残りの2種類、アカシカパラポックスウイルス(PVNZ)、アザラシパラポックスウイルス(SPPV)は検出できなかった。

そこで、5種類のPPVが検出可能な、新たなプライマーをデザインし直した。検出感度は劣るが5種類すべてのPPVが検出できるプライマーをデザインすることに成功した。

どちらのLAMPプライマーも、牛から分離された野外分離株4株を検出することができた。

(2) コードレス恒温維持装置の開発

保温型のコードレス恒温維持装置は(図2)設定温度を一定に維持できず、温度が不安定だった。また、内部が高温になり焦げてしまい、安全性に問題があったため、実際に使用するには不適と判断した。



図2. 保温型コードレス恒温維持装置

バッテリー型のコードレス恒温維持装置は(図3)搭載したバッテリーにより設定温度を1時間以上安定して維持し、アルミブロックのウェル間での温度差もなかったため、野外での利用に適していると考えられた。

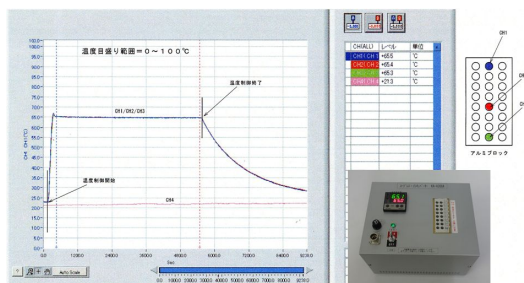


図3. バッテリー型コードレス恒温維持装置のウェル間での温度比較と安定性

異なる3種類の目視判定用検出試薬を用いて、バッテリー型コードレス恒温維持装置により遺伝子増幅反応を行い、判定の容易さを検討した。どの試薬も同程度に、陽性と陰性の判定が目視で容易だった(図4)。



図4. 目視判定用検出試薬の比較

それぞれの試薬の特徴と実験者の状況により、以下のような使い分けが可能と思われた。

- ・Loopamp 蛍光目視検出試薬 FDR ; 実験室ですでに LAMP を利用している場合は、新しく準備する試薬が何もないため、導入が容易。
- ・ハイドロキシナフトールブルー-HNB ; 最も安価。
- ・D-Quick ; 常温保管可能なため、フリーザーがない環境でも導入可能。チューブ内に塗布済みのため、試薬調整作業が省力化。

(3) 野外臨床材料 DNA での実用性評価

デザインした LAMP プライマーを用いて、野外臨床材料から抽出した DNA13 検体から PPV 遺伝子が検出できるか検討した。3種類の PPV を高感度に検出するプライマーでは、13 検体中 10 検体で PPV 遺伝子を検出することができた。感度は低いが 5 種類の PPV すべてを検出するプライマーでは、13 検体中 11 検体で PPV 遺伝子を検出することができた。それぞれのプライマーで共通して検出できなかった検体はなかったことから、2種類の LAMP プライマーを組み合わせれば、口蹄疫に類似した症状を示す PPV 感染症も、海棲ほ乳類やヒトの PPV 感染症も、野外臨床材料からすべて検出可能であると思われた。以上より、実験室外での PPV 感染症の迅速遺伝子診断に有用な LAMP 法、コードレス恒温維持装置を開発することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 37 件)

Inoshima, Y., Ishiguro, N.: On-site visual diagnosis of parapoxvirus infection using a portable cordless incubator. *Anal. Sci.* 30: 1169-1172, 2014. (査読有り)

DOI:

<http://doi.org/10.2116/analsci.30.1169>

Inoshima, Y., Murakami, T., Ishiguro, N., Hasegawa, K., Kasamatsu, M.: An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species. *Vet. Microbiol.* 165: 455-459, 2013. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.04.013

猪島 康雄, 野生ニホンカモシカにおけるパラポックスウイルス感染症、*日本獣医師会誌* 66: 557-563, 2013. (査読有り)

URL:

<http://doi.org/10.12935/jvma.66.557>

Ohno, Y., Inoshima, Y., Maeda, K., Ishiguro, N.: Molecular analysis of parapoxvirus from a spotted seal *Phoca largha* in Japan. *Dis. Aquat. Organ.* 97: 11-16, 2011. (査読有り)
DOI: 10.3354/dao02405

Matsuura, K., Inoshima, Y., Kameyama, K., Murakami, K.: Establishment of a novel ovine kidney cell line for isolation and propagation of viruses infecting domestic cloven-hoofed animal species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47: 459-463, 2011. (査読有り)
DOI: 10.1007/s11626-011-9434-3

Ito, M., Murakami, T., Hayakawa, Y., Shintani, E., Inoshima, Y.: Serological and epidemiological studies of parapoxvirus infection in cattle in Ishikawa Prefecture. *Jpn. Agr. Res. Quart.* 45: 123-127, 2011. (査読有り)
URL:
https://www.jircas.affrc.go.jp/kankoubutsu/JARQ/Vol_index/45_01.html

〔学会発表〕(計 32 件)

猪島康雄、石黒直隆 . パラポックスウイルス感染症の野外での迅速診断法の開発 . 第 157 回日本獣医学会 . 2014 年 9 月 10 日 . 北海道大学 (北海道・札幌市) .

猪島康雄、石黒直隆 . 農場でのパラポックスウイルス感染症診断を目指したコードレス高温維持装置開発の試み . 第 26 回臨床微生物迅速診断研究会 . 2014 年 7 月 26 日 . 岡山コンベンションセンター (岡山・岡山市) .

猪島康雄 . パラポックスウイルス感染症の LAMP 法による診断 . 第 6 回 LAMP 研究会 . 2014 年 2 月 22 日 . 富士通ソリューションスクエア (東京・蒲田) .

猪島康雄、石黒直隆 . 牛丘疹性口炎ウイルス検出用 LAMP 法の検討 . 第 154 回日本獣医学会 . 2012 年 9 月 15 日 . 岩手大学 (岩手・盛岡市) .

猪島康雄 . 野生動物と家畜に広く伝播するパラポックスウイルス感染症の診断法の開発と病原性解析 . 第 152 回日本獣医学会 . 2011 年 9 月 19 日 . 大阪府立大学 (大阪・堺市) .

〔図書〕(計 10 件)

猪島康雄 . 文永堂出版 . 牛丘疹性口炎、偽

牛痘(獣医公衆衛生学 II) . 2014 年 . P.51.

猪島康雄 . 近代出版 . 牛丘疹性口炎、偽牛痘 (牛病学第三版) . 2013 年 . P.246.

猪島康雄 . 近代出版 . ランピースキン病(牛病学第三版) . 2013 年 . P.252.

猪島康雄 . 近代出版 . 牛痘(牛病学第三版) . 2013 年 . P.252-253.

猪島康雄 . 文永堂出版 . ポックスウイルスと感染症 (獣医微生物学第 3 版) . 2011 年 . P.178-182.

猪島康雄 . 文永堂出版 . 牛丘疹性口炎 (獣医微生物学第 3 版) . 2011 年 . P.108.

猪島康雄 . 文永堂出版 . ランピースキン病 (獣医微生物学第 3 版) . 2011 年 . P.108.

猪島康雄 . 近代出版 . 牛痘 (動物の感染症第三版) . 2011 年 . P.109.

猪島康雄 . 近代出版 . 偽牛痘 (動物の感染症第三版) . 2011 年 . P.109.

猪島康雄 . 近代出版 . 伝染性膿疱性皮膚炎 (動物の感染症第三版) . 2011 年 . P.148.

〔その他〕

受賞

猪島康雄 . 平成 23 年度日本獣医学会賞受賞 .

新聞報道

猪島康雄 . 皮膚病の新しい診断法開発 . 岐阜新聞 . 2012 年 11 月 13 日朝刊 .

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

猪島 康雄 (INOSHIMA, Yasuo)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号 : 20355184

(2) 研究分担者

石黒 直隆 (ISHIGURO, Naotaka)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号 : 00109521