



宮崎大学
University of Miyazaki



国立大学法人

東京農工大学



令和7年3月28日

報道機関各位

国立大学法人 宮崎大学

国立大学法人 東京農工大学

ランピースキン病ウイルスの生ワクチン株と野外流行株の 迅速簡便な型別法を開発

〈SATREPS 事業によるタイ動物衛生研究所との国際共同研究の成果〉

宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター（山田健太郎教授、三澤尚明特別教授ら）、東京農工大学農学部附属感染症未来疫学研究センター（竹前等准教授、大場真己准教授ら）、タイ国立動物衛生研究所（Nutthakarn Suwankitwat 博士、Lerdchai Chintapitaksakul 所長ら）の国際共同研究により、牛および水牛のウイルス性家畜伝染病ランピースキン病について、複数の遺伝子を対象としたリアルタイム PCR と高解像度融解曲線解析法（HRM 解析法）を組み合わせた方法により、生ワクチン株（ワクチン型）、野外流行株（従来型および組換え型）を迅速かつ簡便に鑑別できる診断法を開発しました。

本共同研究は、地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS[※]）「世界の台所を目指すタイにおける家畜生産と食品安全に関する新技術導入による畜産革命の推進」（研究代表：三澤尚明）において実施され、本研究成果は、2025年3月1日付で *Veterinary Sciences* 誌に掲載されました。

※ SATREPS (Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development) とは、独立行政法人科学技術振興機構 (JST) と 独立行政法人国際協力機構 (JICA) が共同で実施している、地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムで、地球規模課題解決のために日本と途上国の研究者が共同で行う研究プログラムです。宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター (CADIC) が取り組むプログラムは、ASEAN のリーダー国であるタイの獣医系主要大学および行政機関と連携し、口蹄疫やランピースキン病を含む重要家畜伝染病の早期診断、伝播疫学に基づく先回り防疫、畜産環境浄化技術、さらには食肉の安全性確保をテーマに、共同調査・研究および人材育成事業を柱とした産業動物防疫拠点ネットワークの構築を目的としています。

【背景】

ランピースキン病は主に牛および水牛に発生するウイルス性家畜伝染病で、死亡率はそ

れほど高くはなく（1~5%）、多くは自然治癒しますが、特徴的な皮膚の結節病変や乳量減少等を引き起こし、大きな経済的損害をもたらします（写真 1）。蚊やハエ、ダニなどの吸血昆虫（ベクター）による機械的伝播や、汚染された飼料や水、器具を介して感染します。また、感染した牛の移動によっても感染が拡大します。国内では家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されています。人に感染することはありません。

ランピースキン病の原因ウイルスは、天然痘ウイルスと同じポックスウイルス科に属するランピースキン病ウイルス（LSDV）で、そのゲノムはウイルスの中では大きく、156 個の遺伝子を含む約 15.1 万塩基対の 2 本鎖 DNA で構成されています。ランピースキン病は 1929 年にザンビアで初めて報告され、しばらくはアフリカ大陸に限定された病気でしたが、1990 年以降に中東やヨーロッパ南部へその発生が拡大し、2019 年以降にアジア諸国にも急速に拡大しました。



写真 1 ランピースキン病罹患牛（タイ畜産開発局提供）

ランピースキン病の対策の一つに弱毒生ワクチンの接種があります。現在使用されている弱毒生ワクチンは本病の予防において非常に有効ですが、ワクチンを接種した牛でその副反応として軽度の皮膚結節が生じることがあります。このため、ランピースキン病の疑われる皮膚結節が生じている牛について、野外流行株の感染によるものか、生ワクチンを接種したことによるものなのか区別することがランピースキン病の流行を把握する上で重要になります。さらに、近年アジアで急拡大した LSDV は、野外流行株（従来型）と生ワクチン株（ワクチン型）のゲノムがモザイク状に組換えを起こしたハイブリッド株（組換え型）であることが判明したため、従来型およびワクチン型に加えて、この組換え型を含めた鑑別診断が必要となりました。

2021 年 4 月初めにタイ東北部や南部の牛の間で家畜伝染病のランピースキン病が流

行・拡大し、畜産の盛んな南部パタルン県では移動制限により農家の経済損失が拡大しました。そのため、タイ側からの要望で、ランピースキン病の診断法の開発を本プロジェクトで実施することになりました。タイ国内に拡散している LSDV のゲノム解析を行ったところ、組換え型であることが明らかとなり、野外流行株である従来型・組換え型とワクチン株を鑑別できる遺伝子診断法の共同開発を行うことになりました。しかし、ウイルスの型別でよく使用される部分的な塩基配列の比較では、この 3 者を簡単に区別することはできません。そもそもウイルスの塩基配列決定には一定の時間と費用がかかるだけでなく煩雑なこともあり、迅速、安価かつ簡便にこの 3 者を峻別する方法を開発しなければなりませんでした。

【成果】

そこで我々は、高解像度融解曲線解析法（HRM 解析法）に着目しました。HRM（High Resolution Melting）解析法は 2 本鎖 DNA における塩基の置換や挿入・欠失を高感度に検出できる方法です。この方法は次の原理、つまり、2 本鎖 DNA が加熱とともに解離（融解）すること、その解離（融解）温度は塩基配列（GC 含量）や長さによって変わることで、2 本鎖 DNA に取り込まれると蛍光を発する色素を利用して DNA の解離を検出できること（解離により蛍光の強さが減少する）に基づいています。今回の鑑別診断法では、組換え型が従来型とワクチン型の両者の遺伝子を保有していることを利用し、従来型を示す遺伝子領域とワクチン型を示す遺伝子領域を標的として HRM 解析を行えば、それぞれ異なる解離曲線を示すため、3 者を峻別することが可能であると考えました。通常のリアルタイム PCR を行った後に装置内で自動的に HRM 解析を行わせることができます。診断にかかる時間は 4 時間程度（試料および試薬の調整に約 2 時間、さらにリアルタイム PCR および HRM 解析に約 2 時間）で、塩基配列決定法に比べて非常に迅速、安価かつ簡便に 3 者のゲノム配列の違いを判定できるようになりました。

3 者のウイルスゲノム配列を比較し、従来型とワクチン型との間で数十塩基の挿入・欠失が認められる 3 つのウイルス遺伝子（遺伝子番号 095、126 および 145）を HRM 解析による型別用に選択しました。一方、組換え型は、遺伝子番号 095 および 145 では従来型の塩基配列を、遺伝子番号 126 ではワクチン型の塩基配列を保有します。まず、人工合成した各 DNA を利用して、リアルタイム PCR により増幅された各標的の DNA 断片が HRM 解析により従来型とワクチン型に区別できることを確認しました（図 1）。次に実際のウイルスを使用して評価したところ、HRM 解析においてブルガリアで分離された従来型の野外流行株は全ての遺伝子が従来型、生ワクチン株は全ての遺伝子がワクチン型を示し、さらにタイで分離された組換え型は期待どおり、遺伝子番号 095 および 145 は従来型、遺伝子番号 126 はワクチン型を示しました（図 2）。図 2 に示した組換え型の結果は代表例ですが、タイ国内の 8 つの県から収集した感染牛の皮膚病変組織 15 検体を用いて HRM 解析を行ったところ、全て組換え型であると判定することができました。今回開発

した HRM 解析による LSDV 型別法を通常の 96 ウェル PCR 用リアルタイム PCR 機で診断する場合、1つのウイルス株の診断に3ウェル分（3反応分）しか必要としないため、最大30検体を同時に検査できることから、多検体の同時診断にも適しています。

【展望】

タイでは牛および水牛で LSDV の組換え型が流行しましたが、従来型の侵入はまだ認められていません。しかし、国境を接するミャンマーでは従来型の発生が認められていることから、今回開発した LSDV 鑑別診断法により、従来型が侵入した場合であっても、迅速な検知とその防疫対策に役立てられることが可能になりました。

2024年11月に、福岡県において、日本で初めてランピースキン病の発生が確認され、熊本県でも続発しました。現在では収束していますが、再発時に備え、早期診断による防疫体制の強化が求められることから、本プロジェクトで開発した診断法は、流行国だけでなく、国内防疫への有効性が期待されます。

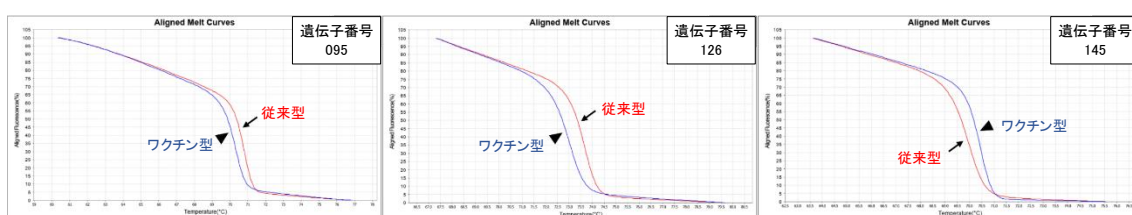


図1 人工合成 DNA を使用して HRM 解析による各遺伝子の型別が可能であることを確認

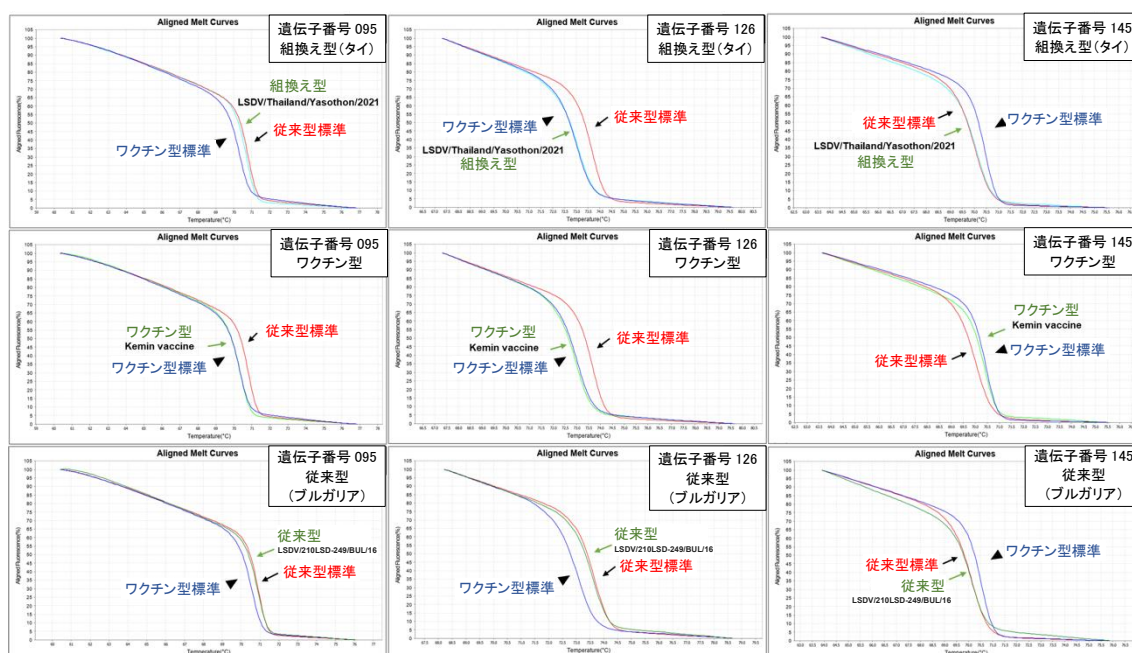


図2 3遺伝子を対象とした HRM 解析により LSDV 従来型、組換え型およびワクチン型の峻別

が可能であることを確認

【論文情報】

雑誌名 : Veterinary Sciences 12 卷 3 号 (記事番号 213) 2025 年

論文名 : Development of a Multi-Locus Real-Time PCR with a High-Resolution Melting Assay to Differentiate Wild-Type, Asian Recombinant, and Vaccine Strains of Lumpy Skin Disease Virus

著者 : Bhakha, Kulyarat*, Yuto Matsui*, Natchaya Buakhao, Saruda Wanganurakkul, Taweewat Deemagarn, Mami Oba, Hitoshi Takemae, Tetsuya Mizutani, Naoaki Misawa, Lerdchai Chintapitaksakul, Kentaro Yamada** and Nutthakarn Suwankitwat** (*共同筆頭著者、**共同責任著者)

DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12030213>

URL: <https://www.mdpi.com/2306-7381/12/3/213>

【取材に関する問合せ先】

宮崎大学 企画総務部総務広報課

TEL : 0985-58-7114 e-mail : kouhou@of.miyazaki-u.ac.jp

東京農工大学総務部総務課広報室

TEL : 042-367-5930 e-mail : koho2@cc.tuat.ac.jp

【研究に関する問合せ先】

宮崎大学 農学部獣医学科 (産業動物防疫リサーチセンター兼任) 教授 山田健太郎

TEL : 0985-58-7285 e-mail : kentaro-y@cc.miyazaki-u.ac.jp

宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター 特別教授 三澤 尚明

TEL : 0985-58-7777 e-mail : a0d901u@cc.miyazaki-u.ac.jp