

Loop-mediated isothermal amplification法を用いた馬鼻肺炎による流産の診断法の検討

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	小山,毅 羽生,英樹 山口,雅紀 加藤,昌克 根本,学
発行元	日本獣医師会
巻/号	64巻12号
掲載ページ	p. 950-953
発行年月	2011年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Loop-mediated isothermal amplification 法を用いた 馬鼻肺炎による流産の診断法の検討

小山 毅^{1†} 羽生英樹^{1†} 山口雅紀^{1†} 加藤昌克^{1†} 根本 学^{2†}

1) 北海道日高家畜保健衛生所 (〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町2-88-5)

2) 日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所 (〒329-0412 下野市柴1400-4)

(2011年4月4日受付・2011年7月14日受理)

要 約

馬鼻肺炎による流産の診断法として、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の応用を検討した。流産胎子58症例の肺と胸腺115検体を供試検体とし、現行診断法の補体結合反応法 (CF法) とLAMP法による成績を比較検討した。馬鼻肺炎と診断した24症例から採材した肺と胸腺48検体は、CF法では41検体が陽性、LAMP法では全検体陽性であった。馬鼻肺炎を否定した64検体は、CF法では全検体陰性だったが、LAMP法では62検体が陰性、2検体が陽性であった。不一致の2検体はPCR検査結果から馬鼻肺炎であったことが示唆され、LAMP法の感度、特異性はCF法と同程度かそれ以上と考えられた。また、抗補体反応によりCF法では判定不能だった3検体も、LAMP法では判定可能であった。以上より、LAMP法は馬鼻肺炎による流産の診断法として有用であると考えられる。

—キーワード：流産，診断，馬鼻肺炎，馬ヘルペスウイルス1型，LAMP法。

----- 日獣会誌 64, 950～953 (2011)

馬鼻肺炎は、ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) 及び4型の感染によって引き起こされる伝染性疾患の総称で、発熱性呼吸器疾患、流産及び神経疾患が含まれる [1]。本病は家畜伝染病予防法に規定される監視伝染病の一つで、特に、EHV-1の感染による流産はその伝染性の強さから、しばしば同一牧場で継続発生するなど、軽種馬生産地においては警戒を要する伝染病として位置づけられ、的確な防疫対応を行うために迅速な診断が求められている。

現行の診断法は、家畜の伝染性疾患の病性鑑定に際し標準的手法を示した病性鑑定指針 (農林水産省消費・安全局長通知) に示されており、北海道日高家畜保健衛生所 (日高家保) では流産胎子搬入当日に結果を判定できる補体結合反応法 (CF法) による抗原検出により診断を行っている。

しかしながら、CF法では、高力価の抗EHV-1抗体を必要とすること、検査感度の向上を必要とする事例が経験されていること等の課題がある。また、抗補体反応により検査不成立となりCF法では判定できない事例については、病性鑑定施設のある石狩家畜保健衛生所に送付し、PCR検査を実施しているが、結果が得られるま

で日数を要する。

近年、EHV-1遺伝子を検出するLoop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が開発された [2]。LAMP法は、ウォーターバスやヒートブロックを用いて30～60分の等温 (60～65℃) 反応で実施可能であり [3-5]、濁度や蛍光色の変化によって目視で判定することが可能である [6]。

迅速性及び簡便性から、LAMP法は迅速診断法として有用であると考えられる。そこで本研究では、LAMP法が馬鼻肺炎による流産の診断法として応用が可能か、現行診断法のCF法と比較検討した。

材料及び方法

材料：平成21年12月～平成22年4月までに日高家保に流産原因検索を目的として搬入された流産胎子58症例を材料とした。検査に供する臓器は、流産胎子からのEHV-1抗原検出に適している肺 [7]、及び当所で実施した試験で肺の次にウイルス分離率が高かった胸腺を選択した。各症例から肺及び胸腺を採材したが、1症例で胸腺の採材欠落があり、肺58検体、胸腺57検体を検査に供した。

† 連絡責任者：小山 毅 (北海道日高家畜保健衛生所)

〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町2-88-5

☎0146-42-1333 FAX 0146-42-0542

E-mail: oyama.takeshi@pref.hokkaido.lg.jp

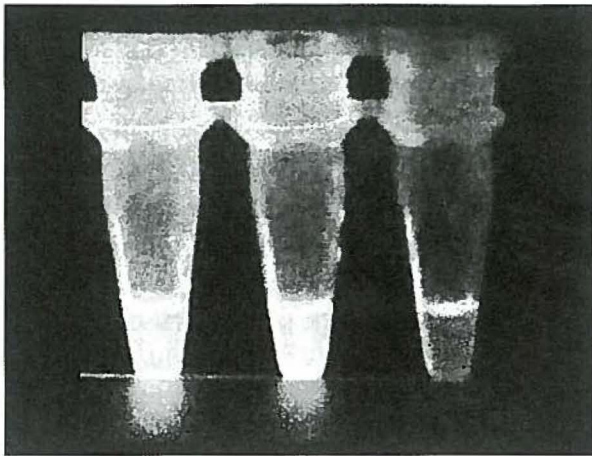


図1 目視によるLAMP結果判定例
(左から陽性検体, 陽性コントロール, 陰性コントロール)

CF法: ペロナール緩衝液 (VBS) で20%に希釈した臓器乳剤を3,000rpmで10分間遠心し, 上清を検査材料とした。抗血清には, 抗EHV-1 CF抗体価64倍の馬血清を56℃30分間非働化したものを用い, 感作血球液は, 1.7%羊赤血球浮遊液と5単位の溶血素液 (デンカ生研機, 東京) を等量混合したものを用いた。また, 補体 (デンカ生研機, 東京) は5CH₅₀ (50%溶血単位) に調整した。

CF法による抗原検出は, 96穴マイクロプレートを用い表1のように検査材料25μlをVBSで1倍から8倍まで段階希釈した後, 抗血清25μlと補体50μlを各ウェルに加えた。また, 検査材料に含まれる補体結合反応阻害物質による抗補体反応の有無を確認するため, VBSで2倍希釈した検査材料25μlに抗血清を加えず補体50μlを加えたウェルを抗補体コントロールとして検査材料ごとに用意した。プレートを攪拌し37℃30分反応させた後, 感作血球液50μlを全ウェルに加え再度37℃30分反応させた。プレートを1,000rpmで2分遠心し, 完全溶血阻止を示した最高希釈倍数の逆数をウイルス力価とし, 力価1倍以上の材料を陽性と判定した。

LAMP法: 臓器からのDNA抽出はアルカリ熱抽出法で行った。すなわち50mM NaOH 90μlで臓器約20mgを融解させ, 煮沸し蛋白質を熱変性させた後, 1M Tris-HCl (pH6.8) 20μlを加えて中和し変性蛋白質を不溶化させる。これを12,000rpmで3分間遠心し, 上清をDNA抽出液とした。

LAMP反応液として, Loopamp DNA増幅試薬キット (栄研化学機, 東京) 及びLoopamp 蛍光・目視試薬 (栄研化学機, 東京) を用い, プライマーには, Nemotoら [2] によって報告されたEHV-1のglycoprotein C (gC) とglycoprotein E (gE) 遺伝子を標的としたそれぞれ6種類のプライマーを用いた。LAMP反応液14.5

表1 CF法術式

	×1	×2	×4	×8	抗補体コントロール
検査材料 (μl)	25	25	25	25	25
VBS (μl)	—	25	25	25	25を捨てる
抗血清 (μl)	25	25	25	25	—
補体 (μl)	50	50	50	50	50
感作血球液 (μl)	50	50	50	50	50

表2 CF法及びLAMP検査成績

区分	症例数	CF法結果 (検体数)			馬鼻肺炎診断結果	LAMP検査結果 (検体数)		
		陽性	陰性	不成立		陽性	陰性	判定不能
A	24	41	7	0	+	48	0	0
B	1	0	0	1	+	1	0	0
C	32	0	64	0	-	2	62	0
D	1	0	1	1	-	0	2	0

*CF法またはCF法が不成立の場合PCR検査で馬鼻肺炎と診断したものを+, 否定したものを-とした。

μl, プライマー各1μl, 滅菌蒸留水2.5μl, DNA抽出液1μlを混和し, ウォーターバスで63℃40分反応させた。暗室でUV照射 (365nm) を行い, 蛍光の有無により目視判定した (図1)。

成 績

CF法検査成績: CF法検査結果と診断結果から表2のとおり4群に区分した。区分Aは肺と胸腺両方あるいは一方が抗原陽性であった24症例で, 41検体が陽性, 7検体が陰性であった。内訳は17症例が肺, 胸腺いずれも陽性, 4症例が肺のみ, 3症例が胸腺のみ陽性であった。この24症例については馬鼻肺炎と診断した。区分Bは抗補体反応により検査不成立だった1症例であった。本例については別に実施したPCR検査においてEHV-1遺伝子を検出したため, 馬鼻肺炎と診断した。区分Cは肺, 胸腺すべて陰性であった32症例, 区分Dは肺が抗補体反応により検査不成立であった1症例で, 区分C及びDの計33症例は馬鼻肺炎を否定すると診断した。

LAMP法検査成績: LAMP法の検査成績において, 使用したgCとgE遺伝子を標的としたプライマーによる差は認められず, すべて一致した。このことから, プライマーごとの結果を省略し, LAMP法の結果として記載する。

表2のとおり, CF検査成績の区分に基づき4つに区分した。区分Aの24症例は48検体すべてが陽性と判定された。区分Bの1症例1検体も陽性と判定された。区分Cの32症例中, 1症例2検体が陽性, 31症例62検体

は陰性と判定された。区分Dの1症例2検体は陰性と判定された。すべての検体で判定不能はみられなかった。なお、区分Cで陽性となった1症例2検体については、別に実施したPCR検査においてもEHV-1遺伝子を検出した。

考 察

現行の診断法であるCF法とLAMP法の成績を比較すると、CF法で馬鼻肺炎と診断された症例を分類した区分Aの24症例48検体はすべてLAMP法で陽性と判定され、さらに、臓器中のウイルス抗原量が少ないためにCF法では陰性と判定されたと考えられる7検体についても、LAMP法ではすべて陽性と判定された。また、CF法で陰性と判定され、馬鼻肺炎を否定した区分Cの32症例64検体では、31症例62検体がLAMP法で陰性、1症例2検体が陽性と判定され、1症例でCF法とLAMP法間で不一致がみられた。当該症例は別に実施した肺と胸腺を用いたPCR検査でEHV-1遺伝子を検出され、疫学的には同一牧場で続発した流産胎子が馬鼻肺炎と診断されていることから、ウイルス量が少ないためにCF法では陰性と判定されたと考えられた。このことから、ウイルス量が少なくCF法では陰性と判定されてしまう検体でも、LAMP法では陽性と判定することが可能であり、LAMP法はCF法より感度が高いと考えられた。

また、CF法とLAMP法による検査成績はほぼ完全に一致(カッパの係数0.83)していた。さらに、馬鼻肺炎以外の種々の原因で流産した区分C及びDの64検体でLAMP法陰性が確認できたことから、LAMP法の特異性はCF法と同程度かそれ以上と考えられた。

さらに、CF法では抗補体反応により検査不成立となった区分B及びDの2症例3検体は、LAMP法では陽性、または陰性の判定が可能であり、別に実施したPCR検査と一致する成績が得られたことから、LAMP法は阻害物質の影響を受けにくく、的確な診断が可能と考えられる。

LAMP法、PCR検査のEHV-1遺伝子に対する検出感度は同程度であると報告されているが[2]、PCR検査

は機材配備の都合により病性鑑定施設のある家畜保健衛生所へ検査を依頼しており、実施には日数を要する。LAMP法は、サーマルサイクラーなどの特殊な機材を必要とせず、ウォーターバス、遠心器等の汎用機器により検査可能で、検査所要時間がCF法と同程度(約2時間)であることから、迅速な防疫対応を必要とする生産現場において有効な検査法であると判断された。

最後に、本研究の実施にあたり種々ご教示いただいた日本中央競馬会 競走馬総合研究所栃木支所の松村富夫先生に深謝する。

引用文献

- [1] Ardans AA: Equine herpesviruses, Veterinary microbiology, Hirsh DC, 2nd ed, 320-322, Blackwell publishing, Iowa (2004)
- [2] Nemoto M, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T: Loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Equid herpesvirus 1 and 4 and differentiating a gene-deleted candidate vaccine strain from wild-type Equid herpesvirus 1 strains, J Vet Diagn Invest, 22, 30-36 (2010)
- [3] Nagamine K, Hase T, Notomi T: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers, Mol Cell Probe, 16, 223-229 (2002)
- [4] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T: Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template, Clin Chem, 47, 1742-1743 (2001)
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T: Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res, 28, 63 (2000)
- [6] Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, Nat Protoc, 3, 877-882 (2008)
- [7] Schröder U, Lange A, Glatzel P, Ludwig H, Borchers K: The relevance of equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in a German thoroughbred stud, Berl Munch Tierarztl, 113, 53-59 (2000)

Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Diagnosis of Equine Herpesvirus 1 Infection Using Aborted Fetuses

Takeshi OYAMA^{*†}, Hideki HANYU, Masanori YAMAGUCHI, Masakatsu KATO
and Manabu NEMOTO

** Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Center, 2-88-5 Sizunai-asahi-cho, Shinhidaka-cho, Hidaka-gun, 056-0003, Japan*

SUMMARY

We evaluated loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for equine herpesvirus type 1 (EHV-1) with regard to its utility in diagnosing equine rhinopneumonitis (ERV) in aborted fetuses. The LAMP assay was compared with the current EHV-1 antigen detection method using the complement fixation (CF) method. The LAMP assay and the CF method were performed using 115 samples, comprising 58 lungs and 57 thymuses collected from 58 aborted fetuses. The LAMP assay detected EHV-1 in 48 samples collected from aborted fetuses diagnosed with ERV, whereas the CF method only detected EHV-1 in 41 of 48 samples. The LAMP assay detected EHV-1 in 2 of 64 samples, which were diagnosed with non-ERV by the CF method. These two samples were positive for EHV-1 by a PCR assay. These results indicate that the LAMP assay is more sensitive and specific than the CF method. In addition, the LAMP assay was able to diagnose three samples, which were unable to be diagnosed using the CF method because of anti-complement reaction. The LAMP assay should be useful in the diagnosis of ERV in aborted fetuses.

— Key words : abortion, diagnosis, Equine rhinopneumonitis, Equine herpesvirus type 1, LAMP.

† Correspondence to : Takeshi OYAMA (Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Center)

2-88-5 Sizunai-asahi-cho, Shinhidaka-cho, Hidaka-gun, 056-0003, Japan

TEL 0146-42-1333 FAX 0146-42-0542 E-mail : oyama.takeshi@pref.hokkaido.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 950 ~ 953 (2011)